



HAL
open science

Modulation de la transmission nociceptive par les récepteurs métabotropiques du glutamate de groupe I et les canaux calciques de type L dans la moelle épinière : approche électrophysiologique in vivo

Houda Radwani

► **To cite this version:**

Houda Radwani. Modulation de la transmission nociceptive par les récepteurs métabotropiques du glutamate de groupe I et les canaux calciques de type L dans la moelle épinière : approche électrophysiologique in vivo. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Bordeaux; Université Abdelmalek Essaâdi (Tétouan, Maroc), 2016. Français. NNT : 2016BORD0383 . tel-01965320

HAL Id: tel-01965320

<https://theses.hal.science/tel-01965320>

Submitted on 26 Dec 2018

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

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



THÈSE EN COTUTELLE PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE DIPLÔME DE
**DOCTORAT NATIONAL D'UNIVERSITÉ ABDELMALEK
ESSAÂDI-TÉTOUAN (MAROC)**

Et

DOCTORAT D'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX (FRANCE)

Centre d'Études Doctorales en Sciences et Technologies de Tétouan (Maroc)
École Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé de Bordeaux (France)

SPÉCIALITÉ : Neurosciences

Par Mlle. **Houda RADWANI**

**Modulation de la transmission nociceptive par les récepteurs
métabotropiques du glutamate de groupe I et les canaux calciques de
type L dans la moelle épinière : approche électrophysiologique *in vivo***

Date de soutenance : 17 Décembre 2016

Membres du jury :

Nom	Université	Qualité
M. Ali Ouarour	Professeur d'Enseignement Supérieur Université Abdelmalek Essaâdi Faculté des Sciences Tétouan- Maroc	Président
M. Mohammed Bennis	Professeur Universitaire Université Cadi Ayyad Faculté des Sciences Semlalia Marrakech-Maroc	Rapporteur Externe
M. Francisco Olucha Bordonau	Professeur Universitaire Université Jaume I de Castellón Castellón-Espagne	Rapporteur Externe
Mdm. Seloua El Ouezzani Taybi	Professeur d'Enseignement Supérieur Université Sidi Mohammed Ben Abdellah Faculté des Sciences Fès-Maroc	Examinatrice
M. Pascal Fossat	Maître de Conférences Université de Bordeaux Bordeaux- France	Directeur de thèse
M. Mohammed Errami	Professeur Universitaire Université Abdelmalek Essaâdi Faculté des Sciences Tétouan- Maroc	Directeur de thèse

Ces travaux de trois ans de thèse ont été réalisés dans le cadre d'une convention de Co-tutelle entre l'université de Bordeaux (Bordeaux-France), et l'université Abdelmalek Essaâdi, Faculté des Sciences de Tétouan (Tétouan-Maroc). Les travaux menés au cours de cette thèse ont été réalisés en partie au sein de l'équipe "Mécanismes Centraux de la Sensibilisation à la Douleur", dirigée par le professeur Marc Landry (CNRS U5297, Institut Interdisciplinaire de Neurosciences, l'Université de Bordeaux- Bordeaux, France), et en partie au sein de l'équipe "Physiologie et Physiopathologie" dirigée par le professeur Mohammed Errami (Département : Sciences de la vie, Faculté des Sciences de Tétouan (Tétouan-Maroc)). Ces travaux de thèse ont été réalisés grâce au soutien fourni par le programme "Erasmus Mundus Green IT" géré par l'université de Vigo (Vigo - Espagne)

AVANT PROPOS

J'ai mené mes travaux de recherche de thèse en partie dans l'équipe «Mécanismes Centraux de la Sensibilisation Centrale à la Douleur » de l'Institut Interdisciplinaire de Neurosciences du CNRS U5297, à l'Université de Bordeaux (Bordeaux-France), et en partie au sein de l'équipe «Physiologie et Physiopathologie», à la Faculté des Sciences de Tétouan (Tétouan- Maroc). Bien évidemment, sans l'aide financière (Bourse d'études Doctorales) du programme "*Erasmus Mundus Green IT*" géré par "l'Université de Vigo (Vigo - l'Espagne)" la réalisation de ce travail aurait été impossible.

La douleur est la première cause de la consultation médicale, et les douleurs persistantes et chroniques sont de plus en plus fréquentes dans nos sociétés. Ces douleurs affectent considérablement la qualité de la vie du sujet, elles altèrent physiquement et émotionnellement les individus. De nos jours, les traitements disponibles pour ces douleurs ont une efficacité limitée avec beaucoup d'effets secondaires indésirables (vomissements, vertiges, problèmes du sommeil, troubles de mémoire,...) qui limitent leur utilisation. Il existe donc un réel besoin de perpétuer les efforts dédiés à la recherche des cibles pour de nouveaux analgésiques, des nouvelles pistes thérapeutiques ou des stratégies novatrices. Dans ce contexte, la recherche fondamentale chez l'animal a pour but de comprendre les mécanismes impliqués dans la sensation douloureuse et de donner ensuite aux études cliniques qui servent à l'évaluation des futurs médicaments ou des nouvelles procédures de soins, les connaissances suffisantes concernant ces mécanismes dans l'espoir de valider un nouveau traitement, une nouvelle stratégie thérapeutique.

Dans le laboratoire français où j'ai effectué ma thèse, l'un des axes de recherche concerne le rôle et la pharmacologie de certains canaux ioniques présents dans les neurones spinaux impliqués dans la douleur. Plus précisément, des études menées ces dernières années principalement par Dr. *Frédéric Nagy* et Dr. *Pascal Fossat* et leurs collaborateurs ont montré que les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière présentent des propriétés intrinsèques capables d'amplifier le message afférent et qui reposent notamment sur la présence des courants ioniques calciques de type L. Ils ont montré *in vitro* chez le rat que le Wind-up : une forme de sensibilisation centrale à court terme à la douleur, dépend des propriétés d'amplifications exprimés grâce aux canaux calciques de type L présents à la membrane des neurones spinaux. D'autre part, ils ont également montré que ces canaux L peuvent être modulés positivement par l'activation des récepteurs métabotropiques du glutamate de groupe I (mGluRs I) localisés à leur tour à la membrane des neurones spinaux. En plus, ils ont mis en évidence que l'activation des mGluRs I peut augmenter brutalement la réponse neuronale en faisant passer les neurones d'un mode de décharge tonique à un mode de décharges en plateau calcium dépendant.

Un long travail d'étude de trois ans sur la douleur qui m'a permis de préparer et de réaliser la thèse dont je présente les résultats obtenus. Mon travail de thèse consiste à étudier la sensibilisation centrale à la douleur dans deux cadres différents : physiologique et pathologique. Pour la première partie de ce travail, je me suis intéressée au rôle joué par les canaux calciques de type L et particulièrement le rôle de chaque canal : Cav1.2 et Cav1.3 dans deux formes de sensibilisation à court et à long terme. Étudier le phénomène de Wind-up reste un bon exemple expérimental pour étudier la sensibilisation centrale à court terme à la douleur, puis dans le cadre de la sensibilisation à long terme, un modèle de neuropathie SNL a été choisi. Deux différentes approches ont été utilisées pour la réalisation de cette partie : une approche biologique chez l'animal *in vivo*, et une approche computationnelle. Pour la deuxième partie, l'objectif est d'abord d'étudier l'implication des canaux L dans la transmission

nociceptive spinale dans un autre modèle pathologique tel que le contexte inflammatoire, et dans un second temps d'étudier leur modulation par les récepteurs métabotropiques de groupe I (mGluRs I). Dans cette deuxième partie, l'étude a été menée chez le rat, dans deux conditions différentes : contrôles et inflammatoires.

Dans l'introduction, je vais tout d'abord aborder la notion de la douleur, ses caractéristiques, et les différents traitements disponibles avec les effets indésirables qui limitent leur utilisation, ensuite, je vais présenter les principales étapes de la transmission de l'information nociceptive, de la périphérie jusqu'à la corne dorsale de la moelle épinière, premier relai central du traitement de l'information nociceptive douloureuse, enfin, je ferai le bilan des mécanismes impliqués dans le phénomène de sensibilisation à court et à long terme. Ce manuscrit est divisé en deux chapitres, le premier concerne notre première publication (H. Radwani et *al.*, 2016 - *J. Physiol*), et le deuxième chapitre concerne la deuxième publication en préparation (H. Radwani et *al.*, 2017) que nous souhaitons la soumettre au plus tard en mois de Février 2017. Chaque chapitre inclut les objectifs de l'étude, la méthodologie, les résultats obtenus et la discussion. Pour finir, une conclusion générale rassemblera les données obtenues pour ce travail.

Sommaire

Remerciements	10
Introduction	14
I. La Douleur : Définition, Caractéristiques, Composantes, et Traitements	14
1) Définition.....	14
2) Caractéristiques.....	14
* Selon la durée.....	15
* Selon la localisation anatomique	16
* Selon la cause.....	16
* Selon la nature.....	17
* Selon le mécanisme.....	18
3) Composantes	18
* La composante sensori-discriminative	18
* La composante émotionnelle affective	19
* La composante cognitive.....	19
* La composante comportementale.....	19
4) Traitements	20
* Traitements médicamenteux.....	21
* Traitements non médicamenteux	23
II) Les voies nociceptives	25
1) La nociception, les nocicepteurs	25
2) Les afférences primaires : caractéristiques anatomiques et fonctionnelles	
* Les fibres C	26
* Les fibres A-delta.....	27
III) Les relais spinaux	28
1) La moelle épinière.....	28
2) La corne dorsale de la moelle	29
IV) La corne dorsale de la moelle épinière : un système dynamique non fixe	31
1) La sensibilisation centrale à courte terme.....	33
1) La sensibilisation centrale à long terme.....	38
* Les modèles de neuropathie.....	44
* Les modèles inflammatoires	47
V) Les canaux calciques de type L	50
1) Généralités: localisation anatomique, caractéristiques fonctionnelles.....	50

2) Les canaux L et la sensibilisation à court terme	52
3) Les canaux L et la sensibilisation à long terme	53
4) Les iso-formes des canaux calciques de type L	54
IV) Les récepteurs métabotropiques du glutamate.....	55
1) Les récepteurs métabotropiques du glutamate du groupe I	58
2) Les récepteurs métabotropiques du glutamate du groupe II.....	60
3) Les récepteurs métabotropiques du glutamate du groupe III	61
Chapitre I : Rôle de Cav1.2 et Cav1.3 dans la transmission nociceptive spinale dans les conditions contrôles et neuropathiques	63
I) Objectifs	64
II) Matériel et Méthodes.....	66
1) Animaux et conditions d'hébergement.....	67
2) Immunohistochimie	68
3) Approche computationnelle	69
* Principe/Objectif	69
* Protocole.....	69
4) Pharmacologie.....	72
5) La stratégie anti-sens	72
6) Étude électrophysiologique : l'enregistrement extracellulaire <i>in vivo</i> ...74	
* La Dissection.....	74
* Le protocole de Wind-up: Enregistrement du Wind-up des neurones spinaux WDR.....	74
7) Étude électromyographique.....	75
*Le protocole de Wind-up: Enregistrement du Wind-up du réflexe de flexion	76
8) Analyse de l'expression de l'ARNm par la technique de la Réaction en Chaîne par Polymérase (PCR).....	76
* Extraction d'ARN et Rétrotranscription (RT).....	76
* PCR quantitative (qPCR)	77
* Analyse des résultats de la qRT-PCR.....	78
9) Étude comportementale : test de Von Frey	78
10) La procédure pour l'injection des molécules anti-sens.....	80
11) La procédure pour le modèle de neuropathie	80
12) Analyse statistique	80
II) Résultats	82
1) Cav1.3 est essentiel pour le Wind-up : approche computationnelle	83
2) Le Wind-up du réflexe de flexion est équivalent chez l'adulte et le jeune rat.....	89

3) Validation du knockdown de Cav1.2 et Cav1.3 : étude immuno-histochimique (Immunofluorescence) et biochimique (RT-PCR)	92
4) L'implication de Cav1.3 sur l'expression de Wind-up <i>in vivo</i>	94
5) Diminution de l'amplitude de Wind-up dans les conditions neuropathiques est Cav1.3 expression –dépendant.....	96
6) Les Potentiels de Plateau et Wind-up dans la douleur neuropathique ...	101
IV) Discussion.....	104

Chapitre II : Rôle des récepteurs métabotropiques du glutamate de groupe I dans la transmission nociceptive spinale dans un modèle d'inflammation à la CFA.....

I) Objectifs	113
---------------------------	------------

II) Matériel et Méthodes.....	115
--------------------------------------	------------

1) Animaux et conditions d'hébergement	116
2) Préparation des animaux pour l'électrophysiologie	116
* L'anesthésie et maintien de l'animal	116
* La dissection.....	116
3) L'électrophysiologie	117
* Techniques d'enregistrement	116
* Mise en place de l'électrode de stimulation.....	116
4) Les injections intrathécales	117
* Mise en place de l'électrode.....	117
5) Pharmacologie : les drogues utilisées.....	119
6) Modèle d'inflammation.....	120
7) Étude comportementale.....	120
8) Analyse de l'expression de l'ARNm par la technique de la réaction en Chaîne par polymérase (PCR).....	120
9) Analyse de l'expression protéique par Western-Blot.....	121
10) Analyse statistique.....	123

III) Résultats	125
-----------------------------	------------

1) L'effet nociceptif de l'activation des récepteurs métabotropiques glutamatergiques de groupe I (mGluRs I) dépend des canaux calciques de type L chez les animaux naïfs.....	126
2) L'injection intrathécale de l'1S, 3R-ACPD induit un comportement nociceptif chez les animaux naïfs.....	128

3) L'effet anti-nociceptif dû à l'activation des récepteurs métabotropiques glutamatergiques de groupe I (mGluRs I) est indépendant des canaux calciques de type L chez les animaux enflammés.....	129
4) L'injection intrathécale de l'1S, 3R-ACPD induit un comportement anti-nociceptif chez les animaux enflammés	131
5) L'effet contradictoire de l'activation de mGluRs I : d'où vient-il ?	134
6) L'effet anti-nociceptif de l'activation de mGluRs I passerait par un réseau neuronal inhibiteur : quel (s) récepteur (s) et par quel (s) mécanisme (s) cet effet?.....	135
IV) Discussion.....	141
V) Conclusion générale	148
Liste des abréviations	150
Liste des figures et tableaux.....	152
Références bibliographiques.....	154
Références électroniques	168
Résumé.....	169
Abstract	171
Productions scientifiques.....	173
Article 1: Cav1.2 and Cav1.3 L-type calcium channels independently control short- and long-term sensitization to pain	176
Article 2: mGluRs I activation switch the control of spinal nociceptive transmission after peripheral inflammation in the rat.....	179
Revue 1: Calcium-dependant intrinsic properties in spinal nociceptive transmission	178

Remerciements

Honorée de leur présence, je souhaite remercier vivement les membres de mon jury de thèse pour leur disponibilité, et d'avoir accepté d'évaluer et de juger ce travail :

Monsieur **Ali Ouarrou**, professeur d'enseignement supérieur à l'Université Abdelmalek Essaâdi, Faculté des Sciences de Tétouan (Maroc), d'avoir accepté de participer à cette soutenance et de présider le jury de soutenance.

Monsieur **Mohammed Bennis**, professeur à l'Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia de Marrakech (Maroc), et Monsieur **Francisco Olucha Bordonau**, professeur à l'Université Jaume I (Castéllon, Espagne), d'avoir accepté d'être rapporteurs externes de ma thèse et de juger le présent travail. Je tiens à les remercier tous les deux pour leur analyse poussée et très pertinente de mon travail.

Je tiens aussi à exprimer mes remerciements à Madame **Seloua El Ouezzani Taybi** professeur d'enseignement supérieur à l'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Faculté des Sciences de Fès (Maroc) d'avoir accepté cette tâche lourde pour examiner ce travail.

Un immense merci à mon Directeur de Thèse Monsieur **Pascal Fossat**, Maître de conférences à l'Université de Bordeaux (Bordeaux-France). Je voudrais le remercier chaleureusement pour son soutien, son encouragement, pour la confiance et la liberté qu'il m'a accordées tout au long de ces trois années de thèse qui ont été stimulantes et m'ont permis de m'épanouir scientifiquement au travers de cette thèse. Travailler à ses côtés, était une expérience agréable et enrichissante pour moi. C'était avec un grand plaisir de

travailler à côté de lui...je lui resterai reconnaissante, espère que nous aurons l'opportunité de retravailler ensemble dans le futur.

Un immense merci également à Monsieur **Mohammed Errami**, Professeur à l'Université Abdelmalek Essaâdi, et Doyen de la Faculté des Sciences de Tétouan (Maroc) qui a encadré ma thèse. Je le remercie d'avoir cru en mes capacités, pour la confiance qu'elle m'a accordée, et pour l'intérêt permanent qu'il a porté à ce travail. Je lui resterai reconnaissante, espère que nous aurons l'opportunité de retravailler ensemble dans le futur.

Je tiens aussi à adresser mes sincères remerciements à Monsieur **Marc Landry**, directeur du laboratoire Français: "Mécanismes Centraux de la Sensibilisation à la Douleur" : CNRS U 5297 - IINS, Professeur à l'Université de Bordeaux (Bordeaux-France), et coordinateur du Master International "Euro-méditerranéen en Neurosciences et Biotechnologies" que j'avais fait, pour m'avoir offert l'opportunité de rejoindre son équipe en m'accueillant pour mes études doctorales. Merci pour tous ses conseils scientifiques, son encouragement, son soutien scientifique, et pour son soutien expérimental surtout pour la première partie de ce travail. C'était avec grand plaisir de faire un Master de Neurosciences qu'il dirige et travailler au sein de son équipe. J'espère d'avoir une autre opportunité pour retravailler ensemble.

Vivement, je souhaite remercier les personnes avec qui j'ai collaboré, pour leur expertise, leur rigueur scientifique, et leur aide expérimental :

Mdm. Emelía Eiríksdóttir (l'Université de Stockholm, Stockholm, Suède)

Mr. Ülo Langel (l'Université de Stockholm, Stockholm, Suède)

Mdm. Rabia Benazzouz (l'Institut Interdisciplinaire de Neurosciences (l'IINS) - France)

Mr. Olivier Roca-Lapirot (l'Institut Interdisciplinaire de Neurosciences (l'IINS) - France)

Mr. Alexandre Favereaux (l'Université de Bordeaux- l'IINS - France)

Mdm. Maria José Lopez-Gonzalez (l'Université de Bordeaux- l'IINS - France)

Mr. Daniel Cattaert (l'Université de Bordeaux- l'Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine (l'INCIA)- France)

Mr. Eric Dobremez (l'Hôpital Universitaire de Bordeaux-France)

Je voudrais également remercier Madame **Christel Boudet**, Professeur à l'Université de Bordeaux (Bordeaux, France), et Madame **Amira Zaky**, Professeur à l'université d'Alexandrie (Alexandrie, Egypte), et Monsieur **Le Feuvre Yves** chercheur au CNRS U 5297, l'IINS, pour leur sympathie, leurs conseils et leurs discussions scientifiques.

Mes sincères remerciements vont également à Madame **Meftaha Senhaji**, Professeur à l'Université Abdelmalek Essaâdi, Faculté des Sciences de Tétouan (Maroc), et Madame **Nisrin EL Mlili**, Docteur à l'Institut Supérieur des Professions Infirmières et Techniques de Santé - Rabat (Maroc), pour leurs encouragements, leur sympathie, leurs conseils et les discussions scientifiques et moins scientifiques que l'on a pu avoir.

Enfin, merci aussi à mes collègues du laboratoire pour la bonne ambiance et à qui je souhaite bon courage et bonne continuation : **Franck Aby, Otman Bouchatta, Sébastien Benquet, Charline Kambrun, Anais Soula, et João Covita**

Aux organisateurs financiers:

La réalisation de ce travail n'aurait pu se faire sans la présence d'un soutien financier. Dans ce cadre, je dois remercier chaleureusement le programme qui a rendu possible ma thèse par son soutien financier : **'Erasmus Mundus Green IT'**, pour réaliser une partie de mes études doctorales à l'université de Bordeaux (Bordeaux-France). Ce programme est géré par **l'Université de Vigo (Vigo, l'Espagne)**.

Je voudrais aussi remercier *“la Société Française des Neurosciences”*, de m’avoir accordé un **“Soutient Etudiant”** qui m’a permis de présenter mes travaux de thèse au **Congrès International de Neurosciences**, organisé par *“la Fédération Européenne de Sociétés de Neurosciences”*, hébergé par *“la Société Danoise de Neurosciences”*, et qui s’est tenu en Juillet 2016 à Copenhague (**Danemark**).

Mes remerciements je les adresse également au programme **“YITP” (Young Investigator Training Programme)**, organisé par *“la Fédération Européenne de Sociétés des Neurosciences”* d’avoir me donner l’opportunité d’effectuer un séjour de recherche de dix jours à l’**Université de Copenhague (Copenhague, Danemark)**: Faculté de Santé et Sciences Médicales, Département : Neurosciences et Pharmacologie, Laboratoire : *“la Signalisation Neuronale”* dirigé par le professeur **Jean-François Perrier**. Je le remercie de m’avoir accueilli dans son laboratoire. C’était une expérience très agréable et enrichissante.

Merci aussi à l’école doctorale *“Sciences de la Vie et de la Santé”* attachée à l’université de Bordeaux de m’avoir accordée une aide financière pour réaliser un stage d’une semaine enrichissant **“Doctoriales - session 2015”** en juillet 2015 à l’université de Paris-Sud, (**Paris, France**)

À mes parents :

Je dois remercier très chaleureusement *mes parents* auxquels je suis tellement fière. Mes parents qui m’ont toujours et encore supportée dans les moments difficiles au cours de mes études. Merci d’avoir toujours été là pour moi, et ce malgré mon manque chronique de disponibilité. Un grand merci pour m’avoir soutenue dans la réalisation de ce travail. Je tiens à exprimer ma plus profonde reconnaissance à eux.

À TOUS,

MERCI

INTRODUCTION

I) La Douleur : Définition, Caractéristiques, Composantes, et Traitements:

1) Définition :

La douleur est définie comme “une sensation personnelle et intime de mal, un stimulus nociceptif qui signale une lésion tissulaire, un schéma des réactions destinées à préserver l’organisme du mal” (Sternbach, 1968), ou encore comme “une expérience sensorielle provoquée par des stimuli qui lèsent les tissus ou menacent de les détruire, expérience définie par chacun comme ce qui fait mal”(Mountcastle, 1980). Selon l’Association International pour l’Etude de la Douleur (International Association for the Study of Pain : IASP), elle est définie comme “une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite en des termes évoquant une telle lésion”. Il s’agit donc d’une expérience subjective, complexe mettant en jeu des processus biopsychosociaux, et intégrant à la fois une composante sensorielle, physique, et émotionnelle. La douleur est le premier motif de la consultation médicale.

2) Caractéristiques:

La douleur peut être classée selon les caractéristiques suivantes :

- **Selon la durée :**

Elle dure des secondes comme elle peut très bien durer des années. On peut distinguer principalement deux types de douleurs selon la durée de la sensation :

a) Douleur aiguë:

Elle peut durer des secondes, des minutes, des heures, voire quelques jours. Elle a un intérêt physiologique protecteur car elle joue le signal d’alarme pour

le corps, elle est transitoire, temporaire, nécessaire, et de caractère symptomatique.

b) Douleur chronique:

Elle se caractérise par sa longue durée : des mois (plus de trois mois) voire des années (Fink, 2000). Elle n'a pas un rôle de protection ni de signal d'alarme, elle devient une maladie (Croft, 2003). Elle est généralement associée à une dégénérescence des tissus ou à des maladies chroniques (arthrose, cancer) et ne s'améliore pas avec le temps (Fink, 2000; Gebhart, 2009). Elle affecte 1,5 milliards des personnes dans le monde, et il a été estimé que 100 millions d'entre eux vivent aux États-Unis (Borsook, 2012).

- **Selon la localisation anatomique:**

On distingue les douleurs selon le territoire affecté : les douleurs articulaires (arthrite, arthrose,...) localisés au niveau des articulations, les douleurs viscérales (douleurs qui touchent les organes internes de corps (troubles de la motilité gastro-intestinale,...)), les douleurs neuropathiques qui affectent le système nerveux central et/ou périphérique.

- **Selon la cause:**

Les causes qui peuvent initier et/ou maintenir une douleur varient d'une personne à l'autre. La douleur physique peut avoir des facteurs génétiques, environnementaux (stress, problèmes sociaux,...), ou encore suite à une intervention chirurgicale ou conséquence d'une maladie (Gebhart, 2009).

- **Selon la nature:**

Le stimulus déclencheur de la douleur peut être de différente nature : thermique, mécanique, ou chimique. Pour chaque type de stimulus, il existe des récepteurs spécifiques pour le capter (figure1) : des récepteurs au chaud : TRPV1-3 (Transient receptor potentialvanilloid), et TREK1 (Potassium channel subfamily K1) et au froid via TRPM8 (Transientreceptor potential

cation channel subfamily M8) ; des récepteurs aux acides: viaASIC (Acid-sensing ion channel), TRPV1, et DRASIC; et des récepteurs aux stimulimécaniques via MDEG, DRASIC, et TREK1. Noter que la majorité de ces récepteurs font partis de la famille des TRP : récepteurs à six domaines transmembranaires regroupés en tétramères, perméables aux ions Ca^{2+} et Na^+ . Certains récepteurs sont polymodal, c'est-à-dire sensibles à la fois à la chaleur et à la Capsaïcine (substance extraite des piments rouges, responsable de la sensation de brûlure) et à un pH acide (Caterina et al., 1999), c'est le cas de récepteurs TRPV1. Les récepteurs TRPM8 s'activent à des températures basses (8°C - 28°C) et par des substances donnant la sensation de froid comme le Menthol. Les récepteurs DRASICs/ASICs s'activant à un pH acide, notamment dans le cadre de l'inflammation (Wemmie et al., 2006). Enfin, les récepteurs TREK1, répondant aux stimuli de type mécaniques, et thermiques.

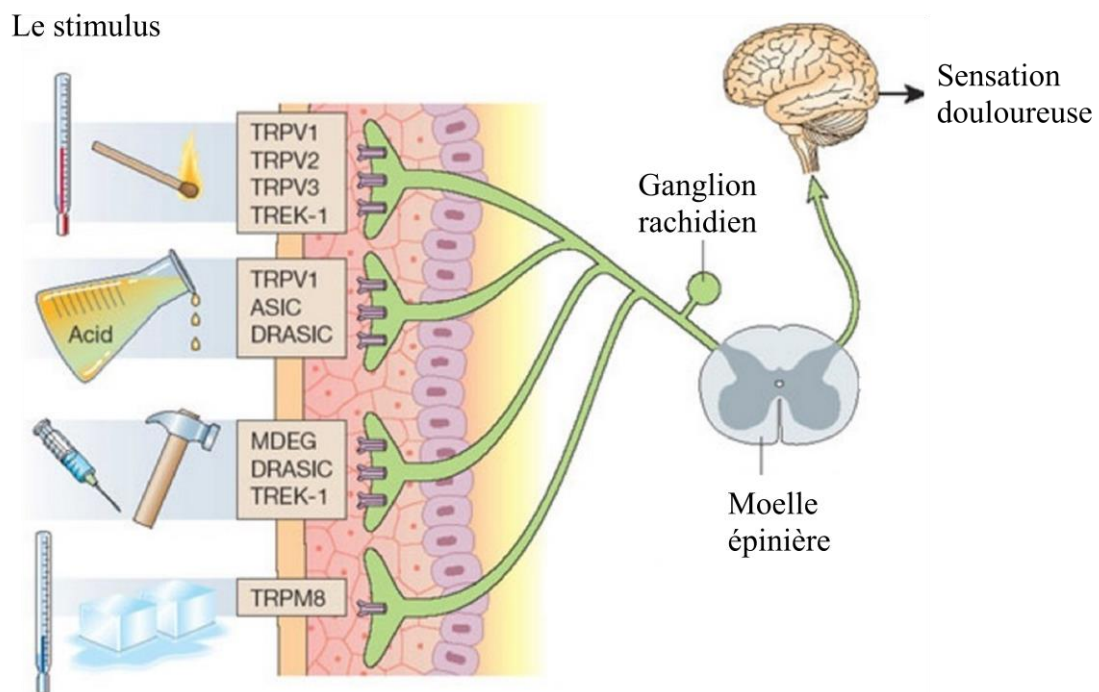


Figure 1 : Les différents récepteurs aux stimuli nociceptifs et transduction du signal. Les stimuli nociceptifs sont convertis en activité électrique à la périphérie des terminaisons des fibres amyéliniques de type C ou faiblement myélinisées de type A-delta, par des récepteurs spécifiques ou des canaux ioniques sensibles à la chaleur, aux stimuli mécanique, aux protons, ou au froid (Scholz, 2002).

- **Selon le mécanisme:**

Nous distinguons trois types selon le mécanisme physiopathologique. i) Les douleurs inflammatoires : où le stimulus nociceptif est intense et prolongé conduisant à des dommages tissulaires, ii) neuropathiques : définies selon l'IASP comme "une douleur causée par une lésion ou un dysfonctionnement du système nerveux", la lésion peut siéger au niveau du nerf périphérique, du ganglion rachidien, ou du système nerveux central, et iii) idiopathiques : douleurs chroniques qui restent médicalement inexplicables (Pionchon, 2006). Notre étude concernera particulièrement les deux premiers types de douleur : inflammatoire et neuropathique.

Le clinicien doit être à l'écoute de la description de la sensation douloureuse (topographie anatomique, variation de l'intensité de la douleur selon certains facteurs, évolution dans le temps,...) par le patient, une étape cruciale afin de planifier l'intervention médicamenteuse ou non médicamenteuse la plus adaptée avec le moins d'effets indésirables (Boureau, 1999; Richardson, 1999).

3) Composantes:

La sensation de la douleur varie d'une personne à l'autre. Décrire les composantes de la douleur c'est comprendre à quel point la douleur reste subjective et complexe, ce qui permet également d'expliquer pourquoi une personne supporte différemment la douleur selon les différentes périodes de sa vie, son passé, son humeur. Elle se caractérise par les composantes suivantes (Wrobel, 2003) (figure 2):

- **La composante sensori-discriminative:**

Cette composante permet de décoder la durée, l'intensité et la localisation anatomique.

- **La composante émotionnelle affective:**

Elle fait partie de l'expérience douloureuse et peut se prolonger vers des états psychiques tels que l'anxiété, l'angoisse et la dépression. Elle exprime l'affect que le patient associe à sa douleur, et est déterminée non seulement par le stimulus douloureux lui-même, mais aussi par le contexte dans lequel ce stimulus est appliqué (Wrobel, 2003).

- **La composante cognitive:**

Le malade donne un intérêt à sa douleur. Cet intérêt varie selon son attention, son interprétation, ses références à des expériences douloureuses vécues personnelles ou observées, ses anticipations.

- **La composante comportementale:**

Ce sont les manifestations verbales et non verbales de la personne qui souffre : cris, pleurs,... Elle représente l'ensemble des actes du sujet qui souffre de la douleur.

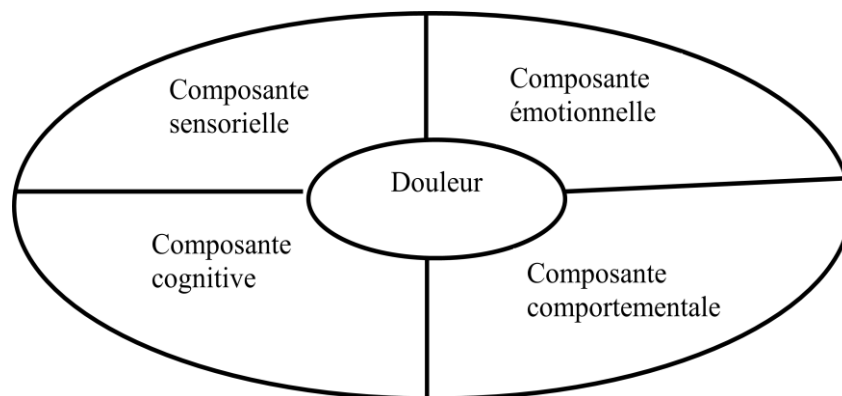


Figure 2 : Les quatre composantes de la douleur

4) Traitements de la douleur :

La capacité de quantifier l'intensité de la douleur ressentie est essentielle afin de choisir le traitement le plus approprié pour le patient. Au plan clinique, il a été adopté une échelle universelle allant de 0 (pas de douleur) à 10 (douleurs très intenses intolérables) pour l'évaluation clinique de l'intensité de la douleur

chez les patients (figure3) (Dalton, 1998). En utilisant cette échelle, une valeur fixée par le patient reflète l'intensité de la douleur ressentie, ce qui peut aider le clinicien à choisir le traitement le plus approprié, à suivre l'évolution de l'intensité de douleur ressentie au cours du temps (par exemple : avant et après une intervention chirurgicale), et même à prendre en considération les facteurs qui peuvent soulager/aggraver cette intensité pour le patient. Elle est facilement comprise par les enfants. Elle est utilisable à partir de l'âge de trois ans.

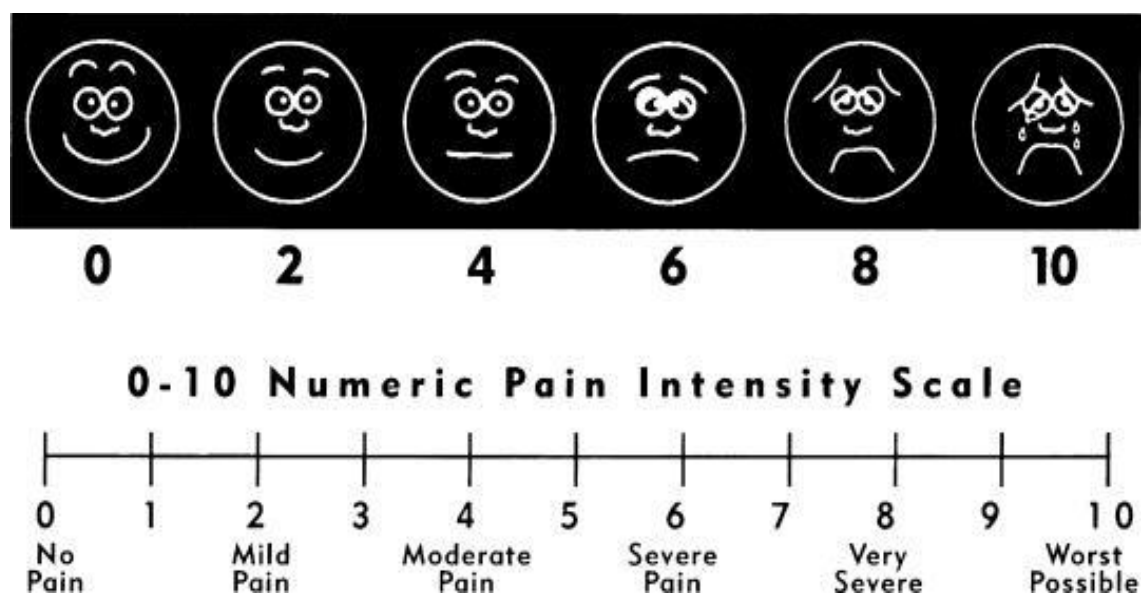


Figure 3 : L'échelle allant de 0 jusqu'à 10 représente les différentes intensités de douleur qui peuvent être ressentie : faible, modérée, sévère ou encore insoutenable (Fink, 2000)

Selon l'intensité de la sensation douloureuse, une palette thérapeutique adaptée a été établie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en fonction de cette intensité. Le profil actuel de traitement inclut des interventions pharmacologiques, et non pharmacologiques.

- **Traitements médicamenteux :**

Pour des intensités légères à modérées, des traitements comme le Paracétamol, et les anti-inflammatoires sont utilisés. Dans le traitement des douleurs qui accompagnent les syndromes grippaux et la fièvre, le paracétamol est utilisé en respectant les contres indications. Cette substance peut induire des effets graves, en cas d'atteinte hépatique préalable par exemple, et s'il est utilisé à dose élevée, le paracétamol peut donner des lésions hépatiques graves (Rumack, 1986). Les anti-inflammatoires sont aussi indiqués pour des intensités douloureuses légères à modérées. Dans le cadre de douleur aiguë, les anti-inflammatoires comme l'Ibuprofène ou le Diclofénac sous forme effervescente sont préférables, car ils ont un délai d'action court et une élimination rapide. Dans le traitement des douleurs inflammatoires chroniques, sont utilisés surtout des substances puissantes avec une demi-vie d'élimination longue, comme les Oxicams. À noter qu'il y a un risque d'atteinte du tractus digestif et de la fonction rénale avec ce type de traitement.

La morphine, agoniste des récepteurs opioïdes mu (μ), delta (δ) et kappa (κ). Cet alcaloïde et ses dérivés (Fentanyl, Sufentanil,...) sont utilisés la plupart du temps dans le cadre des traitements des douleurs postopératoires. Mais malgré son puissant effet analgésique, la présence des récepteurs opioïdes dans d'autres zones du système nerveux entraîne des effets secondaires limitant son utilisation tels que : dépression respiratoire, rétention d'urine, vertige, vomissement...L'administration répétée régulière des morphiniques peut entraîner une tolérance, définie comme la nécessité d'augmenter les doses pour obtenir les mêmes effets, cette tolérance apparaît quand le corps s'habitue au médicament et celui-ci est moins efficace. Dans des modèles expérimentaux, il a été montré que la tolérance peut apparaître rapidement, en quelques jours (Sosnowski, 1990). La même constatation a été notée chez l'homme (Shaffer, 1983).

Une autre classe de traitements médicamenteux sont les antidépresseurs tricycliques et les antiépileptiques (Gabapentine, Prégabaline). Dans le cadre

de douleurs chroniques neuropathiques par exemple, ces traitements constituent les traitements de références (Finnerup et al., 2005; Attal et Bouhassira, 2006; Mico et al., 2006; Dworkin et al., 2007). Plusieurs de ces traitements ont une autorisation de mise sur le marché dans cette indication, bien qu'on trouve une diminution des douleurs plutôt qu'une disparition chez les sujets répondeurs. Les antidépresseurs agissent en bloquant la recapture des monoamines (sérotonine, noradrénaline) permettant de renforcer les contrôles inhibiteurs, mais, ils sont également capables de bloquer des canaux sodiques et des récepteurs excitateurs (NMDAR par exemple). Il est intéressant de noter que l'effet antalgique de ces traitements est indépendant de leur effet antidépresseur (Mico et al., 2006). Globalement, jusqu'à 60 % des patients trouvent une amélioration de leur douleur (Sindrup, 1991; McQuay et al., 1996). Cependant, ces traitements possèdent des effets secondaires indésirables qui peuvent limiter leur utilisation comme par exemple : la sécheresse buccale, constipation, somnolence, troubles de la miction,... De plus, il n'est pas utilisable chez les patients qui ont des problèmes cardio-vasculaires. Concernant les traitements antiépileptiques, nous distinguons trois types selon le mécanisme d'action. Le premier agit sur les canaux calciques afin de réguler négativement l'excitabilité neuronale. Des antiépileptiques qui agissent préférentiellement sur la sous-unité alpha2 gamma des canaux calciques de type N est bien documenté dans le cadre de douleurs neuropathiques (Dworkin et al., 2007 ; Hendrich et al., 2008). Cependant, leur effets secondaires restent non-négligeables (somnolence, impression vertigineuse, prise de poids,...). Pour le deuxième type, il s'agit des antiépileptiques qui bloquent des canaux sodiques voltage dépendants afin de diminuer l'excitabilité et qui présentent également des effets indésirables. Le dernier type sont des traitements qui agissent sur la transmission GABAergique. Le neurotransmetteur inhibiteur GABA jouant un rôle crucial dans la transmission nociceptive. Le traitement sert à potentialiser les effets de GABA en prolongeant sa durée de vie dans l'espace synaptique, et à augmenter son synthèse par une diminution de son métabolisme. Enfin, il convient de noter que les douleurs chroniques de type

neuropathiques répond habituellement mal aux opioïdes (Fields, 1988), et anti-inflammatoires (Arner et Meyerson, 1988).

Il est intéressant de noter dans le cadre des douleurs chroniques, qu'une combinaison médicamenteuse est envisagée afin de trouver un maximum de soulagement pour le patient. Cela signifie la faible efficacité de chaque traitement. Malheureusement, des effets secondaires indésirables sont également présents qui limitent l'utilisation du tel ou tel traitement. Il est crucial alors de continuer à améliorer les connaissances du système nociceptif, et de décrypter la complexité des systèmes mis en jeu lors du développement de la sensation douloureuse, notamment au niveau spinal, premier relai central d'intégration de l'information douloureuse, dans l'espoir de trouver d'autres substances à la fois efficace avec le moins d'effets secondaires indésirables.

- **Traitements non médicamenteux :**

Pour certaines douleurs chroniques rebelles, il arrive parfois qu'on soit obligé d'utiliser d'autres thérapeutiques comme la neurostimulation, et la neurochirurgie. Le but de la neurostimulation est de soulager la douleur sans créer la moindre lésion ou agression du système nerveux. La neurostimulation (Cruccu et al., 2007) à visée analgésique repose sur le principe suivant : en stimulant les fibres tactiles A-bêta (stimulation électriques sur la peau dans un territoire sous-jacent au territoire douloureux) de gros calibre, on amplifie au niveau spinal, l'inhibition du message douloureux transmis par les fibres nociceptives A delta et C (théorie du portillon). Ce modèle fait intervenir un système inhibiteur spinal. Autrement dit, la stimulation des fibres non nociceptives A-bêta, va activer les neurones inhibiteurs locaux qui vont inhiber à la fois les fibres nociceptives et les neurones relais et donc réduire la sensation douloureuse.

Autre approche non médicamenteuse est la neurochirurgie. Le principe est d'interrompre la transmission du message douloureux à différents niveaux du système nerveux central. Cette approche n'a quasiment plus aucune place dans

le traitement des douleurs neuropathiques, à l'exception des techniques de DREZotomie (Doral Root Entry Zone) qui consistent en une destruction sélective des corps cellulaires des neurones nociceptifs périphériques.

Il est important de noter que pour des nombreuses personnes souffrant de douleurs chroniques, la douleur est seulement un aspect de leur fardeau. Assez récemment, des études cliniques menées chez l'homme ont montré que la douleur chronique a des conséquences à long terme néfastes en plus de la douleur ressentie elle-même. Il a été montré que les patients douloureux vivent dans un état d'anxiété et de dépression importantes, avec des déficits sur le fonctionnement cognitif (Munoz et Esteve, 2005; Miller LR, 2009). Des difficultés de concentration ou de mémorisation (McCracken et Iverson, 2001; Park et al., 2001; Glass et al., 2005 ; Munoz et Esteve, 2005 ; Veldhuijzen et al., 2006), et des problèmes sur la capacité à prendre des décisions (Apkarian et al., 2004 ; Verdejo-Garcia et al., 2009; Walteros et al., 2011) ont été également marqués. Ces données indiquent qu'il existe une relation directe entre la douleur chronique et les capacités cognitives. En plus, il a été montré que le mode de vie du patient, son environnement, et ses interactions sociales peuvent affecter sa perception à la douleur. À cause de leur nature chronique, les douleurs chroniques s'accompagnent souvent d'un stress, d'anxiété, et d'angoisse. Le traitement de ces symptômes participe grandement à la prise en charge de ces douleurs. La pratique d'activités comme le Yoga par exemple, et/ou la méditation ont des effets positifs sur la dépression et l'anxiété associées à ces douleurs chroniques (Wren et al., 2011 ; Bussing et al., 2012). Les thérapies cognitives ou comportementales ont aussi des effets positifs sur l'amélioration de la qualité de vie des patients, probablement par la réduction du stress, de l'anxiété et de la dépression. Le soutien social joue également un rôle important sur la douleur ressentie (Macdonald, 2005).

II) Les voies nociceptives :

1) La nociception, Les nocicepteurs:

Le terme de "Nociception" a été introduit par Sherrington en 1906 (Sherrington, 1906) afin de décrire la détection des stimuli nocifs par des "nocicepteurs". La nociception est le processus par lequel un stimulus nocif (thermique, chimique, ou mécanique) est détecté par les nocicepteurs (Basbaum, 2000). Les stimuli nociceptifs activent des récepteurs spécifiques appelés "nocicepteurs" (Whitehorn et Burgess, 1973). La nociception constitue ainsi un signal d'alarme utile aboutissant à un ensemble des réflexes ou des comportements protecteurs tels que le réflexe de retrait vis-à-vis d'un stimulus externe (Vibert, 2005). Elle n'intègre pas le ressenti psychologique.

Sous la peau par exemple, on trouve un ensemble des récepteurs servant à percevoir les différentes modalités tactiles. Les corpuscules de Meissner, de Pacini, de Ruffini et les disques de Merkel sont des récepteurs reliés à des fibres afférentes de gros diamètre A-bêta myélinisés responsables au transfert de l'information tactile non nociceptive (Jankowski et Koerber, 2010). On trouve également un autre type de récepteurs spécialisés dans la détection des stimuli nocifs appelés : "Nocicepteurs". Notre réponse aux stimuli nécessite la présence de ces Nocicepteurs (Cavanaugh et al., 2009). Ce ne sont pas des structures individualisées, mais ils sont sous forme de terminaisons arborisées libres (Figure 4) des fibres nerveuses sensibles trouvés dans tout l'organisme (sauf dans le système nerveux central) : au niveau de la peau, des muscles, des articulations et les viscères. Sur la peau par exemple, la densité de ces récepteurs compte en moyenne un minimum de 6000/cm², ils sont répartis d'une façon homogène ce qui permet une bonne localisation de la douleur, ce qui n'est pas le cas pour les organes en profondeur, d'où la difficulté à localiser de façon précise une douleur interne.

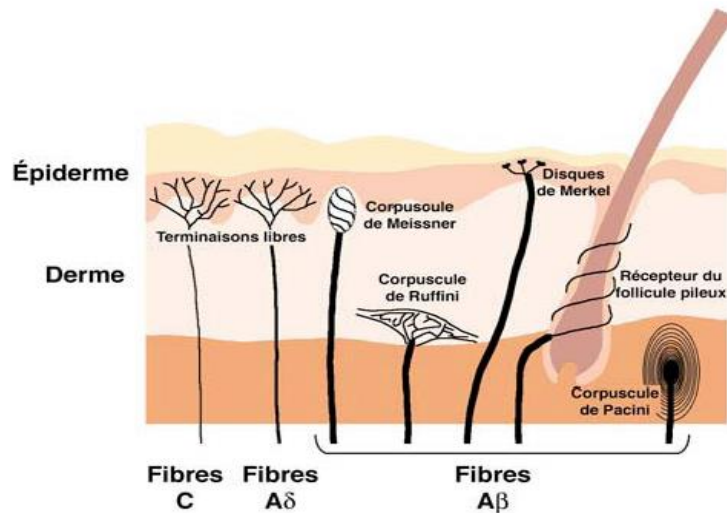


Figure 4 : les différents capteurs sensoriels cutanés

Ces récepteurs sont polymodaux : ils sont sensibles à différents types de stimulations : chimiques, mécaniques, thermiques (figure 1). Ils s'activent lorsque l'intensité de stimulus dépasse le seuil de leur activation. Leur corps cellulaire est situé dans le ganglion spinal dorsal (DRG).

On distingue deux grands types de nocicepteurs selon le type des fibres nerveuses sensibles périphériques : ceux associés aux fibres de type A-delta et ceux associés aux fibres de type C. Ces fibres afférentes primaires peuvent être classées selon : la vitesse de conduction liée à la myélinisation, des propriétés de réponse (l'intensité du stimulus nécessaire pour les activer) et le phénotype neurochimique (libération des substances chimiques).

2) Les afférences primaires: caractéristiques anatomiques et fonctionnelles:

- **Les fibres C :**

Il s'agit des fibres non myélinisées, de petit diamètre, véhiculant lentement (de 0,5 à 2 m/s) l'information depuis la périphérie jusqu'à la corne dorsale de la moelle épinière (Jankowski et Koerber, 2010). La caractérisation fonctionnelle de ce type des fibres est principalement basée sur la valeur de leur seuil d'activation : elles ont un haut seuil d'activation, impliquées dans la

transmission d'une douleur lente, diffuse, intense. Elles sont polymodales c'est-à-dire capables de détecter à la fois des stimuli mécaniques, chimiques et thermiques (Bessou et Perl, 1969 ; Cavanaugh et al., 2009 ; Taguchi et al., 2015). Noter également qu'il existe une sous population de ces fibres, insensible aux stimuli chimiques et à la chaleur, et sensible à des stimulations mécaniques très légères au niveau de la peau et semble transmettre un message nerveux associé au toucher (C-LTMRs) (Olausson et al., 2010).




D'un point de vue neurochimique, ces fibres C non myélinisées peuvent être divisées en deux groupes : les fibres C peptidergiques qui libèrent en particulier deux neuropeptides : la substance P et le Calcitonin-gene related peptide (CGRP) (Battaglia et Rustioni, 1988 ; Lawson et al., 1997), et les fibres C non-peptidergiques, qui n'utilisent pas les neuropeptides mais uniquement le Glutamate comme neurotransmetteur (Snider, 1998 ; Braz et al., 2005). Les fibres C non-peptidergiques sont principalement associées avec la peau, où elles innervent l'épiderme, alors que les fibres peptidergiques innervent les différents autres tissus comme les régions profondes de la peau. Ces différences suggèrent que ces fibres possèdent des fonctions différentes.

- **Les fibres A-delta :**

Ces fibres sont moyennement myélinisées, présentant une vitesse de conduction du message moins lente (12-30 m/s) que les fibres C. Ce type des fibres sont divisées principalement en deux groupes en fonction de leurs réponses à des stimuli : les fibres A- δ de type I, répondent préférentiellement à des intenses stimuli de type mécaniques, mais aussi aux stimuli chimiques, et à des hautes températures (>50°C), et les fibres A- δ de type II, répondent préférentiellement aux stimuli thermiques nocifs en plus des stimulations mécaniques (Basbaum et al., 2009; Dubin et Patapoutian, 2010).

À noter qu'il existe un type des fibres nommées : les fibres A-bêta, non nociceptives, se caractérisent par un gros diamètre, fortement myélinisées, transmettant rapidement l'information non nociceptive. Cependant, ils sont

fondamentales dans le circuit nociceptive parce qu'ils participent dans les mécanismes de la suppression segmentale (Millan, 1999).

Les Fibres	A-bêta	A- δ	C
Les Caractéristiques			
	Gros \emptyset	moyen \emptyset	petit \emptyset
	Largement myélinisés	Moyennement myélinisés	Non myélinisés
	30-100 m/s	12-30 m/s	0,5-2 m/s
Sensibilité non nociceptive	Sensibilité nociceptive	Sensibilité nociceptive	

Le tableau récapitule les différentes caractéristiques des fibres nociceptives: les fibres C, et A- δ , et non nociceptives les fibres A-bêta.

III) Les relais spinaux:

1) La moelle épinière:

La moelle épinière correspond à la partie du système nerveux central qui se trouve en dessous du tronc cérébral (figure 5). C'est un cordon de tissu nerveux situé dans le canal vertébral. En faisant une coupe transversale (figure 5), on peut distinguer deux principales régions: la substance blanche, localisée en périphérie, qui contient l'ensemble des faisceaux d'axones ascendants (de la moelle vers le cerveau) et/ou descendants (du cerveau vers la moelle), et la substance grise, en forme de papillon (Rexed, 1952 ; Dubner et Bennett, 1983; Besson et Chaouch, 1987; Willis, 1991), contenant les neurones et les cellules gliales.

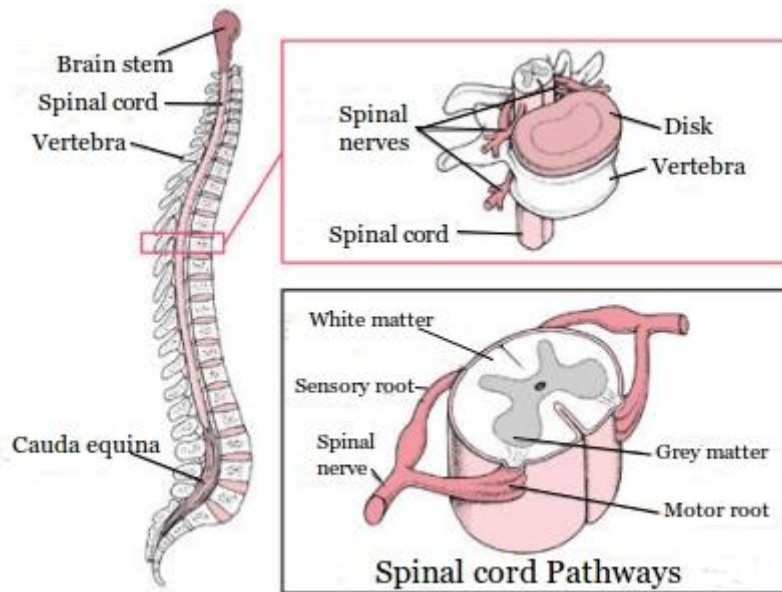


Figure 5 : à gauche, le canal vertébral contenant la moelle épinière, à droite : coupe transversale de la moelle épinière (Spinal Cord Injury: Hope Through Research, National Institute of Neurological Disorders and Stroke. 2012)

2) La corne dorsale de la moelle épinière:

Les afférences primaires sensibles projettent dans la corne dorsale de la moelle épinière (Basbaum, 2000). Cette région est le premier site de traitement de l'information nociceptive (Besson et Chaouch, 1987) (figure 6). Cette corne dorsale est organisée sous forme de dix couches/lamina superposées (Rexed, 1952), différentes d'un point de vue du type cellulaire qu'elles contiennent. On distingue principalement deux catégories des neurones : les premiers sont « les neurones nociceptifs spécifiques » essentiellement localisés dans les couches superficielles, les seconds sont « les neurones à convergence ou neurones à large gamme réceptive (WDR : wide dynamic range) », localisés dans les couches profondes. Les couches superficielles I et II externe reçoivent les afférences par les fibres A-delta de type II et les fibres C peptidergiques, alors que la couche II interne reçoit les afférences C de type non-peptidergiques (Basbaum et al., 2009) (figure7). Noter que la couche II contient aussi des interneurones qui peuvent être divisés en deux classes : excitateurs et inhibiteurs. Les interneurones inhibiteurs utilisent le neurotransmetteur GABA

et/ou Glycine comme neurotransmetteur (s) (Todd, 2010), alors que les inter-neurons excitateurs utilisent le Glutamate. Ces inter-neurons participent à la régulation des flux d'informations périphériques au sein du réseau de la corne dorsale (Willis, 1991). Les fibres A-delta de type I projettent dans les couches profondes III et IV. Quant aux fibres A-bêta, elles projettent dans les couches profondes III, IV, et V (Millan, 1999). Il faut noter que les neurones WDR de la laminae V reçoivent des afférences indirectement par les fibres C nociceptives qui se terminent au niveau de la couche II (Basbaum, 2000; Basbaum et Julius, 2006), répondant alors à la fois à des stimulations nociceptives et non nociceptives. Ces neurones WDR répondent ainsi à une gamme complète de stimulation, allant du toucher fin aux stimuli nocifs (Basbaum et al., 2009). Ils sont impliqués dans le phénomène de sensibilisation centrale médié par les fibres C (Millan, 1999).

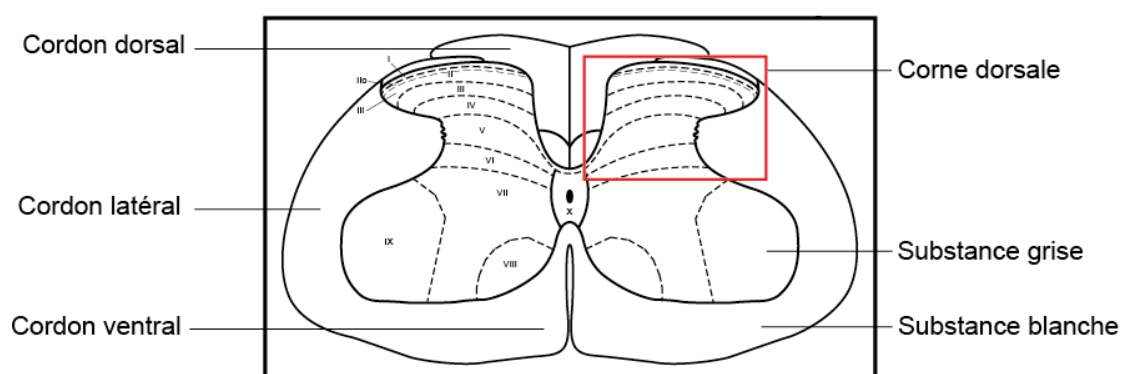


Figure 6 : Organisation laminaire (de couche I jusqu'à couche X) de la moelle épinière. La corne dorsale celui qui est encadrée en rouge

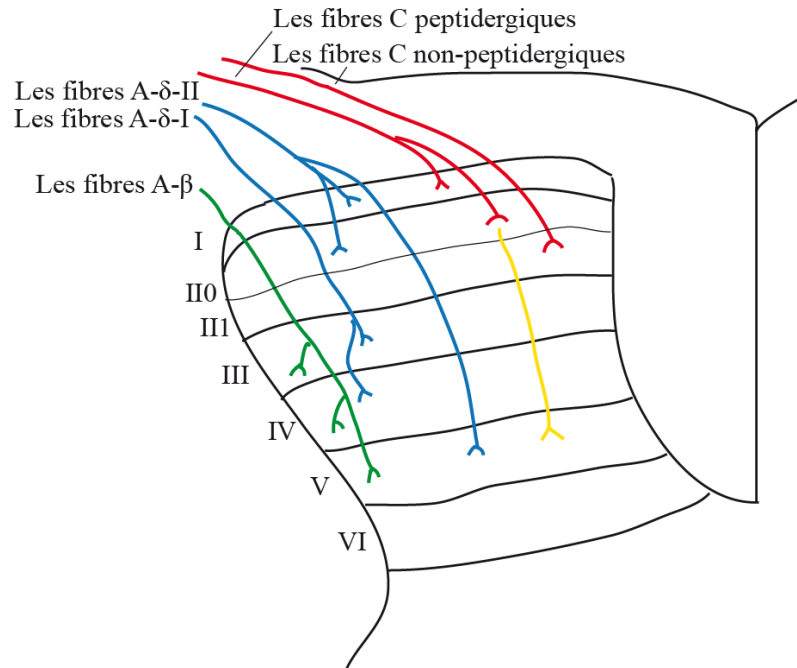


Figure 7 : Projection des différentes afférences primaires : les fibres C (rouge)- les fibres A-delta (bleu) et les fibres A-bêta (vert). Les fibres C projettent indirectement dans la couche V via un interneurone (jaune).

IV) La corne dorsale de la moelle épinière : un système non fixe et dynamique:

La corne dorsale est composée d'un réseau neuronal complexe, dynamique, et non fixe. Les entrées périphériques afférentes projettent directement sur ce réseau neuronal qui va intégrer puis véhiculer les informations vers des structures cérébrales supérieures. Ce réseau neuronal est plastique ce qui veut dire que les connexions, les propriétés et les fonctions des neurones qui le constituent, peuvent changer en fonction de la qualité et de la quantité des informations reçues dépendantes des conditions physiopathologiques. L'application des stimulations thermiques par exemple (supérieure de 49°C) (Woolf et Fitzgerald, 1983), ou des stimulations électriques (Wall, 1984), ou encore l'administration des substances chimiques inflammatoires (Woolf et King, 1990), induit une forme d'hyperexcitabilité. Ce phénomène est connu sous le nom de "Sensibilisation Centrale", une forme de plasticité qui correspond à une hyperexcitabilité des neurones de la corne dorsale de la

moelle épinière, conduisant au renforcement du message nociceptif (Woolf, 1983). Cette sensibilisation représente un mécanisme par lequel on peut expliquer les changements dans la sensibilité à la douleur aiguë ou chronique (Latremoliere et Woolf, 2009). De plus, ce type de plasticité centrale, est considérée comme une forme simple d'apprentissage (Pinsker et al., 1973), elle se manifeste par une augmentation de la réponse des neurones (augmentation de décharge et de durée de la réponse neuronale à des stimulations supraliminaire (stimulations qui dépassent le seuil) et diminution du seuil de réponse neuronale). Cette sensibilisation centrale est souvent accompagnée d'une sensibilisation au niveau périphérique : "Sensibilisation Périphérique" qui peut se manifester par la diminution du seuil d'activation du nocicepteur (terminaisons périphériques), et par la libération accrue des médiateurs excitateurs. De point de vue comportemental, elle se manifeste sous forme d'élargissement du champ récepteur qui correspond à la région cutanée de la peau déclenchant une activité neuronale (figure 8), ou encore l'expression de phénomène de l'Allodynie définie comme la survenue d'une douleur déclenchée par un stimulus qui est normalement indolore, avec une Hyperalgésie définie comme une sensation douloureuse accrue et exagérée pour un stimulus douloureux (Mannion et al., 1999) (figure 9).

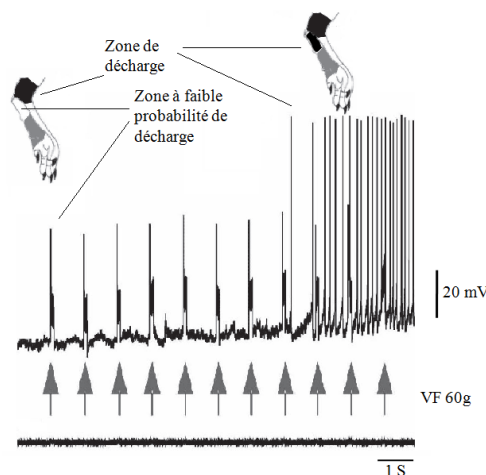


Figure 8 : La figure représente un exemple montrant l'élargissement d'un champ récepteur cutané au niveau de la patte de l'animal ce qui correspond avec l'augmentation de la réponse neuronale. L'exemple montre également comment une zone à faible probabilité de décharge peut être recrutée pendant le processus de la sensibilisation centrale pour devenir une zone de décharge (Reali et al., 2011) ; (Reali and Russo, 2013)

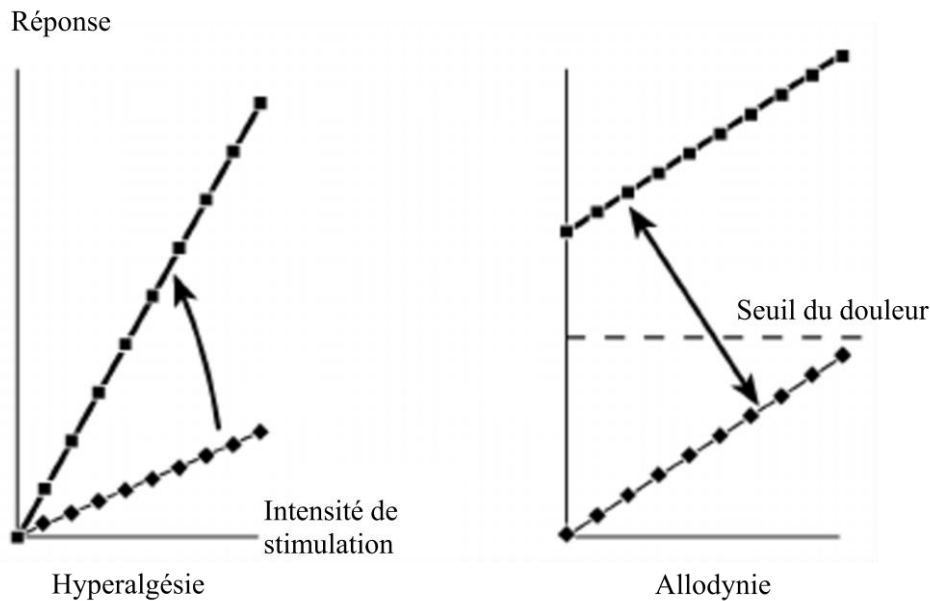


Figure 9: Le phénomène d’Hyperalgésie (à gauche) et d’Allodynie (à droite). La réponse à un même stimulus douloureux augmente ce qui donne lieu à une hyperalgésie. Les réponses deviennent nociceptives alors que le stimulus ne l’est pas (diminution du seuil de déclenchement de la sensation douloureuse) ce qui définit le processus allodynique (Bridges et al., 2001).

Au niveau de ce premier relai central de la moelle épinière, comme il a été signalé, le réseau neuronal est plastique c'est-à-dire que les connexions ainsi que les propriétés des neurones qui le constituent peuvent évoluer en fonction des informations reçues de la périphérie. Selon une base temporelle, cette plasticité s’exprime à la fois à court terme (de quelques minutes à quelques heures) et à long terme (plusieurs mois, voire des années).

1) La sensibilisation centrale à court terme:

Nous prenons comme exemple de ce type de sensibilisation à court terme: le phénomène de “Wind-up” : un bon exemple expérimental pour étudier le développement de la sensibilisation centrale à court terme à la douleur. Il s’agit d’une forme de sensibilisation centrale au niveau spinal, de plasticité à court terme, caractérisée par une augmentation progressive de la réponse des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière, suite à des stimulations répétitives des fibres nociceptives afférentes à faible fréquence (Mendell, 1966). Il a été découvert pour la première fois chez le chat (Mendell et Wall,

1965), ensuite chez le rat dans la moelle épinière (Woolf, 1983), et au niveau de neurones Locus coeruleus chez le rat (Hirata et Aston-Jones, 1994). En effet, il s'agit d'une plasticité activité-dépendante caractérisée par une augmentation progressive du nombre de potentiels d'action issues par les neurones de la corne dorsale durant la stimulation répétitive des fibres C nociceptives (Mendell et Wall, 1965). L'activation répétitive de ces fibres va provoquer des potentiels synaptiques excitateurs lents durant plusieurs cent millisecondes (Murase et al., 1986 ; Sivilotti, 1993). Le Wind-up se produit par de la sommation de ces potentiels synaptiques lents. Ce type de sensibilisation persiste seulement quelques minutes après l'application des stimuli nociceptives (Li et al., 1999), elle dépend de l'activité des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (Woolf et Wall, 1986), et plus particulièrement, il concerne les neurones WDR des couches profondes de la corne dorsale (Schouenborg et Sjolund, 1983), contrairement aux neurones nociceptifs spécifiques superficiels qui présentent peu ou pas cette forme de sensibilisation. On peut enregistrer ce phénomène soit : en enregistrant la décharge des neurones c'est à dire le nombre de potentiels d'action (Spike) émis par le neurone concerné durant l'application des stimuli et la post-décharge qui vient après l'arrêt de stimuli (figure 10), soit : par des enregistrements du réflexe nociceptif de flexion. Dans le cas du réflexe, un autre type de neurones sont impliqués : les motoneurones qui à leur tour peuvent exprimer ce phénomène de "Wind up". Étudier le processus de "Wind-up" permet d'étudier l'impact de la plasticité et les propriétés neuronales dans la sensibilisation centrale dans la corne dorsale de la moelle épinière. Le Wind-up a été interprété comme un système d'amplification du message nociceptif dans la moelle épinière en provenance de la périphérie par les fibres nociceptives C (Herrero et al., 2000).

Le caractère comportemental du phénomène de Wind-up s'illustre lorsque, à la présentation répétée de stimuli nociceptifs, la sensation douloureuse augmente à chaque présentation du stimulus alors que son intensité ne change pas. Au plan clinique, un phénomène de la sensation douloureuse très similaire au

“Wind up” a été produit chez l’homme en réponse à des stimulations répétitifs thermiques (Price et al., 1977), électriques (Lundberg et al., 1992) ou mécaniques (Magerl et al., 1998). Ces données cliniques justifient d’aller plus loin pour chercher et comprendre la signification de ce phénomène.

- **Mécanismes synaptiques et non synaptiques et le phénomène de Wind-up :**

Le Wind-up présente à la fois des composantes synaptiques et non synaptiques. Les neurones de la corne dorsale sont contactés par les fibres afférentes nociceptives dont le neurotransmetteur principal est le Glutamate. Ce neurotransmetteur libéré dans la fente synaptique va agir sur ses récepteurs tel que : les récepteurs NMDA et AMPA. Ces derniers (AMPA), s’impliquent dans la transmission rapide des informations nociceptives. La suppression de cette transmission supprime le Wind-up de la décharge (Baranauskas et Nistri, 1998). Quant aux récepteurs NMDA, au potentiel du repos, ils sont inactifs même après la liaison de l’agoniste car le pore est bloqué par des ions de Mg²⁺. Les caractéristiques de ce récepteur en font un bon candidat dans les mécanismes de plasticité synaptique, comme son rôle dans la potentialisation à long terme (LTP) et la dépression à long terme (LTD) (Artola et al., 1990). Plusieurs études menées concernent le rôle de ces récepteurs dans les mécanismes de sensibilisation à court terme de type Wind-up. Ces études montrent un rôle des récepteurs NMDA dans le phénomène de Wind-up *in vivo* (Davies, 1987; Dickenson et Sullivan, 1987 ; Baranauskas et Nistri, 1996); Barbieri et Nistri, 2001). D’autre part, toujours *in vivo*, dans le noyau trigéminal, les récepteurs NMDA ont des effets bidirectionnels, ils sont capables d’activer et d’inhiber l’expression du Wind-up de cette zone (Woda et al., 2004). Autres molécules qui s’impliquent dans ce phénomène sont les Neurokinines dont le principal récepteur est le NK1. L’application des antagonistes de ces récepteurs diminuent le Wind-up dans différents modèles d’études *in vivo* (Chapman et Dickenson, 1993; Laird et Bennett, 1993). Les récepteurs métabotropiques du glutamate de groupe I sont à leur tour facilitent

l'apparition du Wind-up. Le glutamate en activant ces récepteurs, modifie les propriétés intrinsèques des neurones, facilitant le Wind-up (Derjean et al., 2003). Il existe autres molécules qui s'impliquent dans le Wind-up. Il a été mis en évidence que les opioïdes ont un effet dépressif sur le phénomène de Wind-up. L'administration directe dans la moelle épinière d'opioïdes induit une dépression de Wind-up des neurones de la corne dorsale (Chapman et al., 1994). Similairement, l'administration intrathécale d'endomorphines induit une réduction significative de Wind-up des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (Chapman et al., 1997). Encore, une étude menée a montré que, quand il est administré par la voie intrathécale dans la moelle épinière, la Nociceptine déprime le Wind-up des neurones de la corne dorsale (Stanfa et al., 1996). Quant à la sérotonine, Gjerstad et ses collègues (Gjerstad et al., 1996) ont étudié le rôle des récepteurs à la sérotonine 5-HT1A dans le Wind-up dans la corne dorsale *in vivo* chez le rat. Les résultats montrent que l'activation de récepteur de type 5-HT1A réduit la latence de décharge et de post-décharge.

D'autre part, le Wind-up présente une importante composante non synaptique qui implique l'expression des propriétés endogènes des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (Morisset et Nagy, 2000). Pour étudier l'impact de ces propriétés intrinsèques dans le Wind-up, il faut pouvoir isoler les neurones synaptiquement pour éliminer l'effet de la composante synaptique, et donc ainsi isolé synaptiquement, la capacité du neurone à générer ce Wind-up dépend uniquement de ses propriétés intrinsèques. *In vitro*, il a été montré la possible génération de Wind-up de la décharge de neurones par la stimulation des racines dorsales avec une intensité activant les fibres C nociceptives (figure 10-A) (Morisset et Nagy, 2000). Si l'on isole synaptiquement un de ces neurones on peut aussi obtenir un Wind-up de la décharge en mimant la stimulation des fibres C par des pulses de courant dépolarisant de courte durée et de même intensité (figure 10-B) (Morisset et Nagy, 1996). En effet, il a été montré que l'expression du Wind-up *in vitro*, dépendait de la capacité des neurones de la corne dorsale à générer des potentiels du plateau, propriété régénérative du plateau. Les neurones qui expriment des potentiels du plateau

expriment aussi un Wind-up de leur décharge. Autrement dit, l'expression du potentiel du plateau, est un composant essentiel du "Wind-up" qui représente une sensibilisation à court terme de la moelle épinière (Morisset et Nagy, 1996; 1999). Sur le plan pharmacologique, toujours des études menées par Morisset et Nagy (Morisset et Nagy, 1999), il a été montré que les propriétés endogènes sont liés aux courants calciques via les canaux calciques de type L. L'application de Nifedipine, une Dihydropyridine antagoniste des canaux calciques de type L, supprime le Wind-up de ces neurones (figure 11).

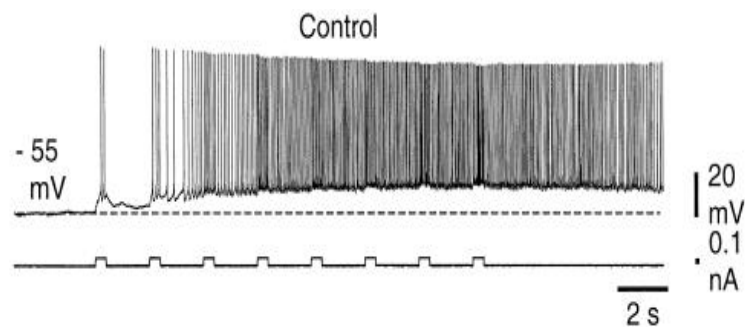


Figure 10-A

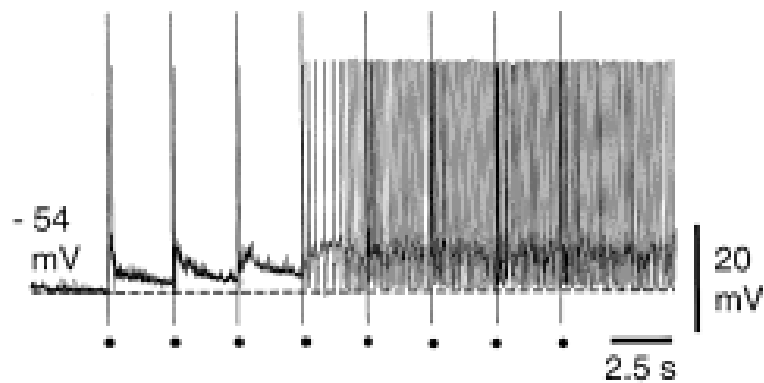


Figure 10-B

Figure 10 : A et B représentent un exemple de phénomène de Wind up chez le rat. En A, Wind-up d'un neurone de la corne dorsale lors d'une stimulation répétitive des racines dorsales. En B, le décharge du neurone de la corne dorsale de la moelle épinière en réponse à des pulses de courant dépolarisant. Dans les deux cas, Le nombre de Spike augmente progressivement au cours de l'application de stimuli, suivi d'une post-décharge après l'arrêt de stimuli (Morisset et Nagy, 2000)

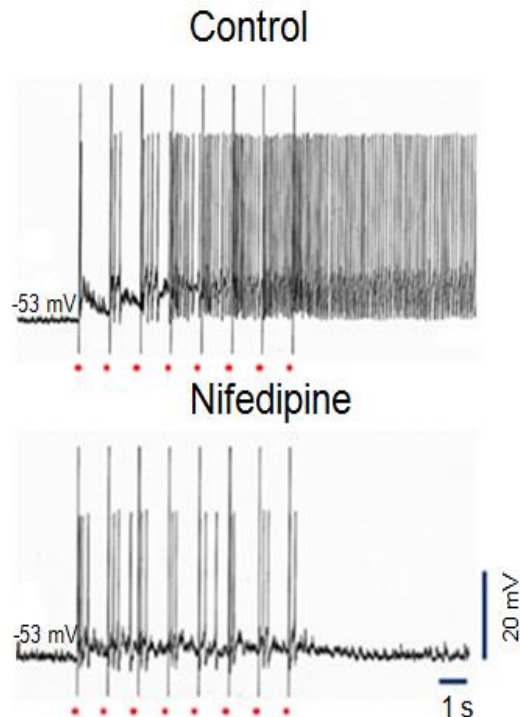


Figure 11 : A1) Wind-up d'un neurone de la corne dorsale lors d'une stimulation répétitive des racines dorsales. A2) Après application de Nifedipine, le Wind-up est supprimé (Morisset et Nagy, 2000).

2) La sensibilisation centrale à long terme:

Une des particularités de la sensibilité nociceptive est sa capacité à évoluer de façon complexe, suite à une activation forte et soutenue des fibres afférentes nociceptives provoquée par des lésions tissulaires et/ou nerveuses, traduisant la mise en jeu des processus de sensibilisation du système nerveux. Une des composantes de cette plasticité se produit au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière, premier relai d'intégration de l'information nociceptive. Ce sont des phénomènes de plasticités morphologiques et fonctionnelles qui sont responsables de la transformation de la douleur physiologique utile symptomatique, en douleur chronique inutile pathologique associée à une forme de sensibilisation centrale à long terme (Woolf, 1983). Ce type de sensibilisation centrale à long terme contribue aux douleurs de type inflammatoires (Schaible et al., 2006 ; Bliddal et Danneskiold-Samsoe, 2007; Yunus, 2007), et neuropathiques (Campbell et Meyer, 2006). Dans ces situations, la sensibilisation centrale peut se maintenir longtemps (des mois,

voire des années) même après la réparation tissulaire et la disparition de la cause de la lésion, ce qui correspond alors à des changements et des réorganisations fonctionnelles profondes et structurelles des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière. Ces douleurs se caractérisent par des modifications durables du système nociceptif touchant à la fois les propriétés synaptiques, intrinsèques, neuronales et structurelles. Le problème réside sur la maintenance de ces modifications après la réparation de la lésion.

Les modifications synaptiques se manifestent par une augmentation de la transmission synaptique excitatrice, par exemple une augmentation accrue de la probabilité de la libération des neurotransmetteurs excitateurs et/ou de la quantité des neurotransmetteurs stockés dans chaque vésicule libérée (Luo, 2012). En effet, dans le cadre de sensibilisation à long terme, les fibres afférentes peuvent présenter une augmentation d'activité. Le glutamate mais aussi autres de nombreux substances (substance P, CGRP) vont être libérés par les terminaisons des fibres C (Ji, 2003). Le glutamate va activer ses récepteurs ionotropiques : AMPA, NMDA, Kainate et métabotropiques mGluRs, la substance P se fixera à son tour sur ses récepteurs dont le principal NK1. L'activation maintenue et durable de l'ensemble de ces récepteurs entraînera au niveau de l'élément post-synaptique des changements dans l'expression, le trafic et l'activité des récepteurs et des canaux (Woolf et Salter, 2000). Le recrutement des nouveaux récepteurs dans l'élément post-synaptique, c'est le cas des récepteurs AMPA dans la membrane post-synaptique (Larsson et Broman, 2008), conduit à une amplification des potentiels post-synaptiques excitateurs, avec une dépolarisation membranaire permettant l'activation accrue des récepteurs glutamatergiques de type NMDA participant à la signalisation intracellulaire. Les récepteurs métabotropiques activés par le glutamate vont à leur tour participer à la cascade de la signalisation intracellulaire (figure 12). La protéine kinase C et la protéine tyrosine kinase src activés par les récepteurs NK1 (récepteur de substance P) et mGluRs, et par le récepteur trkB (BDNF) vont phosphoryler les récepteurs NMDA et augmenter l'ancrage des récepteurs AMPA à la membrane. L'activation du

récepteur NMDA laisse entrer du calcium. Ce dernier va activer des voies de signalisation intracellulaire : PKC et la CamKII. Il a d'ailleurs été montré que le blocage de l'expression des protéines kinases A ou C diminuent la sensibilisation à la douleur (Malmberg et al., 1997 ; Wei et al., 2002), et que dans le cadre de neuropathie (CCI, voir plus loin), il y a une augmentation de la forme phosphorylée active de CamKII dans la corne dorsale (Dai et al., 2005). La CamKII va cibler CREB, l'un des facteurs de transcription génique les plus connus. Il y a de nombreuses évidences de l'activation de CREB après lésions nerveuses et de son rôle dans les douleurs associées. En effet, dans les modèles CCI et SNI, deux modèles de neuropathie (voir plus loin), il a été mis en évidence une augmentation de la forme phosphorylée de CREB, forme active de cette molécule (Miletic et al., 2002 ; Wang et al., 2006), et que le blocage de l'expression de CREB dans le contexte de SNI diminue le comportement allodymique (Wang et al., 2006). Plusieurs gènes dont l'expression est augmentée en condition des lésions nerveuses, possèdent un site CRE dans leur séquence et sont donc susceptibles d'être activés par CREB (Ji, 2003). Parmi ces gènes dont l'expression est augmentée, on trouve les récepteurs de la substance P (NK1) (Krause et al., 1995), les récepteurs aux neurokinines (NK3), et les récepteurs au BDNF (trkB) (figure 13).

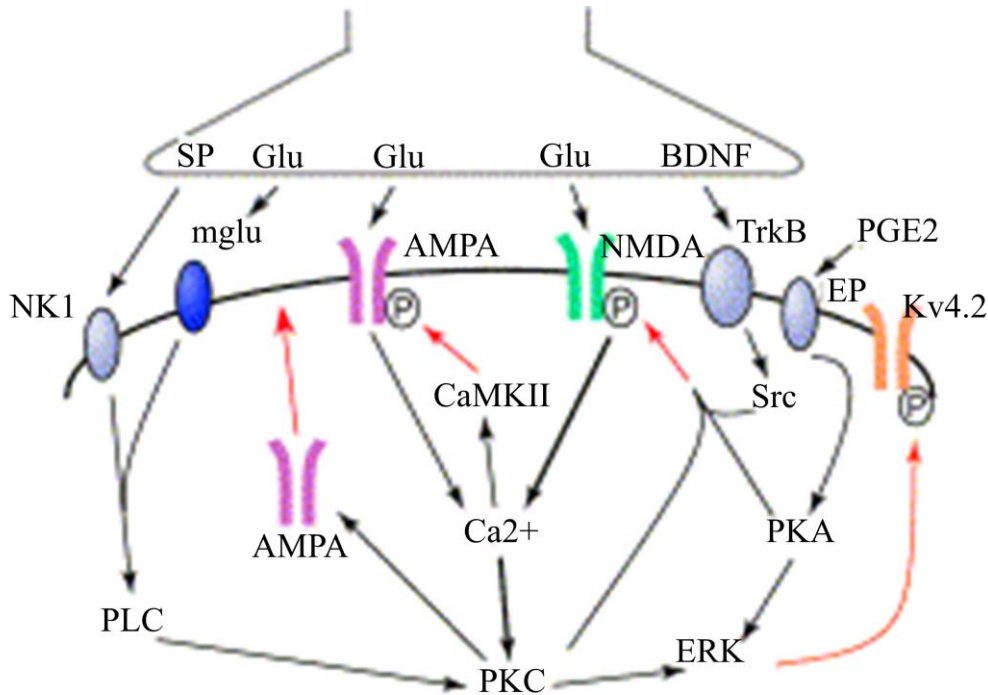


Figure 12 : Machinerie intracellulaire mise en place sans activation génique. Les afférences primaires libèrent le neurotransmetteur Glutamate et des neuropeptides : la substance P (SP) et la BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor). Le Glutamate se fixe sur ses récepteurs ioniques AMPA et NMDA, et métabotropiques (mGluRs). La substance P et la BDNF se fixent sur les récepteurs NK1 (neurokinine 1 couplé à la protéine G) et les récepteurs trkB (tyrosine kinase) respectivement localisés dans l'élément post-synaptique. L'augmentation du calcium intracellulaire induit à l'activation de protéines kinases/ sérine/ threonine, y compris la protéine kinase A (PKA)-AMPC dépendant, la protéine kinase C, Ca²⁺/phospholipide-dépendent, et la protéine kinase II (CaMKII), Ca²⁺/Calmodulin-dépendent. Ces protéines kinases et la tyrosine kinase Src, phosphorylent les récepteurs NMDA et AMPA, conduisant à une augmentation de la sensibilisation. L'ERK (extracellular-signal-regulated kinase) issue de PKA et PKC phosphoryle le canal potassique Kv4.2. La PKC induit un rapide recrutement de récepteurs AMPA à la synapse.

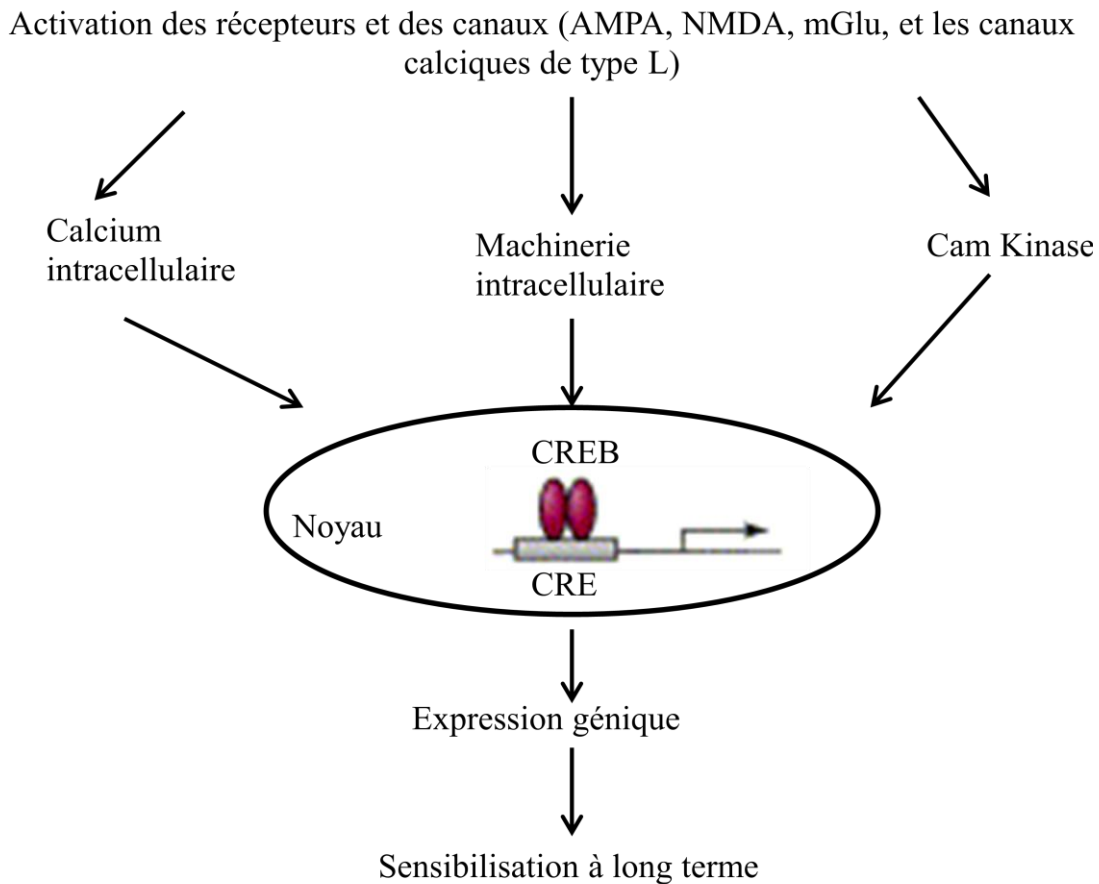


Figure 13 : Maintenance de la sensibilisation centrale ‘‘sensibilisation à long terme’’ qui implique des modifications de l’expression génique.

Des modifications touchant les propriétés intrinsèques (c’est à dire des propriétés qui dépend de palette des conductances membranaires) sont aussi bien présentes dans le cadre de sensibilisation centrale à long terme. Des études ont montré qu’il y ait moins de sensibilité aux stimuli mécaniques ou thermiques chez les animaux dépourvus des canaux calciques Cav2.2 et Cav3.2 dans le contexte inflammatoire et neuropathiques respectivement (Saegusa et al., 2001 ; Todorovic et al., 2002 ; Bourinet et al., 2005 ; Choi et al., 2007 ; Swayne et Bourinet, 2008). Encore, il a été mis en évidence une augmentation de l’expression des canaux sodiques Nav1.3 au niveau des neurones nociceptifs

de la corne dorsale dans un modèle de douleur neuropathique (Hains et al., 2004), ainsi qu'une possible réduction d'un courant potassique de type A en condition de douleur (Hu et al., 2006).

Des modifications neuronales peuvent aussi se mettre en place telle que : la mort de cellules neuronales et plus particulièrement les neurones inhibiteurs des couches superficielles de la corne dorsale (Sugimoto et al., 1990), et/ou une augmentation du nombre de neurones excitateurs activés (Schoffnegger et al., 2008). En effet, en 1965, Melzack et Wall avaient déjà postulé que la perte de fonction des neurones GABAergique et/ou glycinergique inhibiteurs, principalement et densément localisés dans la corne dorsale superficielle, pourrait conduire à une augmentation de la douleur ressentie (Melzack et Wall, 1965). En effet, après ligature partielle du nerf sciatique (PNL), il y a une diminution des niveaux de GABA dans la corne dorsale (Stiller et al., 1996). La diminution de niveaux de GABA est liée à une mort cellulaire des neurones GABAergiques (Scholz et al., 2005). La dis-inhibition (perte d'inhibition) représente un autre mécanisme par lequel le système spinal devient hyperexcitable.

Enfin, des modifications structurelles peuvent aussi s'ajouter et qui peuvent se manifester par une réorganisation des fibres nerveuses (*sprouting*) (Coggeshall et al., 1997). Dans le cadre de ligature des nerfs spinaux, il a été mis en évidence une prolifération du NGF des fibres A bêta vers la couche II considérée comme uniquement nociceptive (Lekan, 1996; Grelik et al., 2005) correspondant à un bourgeonnement aberrant des fibres A bêta projetant normalement aux couches profondes en direction des couches superficielles. Cela aurait pour conséquence d'établir des contacts synaptiques fonctionnels avec des cellules ne recevant normalement que des informations nociceptives. Des stimuli physiologiquement non douloureux seront alors interprétés comme une sensation douloureuse (processus connu sous le nom de l'allodynie (Bridges et al., 2001).

Dans l'espoir de trouver des nouvelles cibles thérapeutiques pour soigner les douleurs chroniques pathologiques, la connaissance des causes et mécanismes enclenchés dans la transmission douloureuse reste un élément crucial. Les modèles animaux qui reproduisent les conditions pathologiques cliniques représentent un outil indispensable pour les étudier. L'utilisation des animaux est très répandue dans la recherche fondamentale et les études sur la douleur ne font pas exception. Malgré la possibilité de créer des modèles pathologiques qui restent indispensables afin de mimer le contexte clinique observé chez l'homme, nous sommes dans la nécessité et l'obligation de respecter les lois d'éthiques établis par l'IASP pour le confort et le bien être de l'animal correspondant à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, et de s'assurer que tous les efforts ont été considérés pour limiter ou diminuer l'inconfort et la douleur des animaux, et bien évidemment le nombre d'animaux utilisés. D'autre part, il convient de signaler que les approches techniques utilisés sont nécessaires mais imparfaites et qu'il y a une difficulté, voire impossible de savoir et d'évaluer précisément ce que l'animal ressent vraiment. Les études menées chez l'animal consistent en effet essentiellement à mesurer un seuil de sensibilité cutanée plutôt qu'un comportement douloureux intégré (Bridges et al., 2001). Dans notre étude, nous avons utilisé deux modèles de douleurs : un modèle de neuropathie, et un modèle d'inflammation périphérique. Les deux modèles se caractérisent par la présence de deux symptômes : l'Allodynie et l'Hyperalgésie. Je vais présenter brièvement les différents modèles de neuropathie et d'inflammation utilisés au laboratoire.

- **Les modèles de neuropathie:**

- a) Spared Nerve Injury (SNI) (figure 14-A):**

Il a été mis en place par Decosterd & Woolf en 2000 (Decosterd et Woolf, 2000). Il s'agit de pratiquer une lésion des nerfs tibial et péronéal commun, laissant intact le nerf sural. Cette approche permet de tester le comportement douloureux au niveau de territoires non lésés de la patte, adjacents aux zones

lésées. Comme les autres modèles, cette méthode induit une forte allodynie durable.

b) Partial Nerve Ligation (PNL) (figure 14-B):

Il a été créé en 1990 par Seltzer (Seltzer et al., 1990), consistant à une ligature serrée de 33 à 50 pour cent du faisceau de fibres du nerf sciatique. Ce modèle induit également une allodynie et une hyperalgésie avec des comportements de protection de la patte que l'animal lèche de façon répétée suggérant la présence des douleurs spontanées. L'inconvénient de ce modèle est que la procédure expérimentale dépend de l'expérimentateur : le nombre de fibres lésées peut varier considérablement, ce qui peut générer une différence significative liée à l'opération entre les différentes conditions/animaux.

c) Spinal Nerve Ligation (SNL) (figure 14-C):

Modèle développé par Kim & Chung en 1992 (Kim et Chung, 1992). Il consiste à ligaturer les racines L5 et L6 du nerf sciatique. Par rapport aux méthodes précédentes, ce modèle a quelques avantages : il ne cause pas une forme d'isolement, il est moins dépendant de l'expérimentateur puisque la ligature doit être serrée et concerne l'ensemble des racines L5 et L6. L'hyperalgésie et l'allodynie caractérisent ce modèle, cependant, l'allodynie est moins robuste que dans les autres modèles (Kim et al., 1997), ce qui représente un point positif du point de vue d'éthique.

d) Chronic Constriction Injury (CCI) (figure 14-D):

Ce modèle a été élaboré par Bennett et Xie en 1988 (Bennett et Xie, 1988), il consiste à une constriction du nerf sciatique par quatre ligatures lâches. Cette opération entraîne l'apparition d'une allodynie et d'une hyperalgésie. Un des principaux avantages du modèle c'est qu'il ne cause pas, ou très peu, d'autotomie ce qui est également un avantage du point de vue éthique, exigeant que l'animal doit être exposé à la douleur minimale nécessaire pour réaliser l'expérience (Dubner, 1983). C'est un modèle qui a fait l'objet de plusieurs

études (Bennett et Xie, 1988; Kim et al., 1997; Dowdall et al., 2005). Cependant, ce modèle a également des inconvénients qui peuvent limiter son utilisation. Il est très dépendant de l'expérimentateur, la souplesse de la ligature est une valeur très subjective (Bridges et al., 2001). Cette technique cause aussi des lésions aux neurones moteurs qui innervent les muscles de la patte arrière de l'animal. De plus, il est impossible de contrôler le type de fibres nerveuses qui sont endommagées par cette procédure et donc de discerner la contribution des fibres atteintes par rapport aux fibres intactes dans le développement de la douleur neuropathique.

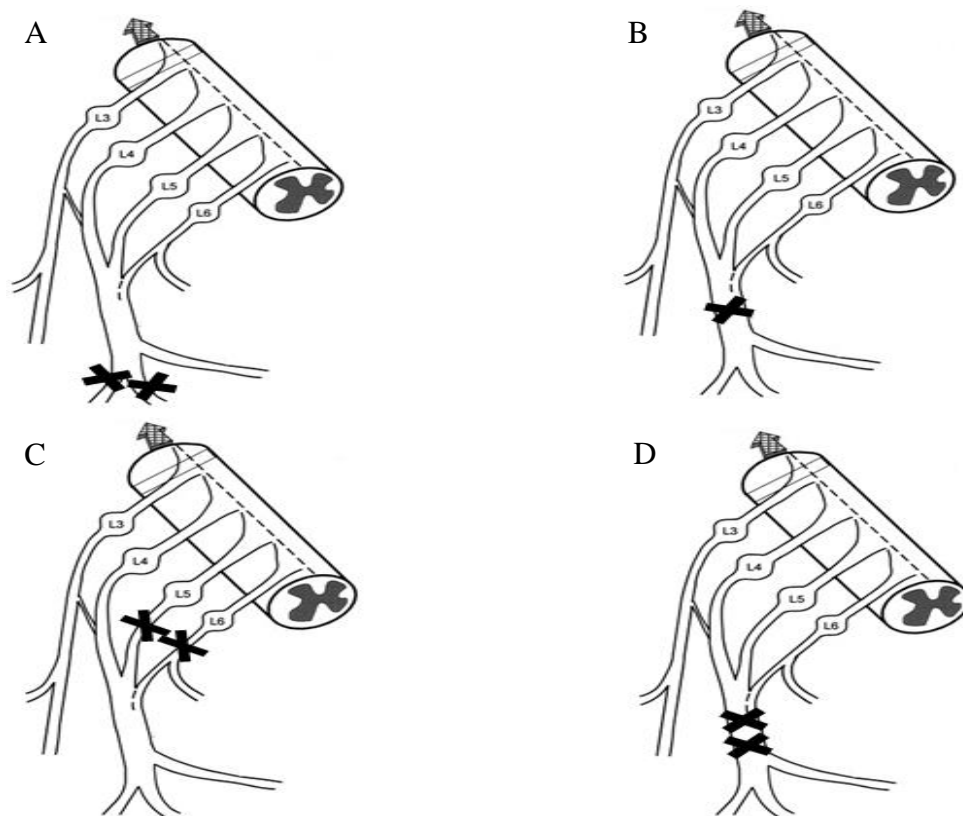


Figure 14 : Les quatre modèles de neuropathie périphérique. A) modèle de SNI, B) modèle de PNL, C) modèle de SNL, D) modèle de CCI

Dans notre étude, pour créer un modèle de douleur neuropathique, nous avons fait le choix du modèle expérimental neuropathique de type SNL (spinal nerve ligation (Kim et Chung, 1992) étant donné les avantages qu'il possède par

rapport aux autres modèles et parce que la ligature se pratique à distance de la cuisse ce qui facilite les enregistrements électromyographiques.

- **Les modèles inflammatoires :**

Pour étudier les mécanismes de la douleur inflammatoire, des modèles animaux d'inflammation qui imitent le contexte clinique observé chez l'homme ont été développés par l'injection des agents chimiques provoquant une inflammation dans la patte postérieure de l'animal (Hargreaves, 1988 ; Iadarola et al., 1988 ; Millan et al., 1988).

a) L'inflammation à la Formaline :

Ce modèle est utilisé pour la première fois chez le rat et le chat (Dubuisson et Dennis, 1977; Watson et al., 1997 ; Kaneko et Hammond, 1997), consistant à une injection intraplantaire de formaline dans la patte postérieure de l'animal. Le formaline injecté produit des effets qui durent approximativement une heure. La réponse s'effectue en deux temps : la première phase correspond à une douleur aiguë qui persiste cinq minutes, suivi d'une longue phase persistante qui dure environ quarante minutes et qui représente une période de sensibilisation inflammatoire durant laquelle l'animal exprime un comportement douloureux en secouant et léchant sa patte. Dans ce modèle, seulement des événements cellulaires à court terme se mettent en place comme des ouvertures des canaux (le récepteur NMDA par exemple) ou des libérations de neuromédiateurs.

b) L'inflammation à la Carragénine :

Modèle inflammatoire consiste d'injecter dans la patte de l'animal la Carragénine (Hargreaves et al., 1988; Iadarola et al., 1988). Ce modèle est plus persistant que le test de Formaline, il produit une douleur qui dure plus longtemps mais bien inférieure à une semaine, à moins d'injections répétées. Cette opération est utilisée surtout pour induire des douleurs inflammatoires articulaires, la Carragénine est souvent injectée en intra-articulaire dans

l'articulation du genou ou de la cheville (Neugebauer et al., 1996; Schaible et al., 2000). L'inflammation se développe rapidement une heure après l'injection mais la sensibilisation qu'elle provoque ne dure pas autant que dans le cas d'une inflammation induite par le CFA (Adjuvant Complet de Freund).

c) L'inflammation à la Capsaïcine :

C'est un modèle d'inflammation neurogénique (LaMotte et al., 1991) qui consiste à effectuer une injection intradermique de Capsaïcine. Il a été utilisé pour étudier l'activité des neurones de la corne dorsale chez les singes (LaMotte et al., 1991; Simone et al., 1991), et ensuite chez le rat (Gilchrist et al., 1996). L'injection intraplantaire évoque un comportement nocifencif caractérisé par un levage et la protection de la patte injectée. Ce test produit également une allodynie mécanique qui peut persister jusqu'à deux heures. L'un des principaux inconvénients de ce test est qu'il cause des dommages des fibres C nociceptives.

d) L'inflammation au CFA (Adjuvant Complet de Freund) :

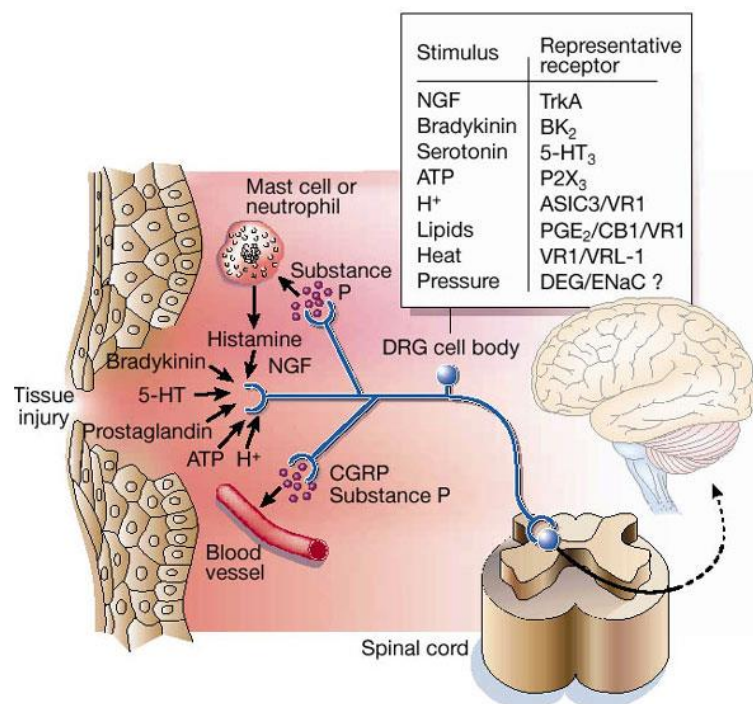
Il s'agit d'injecter dans la patte arrière de l'animal la solution CFA. Après l'injection, l'animal développe une allodynie avec un œdème au niveau de sa patte. L'avantage de ce modèle CFA c'est que les symptômes douloureux persiste jusqu'à deux semaines (Iadarola et al., 1988). Il s'agit alors d'un modèle très persistant car l'inflammation se maintient plusieurs jours, on parle d'inflammation persistante /chronique, accompagnée d'une sensibilisation qui est aussi très persistante et provoque certainement des changements plus profonds tels que des phosphorylations de protéines, des modifications du trafic des récepteurs. En plus, il imite de plus près l'évolution temporelle de la douleur postopératoire ou d'autres types de lésions persistantes (Hargreaves et al., 1988; Iadarola et al., 1988). Pour ces raisons, dans notre travail, nous avons fait le choix de ce modèle, et parce qu'il est aussi rapide à produire par rapport à la procédure d'induction de neuropathie.

e) L'inflammation aux autres agents inflammatoires :

Autres substances comme "l'huile de moutarde" peuvent être également utilisés pour produire une inflammation périphérique. L'effet de l'huile de moutarde est relativement bref (quelques minutes) quand il est appliqué par voie cutané (Ma et Woolf, 1996), et il dure plus longtemps environ vingt minutes s'il est injecté par voie sous-cutané dans le muscle.

L'injection d'un agent inflammatoire induit une réponse/réaction inflammatoire (Figure 5). Cette réponse est orchestrée par la libération des substances/médiateurs en créant un environnement inflammatoire dit "soupe inflammatoire". Ces médiateurs contribuent à la réponse inflammatoire se libèrent par le tissu lésé tels que les protons, la sérotonine, et les prostaglandines. Les terminaisons des fibres afférentes primaires elles mêmes libèrent des médiateurs comme la substance P, et le CGRP. Cette réponse inflammatoire est amplifiée par l'activation des cellules gliales du système nerveux périphérique. Leur activation cause la relâche des molécules (histamine) en favorisant l'activation accrue des neurones sensoriels périphériques et centraux (Milligan et Watkins, 2009). Par le fait même, elles améliorent la condition douloureuse (Gao et Ji, 2010).

Figure 15 : la soupe inflammatoire. Les différents médiateurs de l'inflammation (ATP, sérotonine, ...) libérés par le tissu lésé vont se fixer sur leurs récepteurs présents dans les nocicepteurs. En réponse, les nocicepteurs vont également répondre en libérant des substances (Julius et Basbaum, 2001)



V) Les canaux calciques de type L :

1-Généralités : localisation anatomique, caractéristiques pharmacologiques, et fonctionnelles :

Comme déjà signalé, la sensibilisation centrale à la douleur repose sur des modifications survenant aux niveaux synaptiques, structurels, neuronal et aussi au niveau intrinsèque. Dans ce présent travail, je vais m'intéresser aux propriétés intrinsèques, et plus précisément au rôle joué par les canaux calciques de type L dans la plasticité de la corne dorsale de la moelle épinière dans les différents modèles de sensibilisation. Je vais commencer tout d'abord à présenter les caractéristiques de ces canaux.

Les canaux calciques voltage-dépendants sont impliqués dans des nombreuses fonctions essentielles dans le corps. Ils font partis de la famille de canaux ioniques transmembranaires qui incluent les canaux sodiques et potassiques. Ils sont voltages-dépendants, et ils créent un influx calcique suite à une dépolarisation de la membrane cellulaire en augmentant la concentration de calcium intracellulaire. Ces canaux ioniques calciques se divisent principalement en trois groupes principaux : Cav1 (L-type), Cav2 (P-type, N-type, and R-type), et Cav3 (T-type) (Ertel et al., 2000; Lipscombe et al., 2002) (figure 17). De point de vue structurel, ils s'agit des protéines hétéro-multimériques qui contiennent une sous unité alpha1 entourée par des sous unités accessoires alpha2, bêta, delta, et gamma (figure 16). L'alpha1 représente la sous-unité principale formant le pore du canal, elle représente une partie clé nécessaire pour fonctionnement du canal calcique.

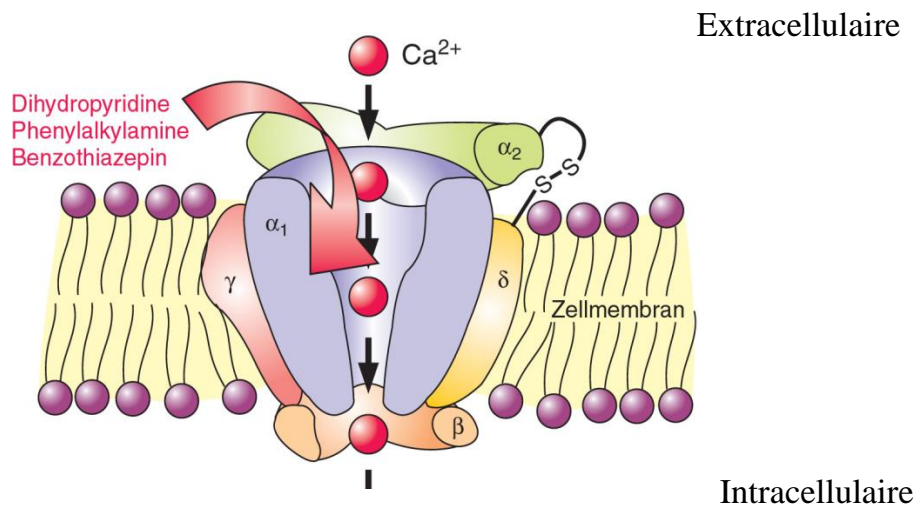


Figure 16 : Structure générale d'un canal calcique. La sous-unité alpha 1 est la partie principale de canal. Cette sous-unité est accompagnée de sous-unités accessoires (alpha2 delta, beta, et gamma)

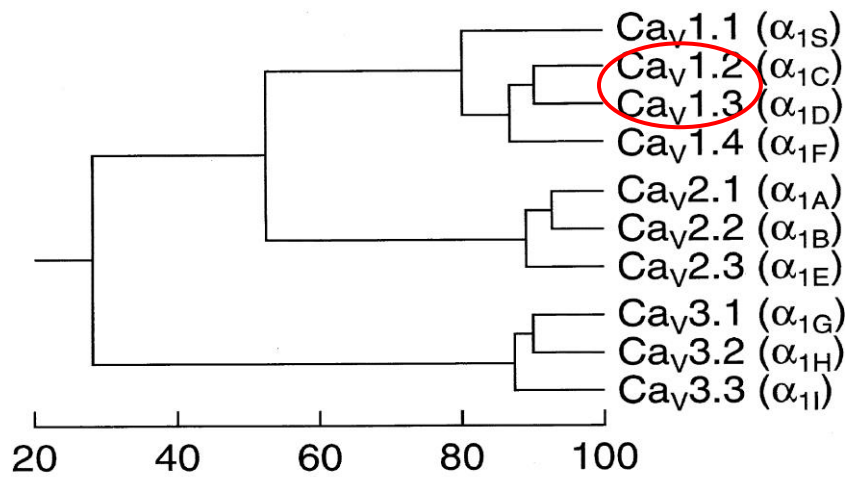


Figure 17 : Phylogénie de canaux calciques voltage-dépendants montrant les trois principaux groupes Cav1, Cav2, et Cav3. L'échelle allant de 20 % jusqu'à 100 % montre le taux de ressemblance entre les différents types (Ertel et al., 2000)

Dans ce travail, nous allons aborder plus particulièrement les canaux ioniques calciques de type L. Ces canaux L nécessitent une forte dépolarisation pour être activés, se caractérisent par leur haut seuil d'activation, et par leur sensibilité unique aux Dihydropyridines (Nifedipine, Nicardipine, Nimodipine, Isradipine,...) en comparaison avec les autres types de canaux. Ces canaux peuvent être également inhibés par les Phenylalkylamines, et Benzothiazepines (Ertel et al., 2000). Les canaux calciques de type L sont exprimés dans les neurones et les cellules endocrines où ils régulent une multitude de procédés, y compris la contraction musculaire (Tanabe et al., 1993), la libération de neurotransmetteurs (Tsien et al., 1988 ; Catterall et Few, 2008) et la cascade de signalisation intracellulaire conduisant à l'expression génique (Flavell et Greenberg, 2008).

- **Les canaux calciques de type L et la sensibilisation à court terme:**

Bien que l'administration d'antagonistes de ces canaux réduit de 30% la réponse des neurones de la corne dorsale à des stimulations mécaniques nociceptives (Neugebauer et al., 1996), avec un effet anti-nociceptif sur la latence du tail flick (Hara et al., 1998), l'effet induit reste très léger et inférieur à celui des bloquants des autres canaux (Fukuizumi et al., 2003). D'autre part, une étude menée a montré que l'application d'antagonistes de ces canaux n'a aucun effet sur le réflexe de retrait à des stimulations nociceptives (Sluka, 1997; 1998). Le rôle des canaux calciques dans le contexte d'inflammation reste aussi controversé : l'administration de Vérapamil, n'a aucun effet sur la réponse des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière après l'application de Formaline à la fois sur la phase précoce ou tardive (Malmberg et Yaksh, 1994 ; Diaz et Dickenson, 1997), alors que la Nifédipine est capable de réduire jusqu'à 80 % d'hyperalgésie induite par l'injection périphérique de capsaïcine (Sluka, 1997), encore, dans le cadre des douleurs inflammatoires articulaires, l'injection de carragénine diminue 34 % l'augmentation du décharge neuronale en réponse à des stimulations nociceptives mécaniques

(Neugebauer et al., 1996 ; Nebe, 1997). Le rôle joué par les canaux calciques de type L reste encore controversé et semble dépendant du modèle d'inflammation utilisé, voire de la substance anesthésique dans les études d'électrophysiologie. Cependant, des études menées par Morisset et Nagy ont bien montré que les canaux calciques L sont bien impliqués dans le phénomène de Wind-up *in vitro* (Morisset et Nagy, 2000). La confirmation de ces données *in vivo* et avec une approche computationnelle fera l'objet d'une partie de ces travaux de thèse, en étudiant le rôle de ces canaux L et plus précisément le rôle de chaque canal Cav1.2 et Cav1.3.

- **Les canaux calciques de type L et la sensibilisation à long terme:**

Dans le contexte de sensibilisation à long terme associée aux douleurs chroniques telles que les douleurs chroniques neuropathiques, le rôle joué par les canaux calciques reste toujours controversé. L'application d'antagoniste des canaux calciques de type L n'a pas d'effet significatif sur le comportement allodymique exprimé dans le modèle SNL (Chaplan et al., 1994), ou dans le modèle de neuropathie induite par la vincristine (Fukuizumi et al., 2003). En revanche, il a été montré une diminution de l'hyperalgésie thermique dans le contexte de douleur neuropathique diabétique (Gupta et al., 2003). Dans ce présent travail, nous proposons alors d'étudier en profondeur le rôle de ces canaux L dans le contexte de neuropathie induit par le modèle SNL.

- **Les iso-formes des canaux calciques de type L :**

À ce jour, il existe quatre iso-formes de canaux calciques de type L : Cav1.1 (alpha 1S), Cav1.2 (alpha 1C), Cav1.3 (alpha 1D) et Cav1.4 (alpha 1F). Ces quatre iso-formes possèdent des propriétés pharmacologiques assez similaires, ils se caractérisent par une large distribution anatomique : cerveau, les muscles, le cœur,... (figure 18) (Zamponi et al., 2015). Dans notre étude, nous nous intéressons plus particulièrement à ces deux iso-formes : Cav1.2 et Cav1.3, les deux seuls iso-formes exprimés dans la corne dorsale de la moelle épinière.

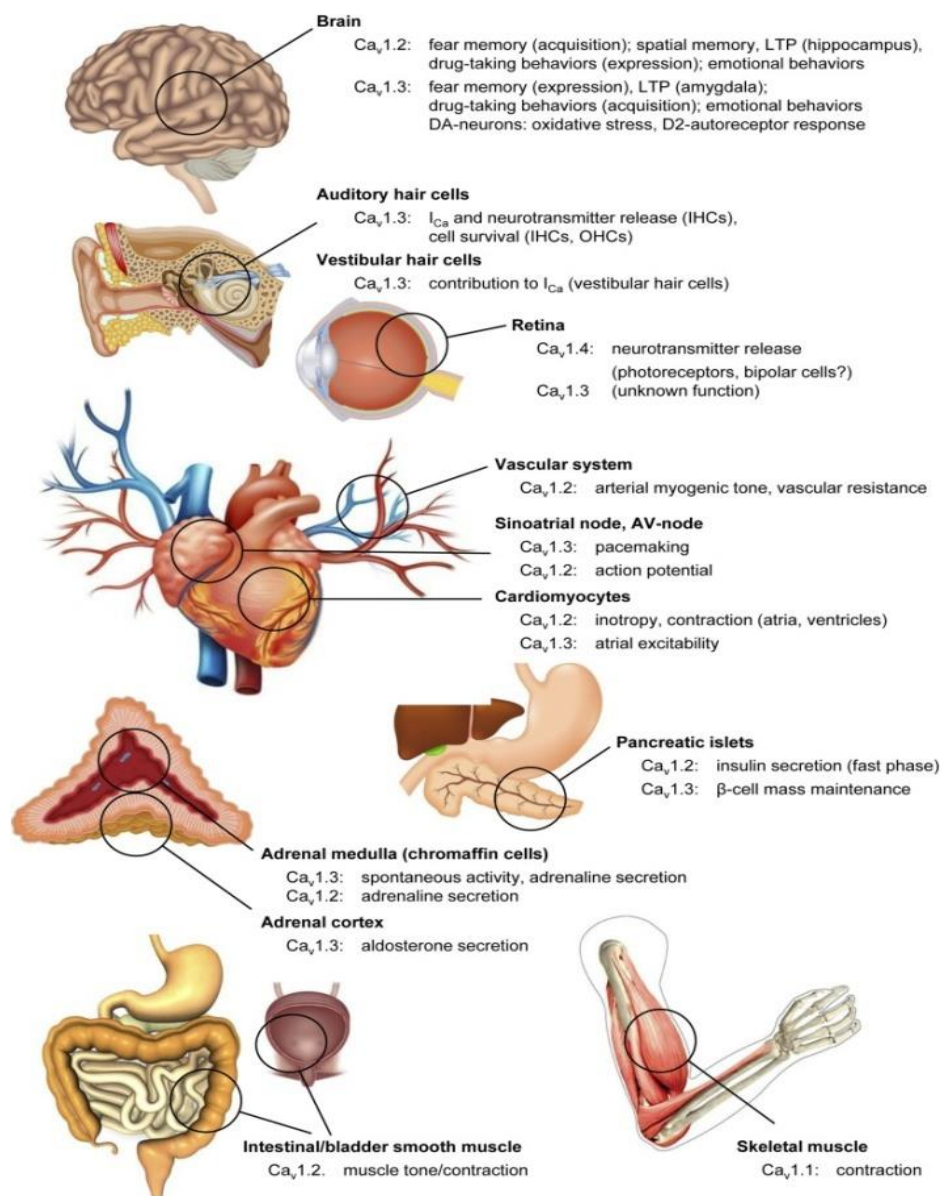


Figure 18 : les plus importantes distributions des canaux calciques de type L (Zamponi et al., 2015)

- **Les iso-formes des canaux calciques de type L : Cav1.2 et Cav1.3 :**

Toutes les cellules excitables expriment la sous unité Cav1.2 et/ou Cav1.3 (Lipscombe et al., 2004). Au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière, les canaux Cav1.2 et Cav1.3 sont exprimés à la fois dans la corne dorsale et ventrale (Perrier et al., 2002; Simon et al., 2003; Dobremez et al., 2005), où ils

participent à l'excitabilité des neurones de la moelle épinière (Morisset et Nagy, 1999 ; Perrier et al., 2002 ; Fossat et al., 2007). Ces canaux affichent une distribution neuronale différente. Cav1.3 est exprimé dans l'arbre dendritique dans la corne ventrale et au niveau du compartiment somato-dendritique dans la corne dorsale quel que soit le niveau de la moelle épinière étudié, alors que la distribution de Cav1.2 reste exclusivement somatique (Simon et al., 2003). Sur le plan fonctionnel, ces canaux présentent ainsi une sensibilité au voltage qui est différente. Cav1.2 est activé à ~ -30 mV. Quant à Cav1.3, elle s'active de -55 mV à -45 mV, seuil de 15 à 25 mV plus hyperpolarisé quel que soit la localisation anatomique (Koschak et al., 2001 ; Xu et Lipscombe, 2001). De plus, leur sensibilité aux Dihydropyridines est différente. En comparant avec Cav1.2, Cav1.3 est dix à vingt fois moins sensibles aux Dihydropyridines; (Koschak et al., 2001; Xu and Lipscombe, 2001; Sinnegger-Brauns et al., 2009). Toutes ces différences de distribution anatomique, de fonctionnement, et de sensibilité suggèrent des fonctions/rôles différents joués par ces canaux.

VI) Les récepteurs métabotropiques du glutamate:

Le glutamate, un acide aminé, est le principal neurotransmetteur exciteur dans le système nerveux central. Ce neurotransmetteur exerce ses effets à travers deux types de récepteurs : les récepteurs ionotropiques (iGluRs) et métabotropiques (mGluRs). En se fixant sur ses récepteurs, le glutamate participe non seulement à la transmission physiologique de l'information nociceptive mais aussi aux mécanismes centraux et périphériques de développement de l'hyperexcitabilité douloureuse (Latremoliere et Woolf, 2009). Le glutamate joue un rôle important dans le phénomène de la sensibilisation centrale (Woolf, 1983).

De point de vue structurel (figure 19), les récepteurs mGluRs se caractérisent par un large domaine extracellulaire N-terminal, sept domaines transmembranaires, et un domaine intracellulaire C-terminal (Gereau, 2008 ; Niswender et Conn, 2010). Le domaine N-terminal extracellulaire représente un site critique pour la fixation du ligand, ou bien pour les modulations

exogènes (agonistes et antagonistes). La partie C terminale cytoplasmique de mGluRs contient un site de fixation de différentes protéines intracellulaires, de modification post-traductionnelle (Enz, 2012).

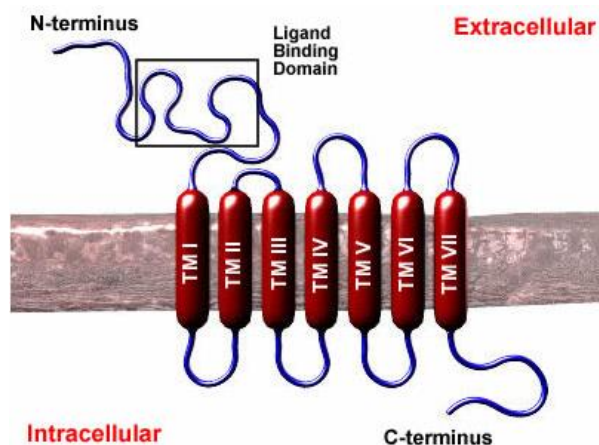


Figure 19 : Représentation schématique du récepteur métabotrope au glutamate (<http://www.bristol.ac.uk/synaptic/receptors/mglur/>)

Contrairement aux récepteurs ionotropiques du glutamate, les récepteurs métabotropiques du glutamate sont couplés à la protéine G, exercent leur effet via un système des effecteurs secondaires qui peut déclencher des processus intracellulaires durables. Aujourd'hui, huit mGluRs ont été clonés qui sont classifiés en trois groupes selon leur séquence d'homologie d'acides aminés, les mécanismes de transduction, et le profil pharmacologique (Conn et Pin, 1997 ; Neugebauer, 2001). Le groupe 1 inclut le récepteur mGluR 1 et mGluR 5, le groupe 2 regroupe mGluR 2 et mGluR 3, et le groupe 3 contient mGluR 4, mGluR 6, mGluR 7, et mGluR 8 (figure 20). La major distinction entre les différents groupes c'est que le groupe I est couplé à la protéine $G_{q/11}$ conduisant à l'activation de phospholipase C (PLC), et donc à l'hydrolyse d'inphosphoinositide (IP), la libération du calcium par le stock intracellulaire, et l'activation de la protéine kinase C (PKC) ; (Conn and Pin, 1997 ; Anwyl, 1999; Neugebauer, 2001). Au contraire, le groupe II et III sont négativement couplés à l'adenylyl cyclase (AC) via G_i/G_o , ainsi l'inhibition de la formation

d'AMP cyclique et l'activation de la protéine kinase A (PKA)- l'AMP cyclique dépendante (Anwyl, 1999; Neugebauer, 2001) (figure 21).

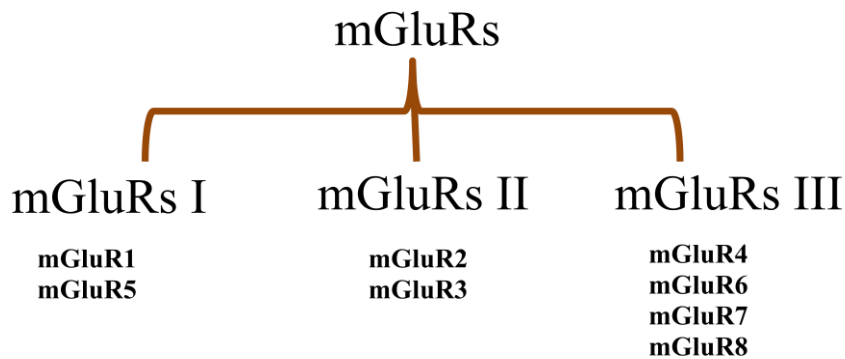


Figure 20 : L'organigramme de différents types de récepteurs métabotropiques glutamatergiques

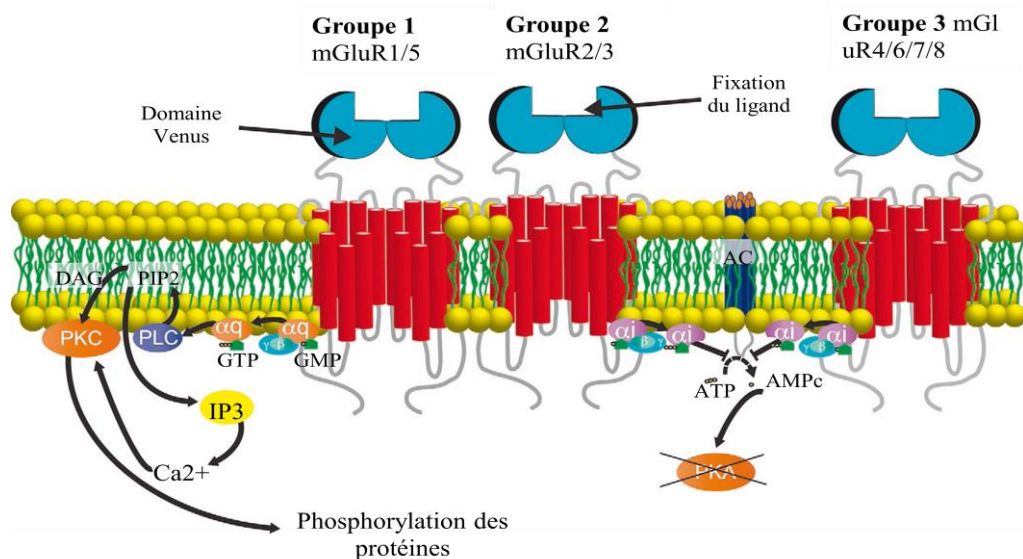


Figure 21 : Illustration schématique de différents groupes de récepteurs métabotropiques du glutamate : groupe I, II, et III. Tous les récepteurs contiennent un large domaine extracellulaire connu sous le nom "Venus domaine". Ces domaines contiennent le site de liaison du glutamate et autres substances. Les récepteurs mGluR1 et mGluR5 sont couplés à la protéine G: $G_{\alpha q}$. Ce dernier active la phospholipase C (PLC) qui hydrolyse phospholipid phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5) P₂) pour générer le DAG et l'IP₃ pour augmenter le Calcium intracellulaire et activer le PKC. Le groupe II et III sont couplés à la protéine G inhibiteur : $G_{\alpha i}$. L' $G_{\alpha i}$ activé inhibe la conversion d'ATP en AMPc par l'adénylyl cyclase (AC), conduisant à une diminution de l'activation de protéine kinase A (PKA) (Kolber, 2015).

1) Le groupe I: mGluR1, mGluR5 :

Ce groupe I contient le mGluR1 et mGluR5. Ce groupe de récepteurs (mGluR1 et mGluR5) est exprimé principalement au niveau post-synaptique par rapport aux afférences primaires, sur différents types cellulaires au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière au niveau des inter-neurones GABAergiques inhibiteurs, au niveau des neurones de projection, et au niveau de cellules gliales (Valerio et al., 1997; Jia et al., 1999).

Il est couramment admis que le fonctionnement des systèmes intégrés dépend de l'organisation de la connectivité au sein d'un groupement de neurone et des propriétés intrinsèques de ces neurones. La flexibilité de ce fonctionnement dépend du contrôle des propriétés intrinsèques neuronales par des influences synaptiques modulatrices tel que des influences synaptiques agissant sur des récepteurs métabotropiques. Comme déjà signalé, le réseau de la corne dorsale de la moelle épinière constitue un relais du système sensoriel dont le fonctionnement est extrêmement plastique. Les travaux de V. Morisset et F. Nagy ont permis de mettre en évidence l'importance de l'implication des propriétés calcium dépendantes (potentiels de plateau) dans l'intégration des messages nociceptifs au niveau de la corne dorsale chez le rat. Ils ont notamment démontré le rôle essentiel joué par des propriétés de plateau et également leur modulation positive par les récepteurs métabotropiques du groupe I (mGluRs I) comme facteur de sensibilisation des neurones de la corne dorsale. Autrement dit, l'activité des canaux calciques de type L est influencée par celle des récepteurs métabotropiques au glutamate de groupe I (Morisset et Nagy, 1999; Derjean et al., 2003; Heinke, 2005). Le Wind-up, comme le potentiel du plateau est modulé par l'activation des mGluRs I. En effet, il a été montré que les agonistes du mGluRs I peuvent induire des propriétés de plateau et le Wind-up chez des neurones, et/ou ils amplifient des propriétés préexistantes, alors que les antagonistes de mGluRs I bloquent les potentiels de plateau nécessaires pour l'expression de Wind-up (Russo et al., 1997; Morisset et Nagy, 1996 ; 1998; 2000), et le Wind-up (Budai et Larson, 1998).

Ces récepteurs mGluRs I en modulant donc positivement l'expression du potentiel du plateau et de Wind-up, jouent vraisemblablement un rôle important dans l'intégration et la transmission de l'information nociceptive au niveau des neurones de la corne dorsale. Toujours au niveau spinal central, l'administration intrathécale des agonistes des mGluRs I produit un comportement nociceptif : une hyperalgésie thermique, et une allodynie mécanique, et renforce la nociception dans la seconde phase dans le test d'inflammation à la Formaline (Fundytus, 2001 ; Neugebauer, 2001), alors que l'administration intrathécale des antagonistes réduit l'allodynie mécanique dans ce test et aussi bien dans l'inflammation à la carragénine (Neugebauer, 2001). Par conséquent, les études électrophysiologiques : l'enregistrement extracellulaire des neurones spinaux *in vivo* chez les animaux anesthésiés montrent que l'activation de ce groupe de récepteurs a un effet excitateur sur la réponse C nociceptive (Neugebauer, 2001), probablement par la facilitation de canaux calciques L. Dans le cadre de neuropathie (CCI), les études comportementales ont montré que l'administration intrathécale des antagonistes de mGluRs I atténue l'allodynie de type mécanique et l'hyperalgésie au froid chez les rats neuropathiques (Fisher etCoderre, 1998 ; Fundytus et al., 2001).

D'autre part, toujours sur le plan fonctionnel, les mGluR1 et mGluR5 participent à l'intégration de l'information nociceptive aussi bien au niveau périphérique qu'au niveau centrale spinal. À ce niveau périphérique, l'activation de ce groupe de récepteurs produit une hyperalgésie thermique chez la souris, cette hyperalgésie est significativement réduite par l'application des antagonistes de mGluR1 et complètement bloquée après le blocage de mGluR5 (Bhave et al., 2001; Zhou, 2001a). Chez le rat, le blocage de mGluR5 mais pas de mGluR1 réduit l'allodynie mécanique dans le contexte d'inflammation induit par le modèle CFA (Walker et al., 2001). Similairement, l'administration périphérique d'un antagoniste sélective de mGluR5 (MPEP) renverse l'allodynie mécanique dans le modèle de d'inflammation au Carragénine et CFA, avec aucun effet sur la mécano-nociception normale

(Walker et al., 2001). Encore, dans un test d'inflammation à la Formaline, les antagonistes de ce groupe de récepteur inhibe la deuxième réponse tardive mais pas la première réponse précoce du test (Bhave et al., 2001 ; Zhou, 2001b). Ces données suggèrent que les mGluRs I s'impliquent dans la maintenance de processus nociceptive périphérique associée à la douleur inflammatoire. D'autre part, dans les douleurs neuropathiques, les mGluR5 jouent un rôle essentiel. Dans le modèle de SNL par exemple, l'injection périphérique d'antagoniste de mGluR5 dans le côté ipsilatéral renverse l'hyperalgésie thermique, avec aucun effet chez les animaux sham opérés (Dogrul et al., 2000). Ces données suggèrent l'implication de mGluR5 dans le cadre des douleurs neuropathiques mais pas dans la réponse nociceptive normale. Ensemble, ces données montrent que les mGluRs I de groupe I jouent un rôle important dans la transmission nociceptive dans les contextes pathologiques au niveau périphérique.

Compte tenu de toutes de ces données, nous nous sommes alors intéressés dans ce présent travail au rôle des mGluRs I spinaux sur la transmission nociceptive, et la modulation positive des canaux cationiques de type L par ces récepteurs. Dans un deuxième temps, nous nous intéressons aux éventuelles modifications qui pourraient se mettre en place en situation de douleur inflammatoire, en utilisant un modèle d'inflammation périphérique (CFA).

2) Le groupe II: mGluR2, mGluR3 :

Le groupe II inclut les mGluR2, et les mGluR3. Ce groupe de récepteurs est exprimé au niveau de DRG et également au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (Jia et al., 1999 ; Carlton et al., 2001 ; Tamaru et al., 2001).

Sur le plan fonctionnel, au niveau périphérique, l'application de l'agoniste de ce groupe des récepteurs n'altère pas la sensibilité basale que ce soit mécanique (Yang et Gereau, 2003) ou thermique (Yang et Gereau, 2002). Cependant, dans le contexte d'inflammation périphérique (inflammation induite par l'injection de Carragénine), l'activation de ces récepteurs supprime

l'hyperalgésie thermique (Yang et Gereau, 2002) et mécanique (Yang et Gereau, 2003). Encore, une autre étude menée a montré que l'administration périphérique d'un agoniste de ces récepteurs atténue le comportement nociceptif induit par l'injection de Capsaïcine (Carlton et al., 2009). Ces données suggèrent que ces récepteurs jouent un rôle anti-nociceptif au niveau périphérique.

Au niveau de la moelle épinière, il a été montré que l'expression protéique de ce groupe des récepteurs augmente dans le cas de lésion de la moelle épinière (Spinal cord injury) (Mills et al., 2001). Quatre heures après l'inflammation induite par l'injection de CFA (agent inflammatoire), il a été mis en évidence une augmentation de l'ARNm de mGluR2 et mGluR3 (Zhang et al., 2009), et aussi une augmentation de l'ARNm de mGluR3 dans le contexte de l'inflammation induite par l'application des radiations ultra-violet au niveau périphérique (Boxall et al., 1998). L'activation de mGluR2/3 au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière induit une hyperalgésie de type mécanique chez les rats naïfs, alors qu'elle atténue l'hyperalgésie dans les conditions neuropathiques (Zhou et al., 2011).

3) Le groupe III : mGluR4, mGluR6, mGluR7, et mGluR8 :

Le groupe III inclut quatre types différents de récepteurs : mGluR 4, mGluR 6, mGluR 7 et mGluR 8. Au niveau de la moelle épinière, seulement le mGluR 4 et mGluR 7 sont exprimés. Des études immunohistochimiques ont montré que ces deux récepteurs sont exprimés préférentiellement au niveau des terminaisons des afférences primaires des neurones primaires au niveau des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière (Li et al., 1997 ; Azkue et al., 2001). Sur le plan fonctionnel, il a été mis en évidence l'implication de ces récepteurs dans le comportement nociceptif. L'administration d'agoniste (LAP4) de ce groupe de récepteurs n'a pas induit de comportement nociceptif spontané ((Fisher et Coderre, 1996a) et est sans effet sur la sensibilité thermique ou mécanique basale (Noda et al., 2003). Cependant, le blocage pharmacologique (MAP4) de ces récepteurs induit une

hyperalgésie mécanique et thermique chez les animaux naïfs (Noda et al., 2003). En plus, l'application d'un agoniste de ces récepteurs (LAP4) réduit le phénomène d'hyperalgésie mécanique et au froid dans le contexte de lésion nerveuse chronique (Fisher et al., 2002), et l'allodynie mécanique induite par la ligation du nerf sciatique (L5/L6) (Chen et Pan, 2005). Ces données suggèrent que l'activation de ces récepteurs dans les conditions pathologiques neuropathiques a un rôle analgésique au niveau central dans la corne dorsale de la moelle épinière.

CHAPITRE I

OBJECTIFS

Dans cette étude, nous nous intéressons aux modifications des propriétés neuronales intrinsèques et à leur participation dans les phénomènes de sensibilisation centrale à court et à long terme à la douleur. Nous avons décidé d'étudier dans ce présent travail la participation de ces propriétés neuronales intrinsèques et plus précisément, le rôle des canaux calciques de type L, à la fois *in vivo* chez l'animal et en utilisant une approche computationnelle. Autrement dit, ce premier chapitre de thèse a pour but de fournir une étude plus complète sur l'implication de chaque canal Cav1.2 et Cav1.3 dans deux formes de sensibilisation centrale à la douleur, avec une corrélation des données computationnelles et biologiques *in vivo* obtenues chez l'animal. Dans ce but, plusieurs questions ont été soulevées :

*Sensibilisation à court terme : le Wind-up a été choisi comme un modèle simple expérimental pour étudier le phénomène de la sensibilisation centrale à court terme. Ce processus a été étudié sur deux niveaux : le Wind-up de décharge neuronale au niveau spinal, et le Wind-up du réflexe nociceptif de flexion par l'électromyographie. Nous cherchons à répondre aux questions suivantes :

1/ Il a été montré que les canaux calciques de type L sont nécessaires pour l'expression du Wind-up *in vitro* ? Est-ce toujours le cas *in vivo* ?

2/ Si les canaux L sont bien impliqués dans le phénomène de Wind-up *in vivo*, quel est le rôle exact de chaque canal Cav1.2 et Cav1.3 sur l'expression de ce phénomène ?

3/ Les études menées *in vitro* sont réalisés chez des animaux jeunes. Existe-t-il une différence dans les mécanismes qui sous tendent le Wind-up des animaux jeunes et adultes ?

4/ Nous cherchons également à simuler l'activité neuronale en utilisant une approche computationnelle. Les données obtenues *in vivo* sont en accord avec les données de simulation obtenues par cette approche ?

*Sensibilisation à long terme : pour étudier cette forme de sensibilisation centrale à long terme, le modèle de neuropathie SNL a été utilisé. Nous nous sommes concentrés sur le rôle des canaux L (Cav1.2 et Cav1.3), et les éventuelles modifications qui se mettent en place dans le cas de neuropathie.

1/ Le Wind-up de décharge des neurones spinaux est-il modifié dans le contexte neuropathique ?

2/ Si oui, les canaux L : Cav1.2 et/ou Cav1.3 sont-ils impliqués dans ce changement ?

3/ De point de vue de comportement douloureux, est ce que ces canaux L (Cav1.2 et/ou Cav1.3) sont impliqués ? Quel est le rôle joué par chaque canal sur l'expression de l'allodynie mécanique?

En répondant à toutes de ces grandes questions posées, nous espérons pouvoir caractériser avec précision l'implication du chaque canal dans ce type de douleur pathologique neuropathique, et aussi avoir des éléments concrets permettant d'interpréter les différents types de régulation auxquels est soumis chaque canal dans ces conditions pathologiques.

MATÉRIEL & MÉTHODES

1) Animaux et conditions d'hébergement :

Dans le présent travail, nous avons choisi le rat comme modèle animal pour réaliser cette étude. Le rat est le mammifère d'expérimentation le plus utilisé: à peu près 20 % du nombre total de mammifères utilisés en recherche (Festing, 1979). Il est largement utilisé dans différents aspects de la recherche scientifique fondamentale: toxicologie, recherche cardiovasculaire, immunologie, immunogénétique, études comportementales, parasitologie, et cancer (Baker, 1980 ; Sengupta, 2013). Les deux souches de rats les plus répandues sont : *Wistar* et *Sprague-Dawley*.

Dans ce présent travail, les expériences ont été menées chez le rat adulte. Dans certaines expériences, le raton (rat jeune) a été également utilisé afin de comparer les données avec celui de l'adulte. D'un autre côté, nous avons décidé de réaliser cette étude chez les animaux mâles afin d'éliminer toutes les modifications hormonales liées aux cycles sexuels féminins. Les animaux proviennent de la société commerciale "Janvier" (France), bénéficient d'un cycle jour/nuit de douze heures, hébergés en atmosphère régulée (pression et hygrométrie), avec un accès libre à la nourriture et d'eau. Ils sont hébergés dans des cages (60 cm L x 40 cm l x 25 cm h) collectives par groupes de 4 ou 5 individus, et ne sont utilisés qu'après une semaine de repos et d'habituation à l'animalerie du laboratoire afin qu'ils puissent s'acclimater au nouvel environnement et à la salle d'hébergement. Tous les efforts ont été faits afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés, le stress, la souffrance, et l'inconfort des animaux durant notre étude. Les animaux utilisés pour cette étude sont des ratons mâles jeunes (55-60g) et adultes (250-350g) de la souche *Wistar*. Les animaux qui présentent un déficit locomoteur ou une perte grave du poids au cours de l'étude ont été éliminés. À la fin de l'expérimentation, les animaux sont sacrifiés par une dose létale d'uréthane. Les expériences ont suivi les recommandations et les directives éthiques de l'International Association for the Study of Pain (IASP). Les protocoles de nos expérimentations ont été

approuvés par le comité local de Bordeaux (France). Le numéro de saisine de notre étude est le suivant : 330110005-A.

2) L'Immunohistochimie:

Les quatre groupes d'animaux : groupe contrôle, groupe sham, groupe SNL, et le groupe des rats traités par des molécules anti-sens ont été utilisés pour cette étude immuno-histochimique. Après avoir anesthésié les animaux et vérifier l'absence totale de réflexes en pinçant les pattes de l'animal, les animaux sont perfusés de manière intracardiaque avec une solution froide de Paraformaldéhyde (PFA) à 4% (0.1 M, pH 7.4). Des coupes de 30 µm sont réalisées au cryostat (Cryostat Microm, Bicester, UK). La double immuno-détection de Cav1.2 ou de Cav1.3, et de MAP2 (microtubule-associated protein 2, un marqueur neuronal somato-dendritique) a été ensuite effectuée. Les coupes ont été premièrement incubées durant toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire. Les anticorps primaires utilisés dans cette étude sont les suivants : anti-Cav1.2 et anti-Cav1.3 faits chez le lapin, et utilisés à 1:200 (Alomone), anti-MAP 2 fait chez la souris, utilisé au 1000^{ème} (Sigma). Après une nuit d'incubation, trois lavages successifs ont été effectués avant l'incubation avec l'anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire.

Les anticorps secondaires fluorescents utilisés sont les suivants : anti-lapin (1:200, Vecotor laboratories) fait chez la chèvre, et anti-souris (1:500, Invitrogen/Molecular probe) fait chez la chèvre, conjugués respectivement à l'Alexa 488 et 568 utilisés pour la détection secondaire. La spécificité des anticorps a été déterminée à priori dans notre laboratoire (Dobremez et al., 2005). L'étude immunohistochimique après le traitement par les molécules anti-sens a été effectuée après l'injection intrathécale de PNA anti-Cav1.2, ou PNA anti-Cav1.3, ou mismatch. Les coupes ont été montées entre lame et lamelle, ensuite, l'observation et l'acquisition des images ont été réalisées à l'aide de microscope confocale (Leica SP2, Leica Microsystems). La quantification du marquage des molécules d'intérêts est réalisée à l'aide du

logiciel "Image J" (version 1.42q) pour les analyses quantitatives. Le bruit de fond est ensuite soustrait à la fluorescence mesurée.

3) Approche computationnelle : modélisation et simulation :

- **Principe/Objectif :**

Les neurosciences computationnelles s'intéressent à l'étude des réseaux de neurones artificiels pour les neurosciences. L'objectif de l'approche computationnelle est d'effectuer des simulations de grands réseaux neuronaux dans des temps définis et la comparaison du comportement de ces réseaux artificiels vis-à-vis de réseaux biologiques réelles (Lytton, 1996). L'idée est de tester des hypothèses faites en neurosciences en réalisant des modèles de réseaux mimant des réseaux biologiques. Dans notre travail, l'étude du comportement neuronal est basée sur l'observation des variations du taux de décharge des neurones nociceptives WDR en présence et en absence de canaux ioniques d'intérêt (les canaux calciques de type L), dans le cadre de stimulations contrôlées expérimentalement.

- **Protocole:**

La simulation consiste à étudier les réponses de ce réseau à une série de stimuli répétitifs. Ces stimuli seraient appliqués sous forme de courants électriques directement sur les neurones cibles WDR (à la manière d'une électrode). La membrane du neurone contient une batterie de conductances dont les conductances intrinsèques contrôlant le PA (canaux sodiques et potassiques voltage dépendants, canaux sodiques persistant, canaux calciques voltage dépendants de type L, Canaux cationiques non spécifiques activés par le calcium, I_{k-ca} (voir la publication d'Aguiar)), des composantes non intrinsèques synaptiques (tableau 1) (récepteurs : les récepteurs NMDA, AMPA, NK1, et autres récepteurs excitateurs (le bruit (noise) synaptique excitateur) et inhibiteurs (récepteurs : GABA, et autres récepteurs inhibiteurs (le bruit synaptique inhibiteur)) et non synaptiques intrinsèques (tableau 2) (les

canaux ioniques : sodiques, potassiques, et calciques). Le bruit synaptique s'est ajouté afin de rendre le modèle plus réel, il sert à créer une incertitude, et il provient du caractère aléatoire des nombreux processus impliqués dans la transmission synaptique, d'où il est préférable de faire trois répétitions pour chaque condition expérimentale. Nous parlerons ici aux propriétés non-synaptiques intrinsèques et plus spécifiquement: les canaux calciques de type L : Cav1.2 et Cav1.3 que nous souhaitons étudier leur implication de manière spécifique dans le phénomène de Wind-up à la fois dans les conditions contrôles et pathologiques neuropathiques.

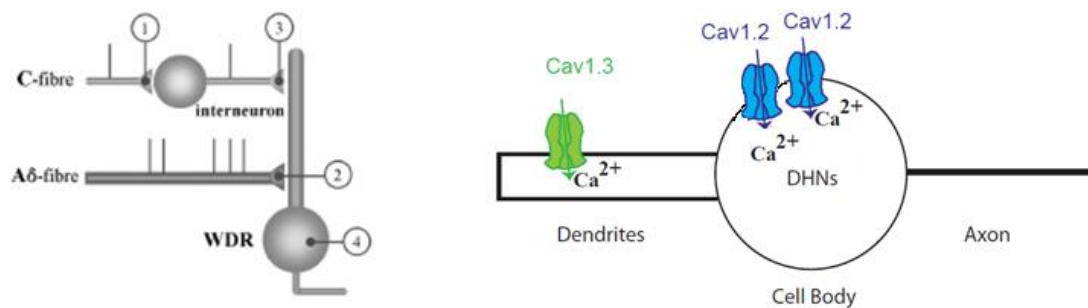


Figure 22 : Représentation schématique définie pour étudier l'implication de Cav1.2 et Cav1.3 dans le phénomène de Wind-up. A gauche : le réseau montrant la connexion entre les différentes parties : les afférences C font un contact synaptique (1) indirecte avec les neurones WDR (4) via les interneurons (3). Les afférences A-delta à leur tour contactent les neurones WDR directement (2).

La simulation a été réalisée sur le simulateur NEURON version 7.3 à température de 36°C selon le modèle d'Aguiar (Aguiar et al., 2010). Le neurone est composé par différents compartiments (Figure 22) : le corps cellulaire (cell body) de diamètre de 20 micromètres, les dendrites (longueur : 500 micromètres, diamètre 4 micromètres) et l'axone (longueur : 1000 micromètres, diamètre 1 micromètres). Dans ce modèle, la simulation est basée sur les propriétés cinétiques, d'expression et de distribution de deux éléments concernés (Cav1.2 et Cav1.3) obtenus avec l'approche biologique chez l'animal (le rat), et modulée bien sûr selon le contexte physiopathologique. Cav1.2 et Cav1.3 sont placés selon leur distribution biologique (Dobremez et al., 2005): le canal Cav1.2 est exprimé au niveau de corps cellulaire, alors que

le canal Cav1.3 est localisé au niveau du compartiment somato-dendritique. L'expression basale du canal Cav1.2 est deux fois plus que celui de Cav1.3. Concernant les propriétés cinétiques, le canal Cav1.3 s'ouvre et se ferme plus rapidement que Cav1.2 (Helton et al., 2005).

Pour rendre le modèle plus réaliste, les fibres C nociceptives sont connectées avec les neurones WDR via un réseau d'interneurones. Avec ce modèle artificiel modélisé, de nombreux comportements neuronaux peuvent être reproduits après avoir fixé les propriétés de protocole de stimulations : nombre de stimuli, durée de chaque stimulation, intervalle entre chaque stimulation, et la fréquence. Les résultats ont été ensuite présentés résumant le comportement dynamique du réseau.

Les composantes synaptiques	Conductance
gAMPA Cfiber to Interneuron	0.008
gNMDA C fiber to interneuron	0.004
gNK1 C fiber to interneuron	0.00002
gAMPA interneuron to WDR	0.0002
gNMDA interneuron to WDR	0.0002
gNK1 interneuron to WDR	0.000015
gGABA interneuron to WDR	0.0002
gExcitatory synaptic noise	0.001
gInhibitory synaptic noise	0.001

Tableau 1: Les composantes synaptiques g en S/cm²

	Le Corps cellulaire	L'axone	Les dendrites
gNaHH	0.04	0.04	0
gKHH	0.05	0.05	0
gCAV1.3	3.5 e-06	0	3.5 e-06
gCAV1.2	1.4 e-05	0	0
gCAN	0	0	0.00007
gKCa	0.0001	0	0.001
gNaP	0.0001	0	0
giA	0	0	0
gPas	0.000042	0.000042	0.000042

Tableau 2: Les composantes non-synaptiques g en S/cm²

4) Pharmacologie :

La Nicardipine hydrochloride (Sigma Aldrich, US), un inhibiteur des canaux calciques de type L a été préparée dans une solution stock de 10mM, stockée à -20°C, et ensuite diluée à la concentration appropriée au moment de l'emploi dans une solution physiologique NaCl à 0.9%. La drogue a été appliquée sur la moelle épinière à l'aide d'un cathéter pendant l'enregistrement du réflexe nociceptif de flexion.

5) La stratégie anti-sens: Génération de rat knock-down Cav1.2 et/ou Cav1.3:

La stratégie anti-sens (knock-down) a été utilisée afin d'arrêter l'expression d'une protéine en utilisant des molécules PNA (Peptid Nucleic Acids). Les séquences de ces molécules PNA (15 mers) ont été désigner pour cibler des régions spécifiques au niveau de l'ARNm de la molécule d'intérêt pour bloquer la traduction vers la protéine. Dans notre étude, ces molécules PNA ont été injectées chaque jour pendant quatre jours, une durée suffisante pour le turnover du canal concerné (Lambert et al., 1998; Dobremez et al., 2005). Afin de faciliter l'entrée de ces molécules dans les neurones, les PNA ont été couplées

avec un peptide nommé: transportan TP10 (AGYLLGKINLKALAALAKKIL-amide) (Soomets et al., 2000) via une liaison disulfide. Les molécules PNA ont été synthétisées via un synthétiseur de peptide "Applied Biosystems 433A" en utilisant la stratégie de *t*-Boc (Egholm, 1993; Koch, 1997). Le peptide de transport : Transportan TP10 a été synthétisé via un synthétiseur de peptide "Applied Biosystems 431A" et purifié en utilisant la technique de la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC) sur une colonne. La conjugaison a été performée dans une solution contenant DMSO/diméthylformamide/ acetic buffer à 0.1 M à pH 5.5 pendant une nuit (Pooga et al., 2002), et les produits ont été séparés selon la technique de la chromatographie liquide sous haute pression. Les différentes molécules PNA utilisées sont les suivantes : des molécules PNA dirigées contre Cav1.2 (PNA anti-Cav1.2), des molécules PNA dirigées contre Cav1.3 (PNA anti-Cav1.3), et des molécules PNA inactifs servent comme le contrôle (Mismatch PNA : ces molécules sont inactifs, il s'agit d'une séquence d'acides nucléiques séquencés d'une manière aléatoire, choisis en se basant sur la base des données (NCBI). Ces molécules ne ciblent aucune cible, utilisées comme contrôle pour voir si l'effet de nos anti-sens est réel, et non le fruit d'un effet propre à la manipulation. Les molécules PNA pour traitement anti-sens ont été obtenues dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire du Pr. Ulo Langel (Département de Neurochimie and Neurotoxicologie, Université de Stockholm, Stockholm, Suède). Les traitements sont administrés en aveugle.

PNA anti-Cav1.2: Cys-CGTGAGATTGTAATG

PNA anti-Cav1.3: Cys-GTTACTGATAGGTAG

PNA Mismatch: Cys-CGTGAATTAGTTAGG

La vérification/validation de l'efficacité du traitement anti-sens a été étudiée à deux niveau : l'expression de l'ARNm par la technique PCR, et l'expression protéique par l'étude de l'immunofluorescence (l'immunohistochimie).

6) Étude électrophysiologique : l'enregistrement extracellulaire *in vivo* :

- **La dissection :**

Cette étape consiste à réaliser une laminectomie dorsale au niveau du renflement lombaire de la moelle épinière lombaire pour effectuer l'enregistrement extracellulaire *in vivo*. Pour ce faire, une incision est pratiquée tout d'abord au niveau du renflement lombaire correspondant au site de projection des afférences primaires périphériques. Ensuite, le segment lombaire est fixé à l'aide des deux griffes. Les muscles sont dégagés à l'aide d'une pince délicatement et soigneusement afin de ne pas endommager la moelle. Sous contrôle d'une loupe, la dure mère (méninge) est ensuite retirée soigneusement à l'aide d'une aiguille de 27 G.

- **Le protocole de Wind-up: Enregistrement du Wind-up des neurones spinaux WDR:**

Les enregistrements extracellulaires de neurones spinaux WDR ont été réalisés à l'aide de pipette en verre de résistance de 2 M Ω (Harvard apparatus) remplie de NaCl à 684 mM. L'électrode d'enregistrement est ensuite descendu en utilisant "microdrive" (Unimécanique, France). La profondeur de tous les neurones enregistrés varie entre 652 \pm 83 to 762 \pm 43 μ m. Une fois le neurone est identifié, les stimuli électriques sont appliqués à l'aide d'une paire d'électrodes reliées à un générateur de courant (stimulateur), insérées sous la peau au centre du champ récepteur préalablement définie. Les réponses sont évoquées par une série de stimulations répétitives (quinze stimulations successives) à basse fréquence (1 hertz). On obtient plusieurs potentiels d'action en appliquant cette série de stimulations électriques (Suzuki et al., 2001): des potentiels d'action avec une latence de 0-20 ms correspondant à la réponse des fibres A bêta myélinisés, suivis de réponse des fibres A delta moyennement myélinisés (20-90 ms), et enfin la réponse des fibres C non myélinisés (la réponse C) obtenue 90-300 ms après la stimulation. La réponse obtenue au-delà de 300 ms est considéré comme "la post-décharge

neuronal''(PD). Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à mesurer la réponse C+PD. L'application successive de ces stimulations induit une augmentation progressive de décharge neuronale. Cette augmentation caractérise le phénomène de Wind-up. Le signal électrique correspondant à l'activité neuronale enregistrée est capté par l'électrode, amplifié par l'amplificateur (World precision instruments, DAM, AC différentiel amplifieur, USA), envoyé ensuite à l'Interface CED 1401, et à un moniteur audio, puis visualisé sur l'oscilloscope (DL708 E, Yokogawa France). Il est ensuite stocké sur l'ordinateur, et traité à l'aide du programme informatique *Spike 2*. Ce logiciel permet d'analyser les résultats (valeurs brutes). Les données ont été tracées avec le logiciel Prism (GraphPad inc.). Toutes les valeurs représentent la moyenne \pm SEM, et le 'n' représente le nombre d'animaux testés dans les enregistrements EMG ou le nombre des neurones WDR enregistrés.

7) Étude électromyographique chez le rat jeune et adulte:

Cette étude a été effectuée chez des animaux jeunes pesant 55-60 g, et des animaux adultes pesant 250-350 g dans le but de comparer le phénomène de Wind-up du réflexe de flexion chez les deux groupes d'animaux. Après avoir anesthésié l'animal, ce dernier a été placé dans le cadre stéréotaxique. Les enregistrements ont été faits sur le muscle biceps femoris à l'aide des électrodes constitués de deux fils d'acier inoxydable recouverts d'une gaine de téflon (diamètre 200 μ m, Phymep, France). Les extrémités des électrodes étaient courbées en forme de crochet. Les deux électrodes étaient ensuite introduites dans le muscle sural à enregistrer à l'aide d'une paire de pinces. Les stimuli électriques (1ms, single shock, master 8 stimulator, AMPI, Israel) ont été ensuite appliqués.

- **Le protocole de Wind-up: Enregistrement de Wind-up du réflexe de flexion:**

Nous avons enregistré les réponses électromyographiques après la stimulation électrique de centre du champ récepteur cutané du neurone localisé au niveau de la patte de l'animal. Une séquence de 15 stimulations a été délivrée à basse fréquence (1 Hz). Chaque séquence de 15 stimulations a été séparée par 5 min de repos pour éliminer les effets cumulatifs. Nous utilisons le logiciel "spike 2" pour détecter les unités myographiques. Le nombre de spikes a été ensuite calculé après chaque série de stimulations.

8) Analyse de l'expression de l'ARNm par la technique de la Réaction en Chaîne par Polymérase (PCR):

- **Extraction d'ARN et Rétrotranscription (RT):**

Les animaux sont sacrifiés par une dose létale d'uréthane, et les tissus concernés (la partie lombaire de la moelle) sont prélevés rapidement et conservés à -80°C jusqu'à l'utilisation pour les analyses de PCR. Les tissus ont été broyés et lysés, et les ARN sont extraits grâce au kit RNeasy mini (Qiagen). La quantité d'ARN a été mesurée à l'aide de spectrophotomètre.

La rétrotranscription RT (Synthèse d'ADN complémentaire simple brin à partir d'ARN) a été ensuite réalisée à l'aide du Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific) en suivant le protocole fourni. La RT est réalisée à partir de 1 µg d'ARN totaux (5' → 3') en présence de 4 µl de Reaction Mix du kit (reaction buffer, dNTPs, oligo(dT)₁₈ et amorces « randomhexamer »), 2 µl Maxima retrotranscriptase dans un volume finale du 20 µl de solution tamponnée. Les produits de la transcription inverse sont stockés à -20 °C jusqu'à la réalisation de la qPCR.

- **PCR quantitative (qPCR):**

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) quantitative est basée sur la détection et la quantification d'un indicateur fluorescent (SYBRGreen) dont

l'émission est directement proportionnelle à la quantité des produits générés pendant la réaction PCR. Elle fait donc le suivi de la fluorescence émise pendant la réaction avec un indicateur de production des amplicons (fragment d'ADN amplifié par PCR) durant chaque cycle.

La PCR commence par une étape de dénaturation (95 °C) qui sert à dénaturer l'hybride ARN/ADNc et durant laquelle l'indicateur fluorescent n'exhibe pas de fluorescence. Cette étape est suivie par l'étape d'hybridation (60 °C) où les amorces se fixent sur leur séquence complémentaire sur les brins d'ADN cibles, résultant en une émission de fluorescence. Enfin, durant l'étape de l'élongation (60 °C), les nucléotides s'ajoutent aux amorces en fonction de la séquence ciblée (nucléotide complémentaire), de plus en plus de molécules de SYBRGreen se lient en double brin permettant l'accroissement de la fluorescence qui peut être suivi au cours du temps. Le niveau de fluorescence est proportionnelle au nombre de copies d'ADN obtenues. La mesure de fluorescence est réalisée à la fin de l'élongation et la quantification repose sur le concept de "Threshold Cycle" (Ct) où le Ct correspond au plus petit nombre de cycles pour lequel l'intensité du signal fluorescent est supérieure au bruit de fond, et elle est proportionnelle au nombre de copies d'ADNc déjà présentes dans l'échantillon avant l'amplification : plus le nombre de copies est important, plus le Ct se fera tôt dans le cycle. La PCR en temps réel est effectuée dans un volume final de 10 µl contenant : 1 ng/µl d'ADNc, 2 µM des amorces spécifiques, du 2X du master mix pour RT-qPCR (SYBR *Premix Ex Taq* (TliRNase H Plus)). Les amorces utilisées sont les suivants:

Sdha Fw: 5' TGCGGAAGCACGGAAGGAGT 3'

Sdha Bw: 5' CTTCTGCTGGCCCTCGATGG 3'

Cacna1c Fw: 5' AAGCAAGAACAAACCACTG 3'

Cacna1c Bw: 5' TGACACAACCTACAATCGT 3'

Cacna1d Fw: 5' CCTCAACCATCGGTCTAGCA 3'

Cacna1d Bw: 5' GCACAGAAACCAGGAACCAG 3'

- **Analyse des résultats de la qRT-PCR:**

Les quantités d'ADNc sont déterminées en fonction du seuil cycle (Ct) en utilisant une gamme de dilution d'ADNc. Chaque échantillon d'ADNc dilué a été utilisé pour détecter la fluorescence. Les niveaux d'expression de gène de référence ont été aussi mesurés dans tous les échantillons et utilisés pour normaliser les données d'expression chez les gènes d'intérêt. Dans un premier temps, le ΔCt correspondant à la différence entre la moyenne du Ct du gène d'intérêt et du gène de référence (SDHA :succinate dehydrogenase complex-subunit A) a été calculé : $\Delta Ct = \text{moy Ct gène d'intérêt} - \text{moy Ct gène SDHA}$. Ce gène de normalisation est exprimé de façon constitutive et son expression ne varie pas en fonction de nos conditions expérimentales. Ensuite, nous évaluons les modifications d'expression entre les différentes conditions en suivant la formule suivante : $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ neuropathie} - \Delta Ct \text{ Saline}$. Le facteur de variation entre les deux conditions est mesuré par la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak, 2001).

9) Étude comportementale: Test de Von Frey électronique

La reconnaissance des signes de douleur chez l'animal est primordiale afin d'en évaluer la présence et ainsi de tester l'effet des molécules d'intérêt. Le test électronique Von Frey (Bioseb, France) a été utilisé afin de s'assurer l'induction d'une Allodynie de type mécanique qui caractérise la douleur neuropathique. Ce test est basé sur un instrument électronique permettant de déterminer le seuil de sensibilité à la douleur mécanique chez le rat (Figure 23). Ce test est mesuré selon la méthode suivante: L'animal est tout d'abord placé 60 minutes dans une cage à fond grillagé (permettant l'accès à la voûte plantaire) pour l'habituation, ensuite, une pression est appliquée avec la pointe de la pipette reliée à un capteur de force sur la surface dorsale dans la patte postérieure de l'animal jusqu'à ce que l'animal retire sa patte. Le seuil du retrait de la patte est enregistré comme la réponse à stimulus et affiché sur l'écran en grammes. Un seul essai se compose de trois applications sur une même patte avec une minute d'intervalle entre chaque application. Une valeur

moyenne des seuils est ensuite calculée pour chaque série d'applications. Afin d'éviter des éventuelles influences dues au rythmes circadiens, les études comportementales sont toujours réalisés dans la matinée dans les mêmes créneaux horaires.

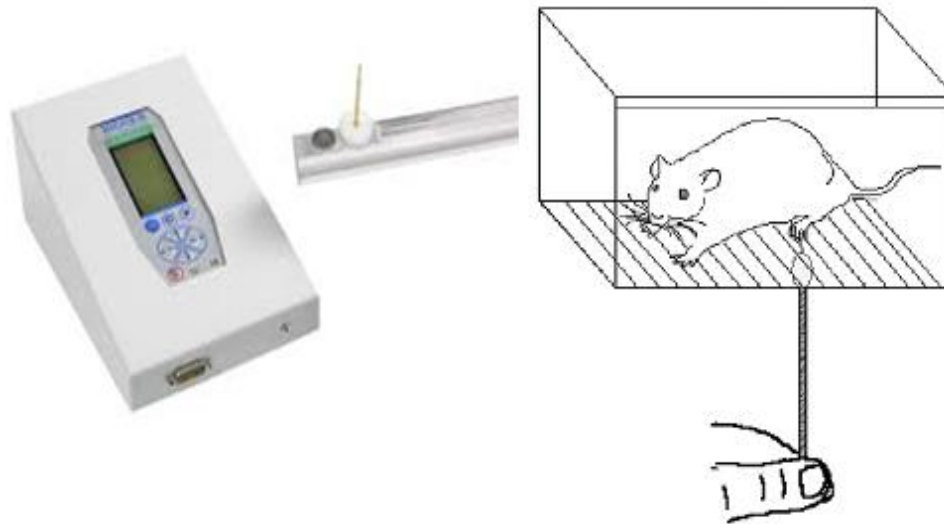


Figure 23 : Instrument du test de Von Frey : le test permet d'évaluer le seuil de réaction des rats suite à une stimulation mécanique appliquée sur la patte de l'animal. A gauche : système de l'embout de plastique (le stimulus) appliqué sur la face plantaire de la patte et du support électronique mesurant la force appliquée. A droite, animal dans la cage avec la plateforme grillagée.

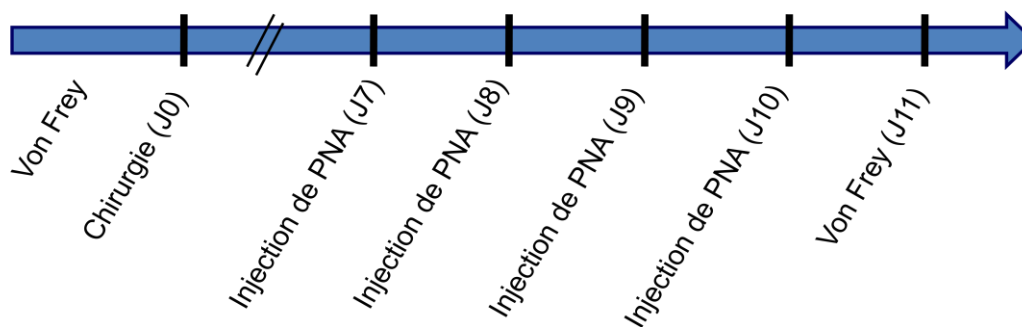


Figure 24 : La procédure expérimentale.

10) La procédure pour l'injection des molécules anti-sens :

Pour les injections de molécules anti-sens, nous avons suivi la même procédure des travaux antérieurs menés dans notre laboratoire (Fossat et al., 2010). Les rats sont d'abord anesthésiés par l'halothane à 5 % pour l'induction et à 2 % pour la maintenance. Le cathéter a été inséré dans l'espace sous-arachnoïdien et la pointe de cathéter a été poussée jusqu'à la région L5. La portion extrême du cathéter a été placée sous la peau jusqu'au cou. L'incision a été ensuite fermée par la suture. Les molécules ont été injectées en utilisant la seringue Hamilton connectée avec un cathéter suivi par l'injection de 10 µl saline (volume mort du cathéter). Les expériences ont été effectuées 24 heures après la dernière injection. Pour vérifier que l'injection de PNA a été effectuée dans la zone d'intérêt (la moelle lombaire), un volume de 10 µl de xylocaine a été injecté. Cette injection de Xylocaine entraîne une paralysie réversible des pattes de l'animal avec une récupération complète en quelques minutes. Cette paralysie est un argument en faveur de la bonne position du cathéter.

11) La procédure pour le modèle de neuropathie "Spinal Nerve Ligation" :

Pour réaliser le modèle SNL, le protocole Kim SH et Chung JM (Kim et Chung, 1992) a été utilisé. Le nerf L 5 droit a été tout d'abord isolé, la ligature est ensuite faite soigneusement à l'aide d'un fil de soie. D'autres rats subissent la même chirurgie à l'exception de la ligature du nerf spinal : les rats sham. Enfin, l'incision a été saturée. La chirurgie a été effectuée sous une anesthésie gazeuse générale par l'isoflurane 5% pour l'induction ensuite à 2% pour la maintenance, avec un mélange de l'air et de l'oxygène. Après la chirurgie, les animaux opérés reprennent leur activité dans une demi-heure.

12) Analyse statistique :

En fonction du protocole expérimental, les données brutes sont analysées par différents tests. Le test statistique utilisé est indiqué dans la légende de chaque

figure. Les analyses statistiques sont réalisées grâce au logiciel *Prism software*. Toutes les valeurs sont présentées sous la forme de moyenne \pm erreur standard à la moyenne (SEM). Le N représente le nombre d'animaux testés dans les enregistrements EMG ou le nombre des neurones WDR enregistrés. Le coefficient de Wind-up est calculé en utilisant cette formule : coefficient de Wind-up = $\sum (R1; R15) - (15 * R1)$. Le critère de significativité est $p < 0.05$.

RÉSULTATS

Les neurones WDR des couches profondes de la moelle épinière expriment un Wind-up de leur décharge, c'est-à-dire une forme de sensibilisation à court terme qui consiste en une augmentation progressive de la décharge des neurones en réponse à des stimulations répétitives des fibres afférentes nociceptives. Le Wind-up, *in vitro*, dépend de l'activation d'une composante synaptique (les récepteurs NMDA) mais aussi d'une composante intrinsèque des neurones spinaux calcium dépendant (les canaux calciques de type L). Dans ce chapitre, nous considérons la possible implication des propriétés intrinsèques et plus précisément le rôle de chaque canal Cav1.2 et Cav1.3 dans le phénomène de Wind-up à la fois dans les conditions contrôles et neuropathiques en utilisant deux grandes approches : biologique chez l'animal *in vivo* et computationnelle.

1) Cav1.3 est essentiel pour le Wind-up : approche computationnelle:

Afin d'étudier le rôle propre de chaque canal : Cav1.2 et Cav1.3 dans l'expression de ces deux phénomènes : les potentiels de plateau et le Wind-up, nous utilisons le modèle computationnel des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière. Dans ce modèle, pour simuler le rôle de chaque canal, nous nous basons sur les propriétés biologiques. Cav1.2 est exprimé au niveau du corps cellulaire selon les données immunohistochimiques, alors que Cav1.3 est localisé au niveau du compartiment somato-dendritique (Figure 25A et Dobremez et al., 2005). Pour l'expression basale de ces canaux, nous avons quantifié l'ARNm pour chaque canal et nous montrons que l'expression de Cav1.2 est deux fois plus que celui de Cav1.3 (l'expression de Cav1.3 est $44 \pm 1.6\%$ de Cav1.2, $p < 0,001$, Wilcoxon Signed Rank Test, $n=17$ rats).

Nous commençons tout d'abord par étudier la capacité des neurones WDR de générer les potentiels de plateau en présence et en absence de chaque canal : Cav1.2 et Cav1.3. Nous observons qu'en absence des canaux calciques de type L (Cav1.2 et Cav1.3), l'application d'un courant électrique (2 S) n'induit pas de potentiels de plateau mais induit une décharge tonique (voir figure 25-B1), alors que l'application des stimulations répétitives induit une décharge

constante (voir figure 25-B2). Cependant, en présence de Cav1.2 et Cav1.3, l'application de même stimulus (courant électrique 2 S) induit les potentiels de plateau suivis d'une Post-Décharge (voir figure 25-C1). Encore, en présence de Cav1.2 et Cav1.3, l'application des stimulations répétitives induit une augmentation progressive de la réponse neuronale ce qui caractérise le phénomène de Wind-up (figure 25-C2). Le coefficient de Wind-up est significativement différent : -7 ± 4 Cav1.3-/Cav1.2- VS 98 ± 2 Cav1.3+/Cav1.2+, $n=6$, $p < 0.01$, Mann Whitney, Figure 25 D et E).

A

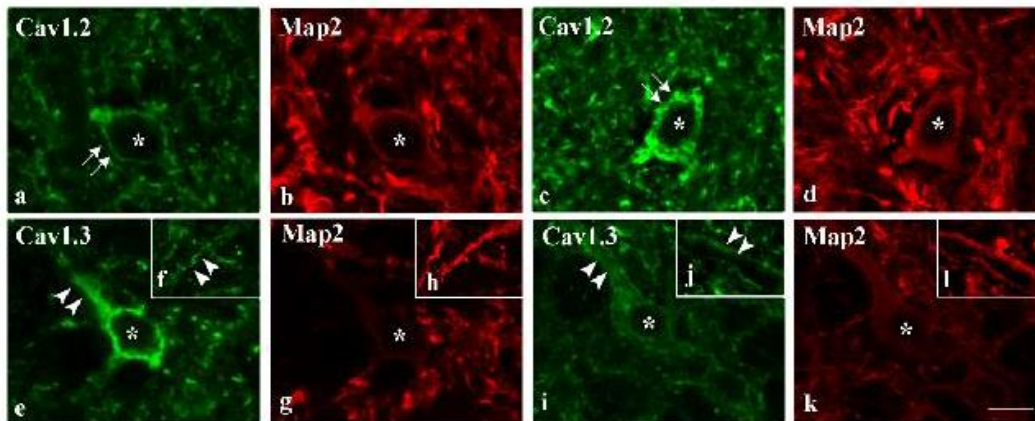


Figure 25 - A: Cav1.2 (a, c) et Cav1.3 (e, i) ont une distribution différentielle au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (b, d, g, k). Le marquage pour la Cav1.2 est localisé au niveau du soma (a et c), alors que la Cav1.3 est localisé à la fois au niveau du corps cellulaire et au niveau dendritique (e et i). Aucune modification de localisation des canaux calciques de type L n'a été marquée dans les conditions neuropathiques (c, i, et f) en comparaison avec les conditions contrôles (a, e et j).

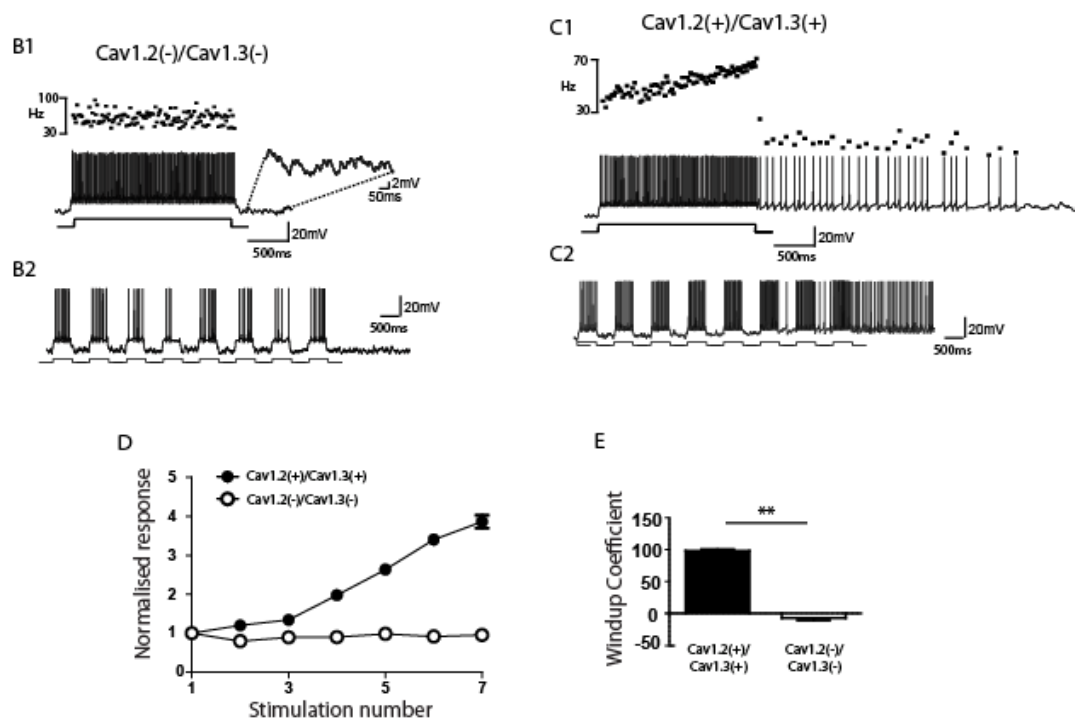


Figure 25 –B-C-D-et E : le modèle computationnel de décharge des neurones WDR en absence et en présence des canaux calciques de type L. B1et B2: les types de décharges de neurones de la corne dorsal en absence des canaux calciques de type L. B1 : en réponse à l’application d’un courant électrique (2s), les neurones montrent une décharge tonique. B2: La réponse des neurones à une série de stimuli (8 stimulations) répétitives (500ms). C1 et C2: le décharge de neurones en présence des canaux calciques de type L. En réponse à l’application d’un courant électrique (2s), les neurones expriment les potentiels du plateau suivi de post-décharge (C1). Suite à l’application d’une série de stimuli, les neurones expriment le phénomène de Wind-up, ils augmentent progressivement leur décharge au cours des stimuli suivie de post-décharge après l’arrêt de stimuli (C2). D: la réponse normalisée en présence et absence des canaux L. E: Coefficient de Wind-up en présence et en absence des canaux L.

Nous analysons ensuite l’implication de chaque canal sur l’expression des potentiels de plateau et du Wind-up. Ces deux phénomènes sont exprimés qu’en présence de Cav1.3 mais pas de Cav1.2 (figure 26 A1- A2). La conductance minimum nécessaire Cav1.3 pour l’apparition de plateau est de 10^{-6} S/cm² et l’amplitude maximum s’apparait à 10^{-5} S/cm² à 40pA (intensité de stimulation) (Figure 26 A3). Au contraire, en absence de Cav1.3 et en

présence que de Cav1.2, les neurones n'expriment pas le phénomène de Wind-up, ils n'expriment qu'une décharge constante (figure 26 B1-B2). Quelque que soit l'intensité de stimulation appliquée, aucune expression des potentiels de plateau n'est produite (voir figure 26 B3). Le coefficient de Wind-up est significativement différent entre les deux conditions : en présence de Cav1.3 et en absence de Cav1.2 (Cav1.3+ / Cav1.2-) et en présence de Cav1.2 et en absence de Cav1.3 (Cav1.3 - / Cav1.2+) (figure 26 C et D : 94 ± 1 . Cav1.3+ / Cav1.2- VS -3 ± 8 Cav1.3 - / Cav1.2+; $n = 6$, $p < 0,01$, Mann-Whitney test). Ensemble, ces données suggèrent que Cav1.3 (mais pas Cav1.2) est essentiel pour l'expression de ces deux processus : Potentiels de plateau et le Wind-up.

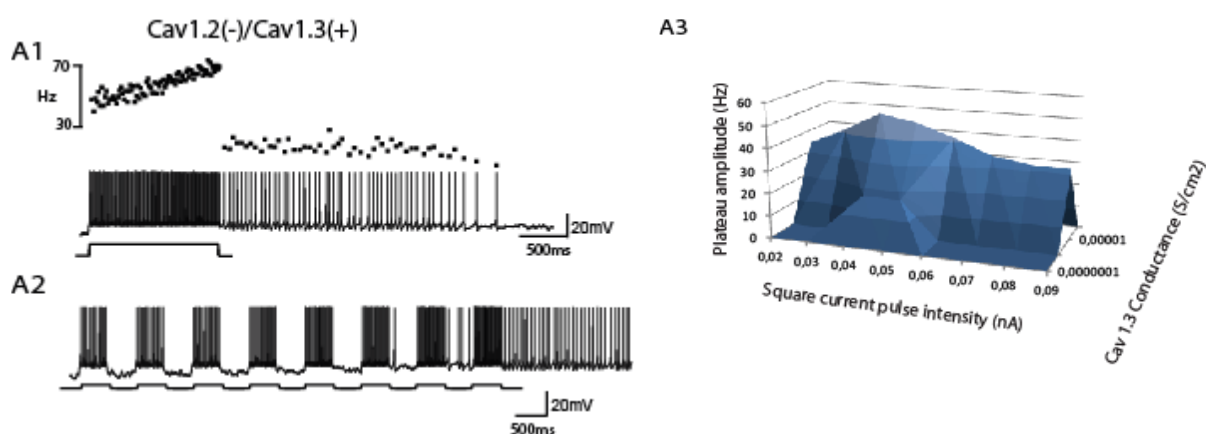


Figure 26- A: Rôle de Cav1.2 et de Cav1.3 sur l'expression des potentiels du plateau et Wind-up. Les figures A1 et A2 représentent le décharge neuronal après la suppression que de la Cav1.2 (Cav1.2 - / Cav1.3 +). En présence que de Cav1.3 les neurones sont capables d'exprimer le potentiel du plateau (A1) et Wind-up (A2). A3 : Diagramme montrant l'amplitude des potentiels du plateau selon l'amplitude de la conductance de Cav1.3 et l'intensité de stimulation. Le potentiel du plateau s'exprime à une faible intensité de stimulation (40pA) avec une faible conductance de Cav1.3 (0.5 μ S/cm²), et atteint son maximum à une intensité de stimulation de 40pA avec une conductance de 10 μ S/cm². Alors que la post-décharge commence à s'exprimer à une conductance de 5 μ S/cm² avec une intensité de 30pA.

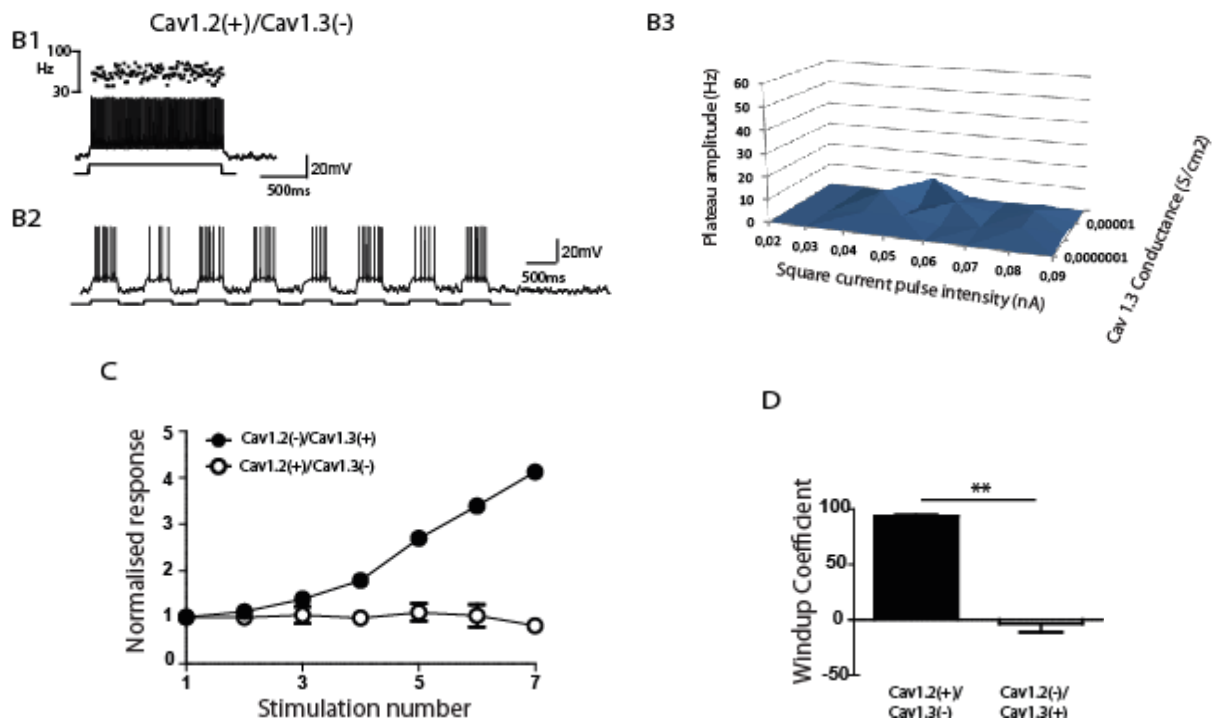


Figure 26 - B - C et D: Rôle de Cav1.2 et de Cav1.3 sur l'expression des potentiels du plateau et Wind-up. B1 et B2: la forme de décharge neuronale WDR après la suppression de la Cav1.3 (Cav1.3 - / Cav1.2 +). L'absence de Cav1.3 convertit le type de décharge : de plateau en décharge tonique (B1). Le blocage de Cav1.3 bloque l'expression de phénomène de Wind-up (B2), et de potentiel de plateau quelque soit l'intensité de stimulation appliqué (B3). C: l'expression du Wind-up qu'en présence de Cav1.3 mais pas de Cav1.2. D: comparaison de coefficient de Wind-up dans les 2 conditions : (Cav1.2 - / Cav1.3+) et (Cav1.3 - / Cav1.2 +).

Ensuite, nous avons voulu étudier le rôle des canaux L en présence d'une composante synaptique excitatrice (les récepteurs AMPA, NMDA and NK1). En présence des canaux L (Cav1.2(+)/Cav1.3(+)), l'application des stimulations répétitives induit le Wind-up (coefficient de Wind-up : 137 ± 1 ; n = 6, voir figure 27A, D1 et D2). Ce phénomène a été observé même en présence que de Cav1.3 ((Cav1.2(-)/Cav1.3(+)) : le coefficient de Wind-up 71 ± 12 , n=6, Figure 27 B, E1 and E2). Cependant, en présence que de Cav1.2 (Cav1.2(+)/Cav1.3(-)), le coefficient de Wind-up est : 14 ± 1 (n = 6, figure 27 C et E), probablement due à l'activation des récepteurs NMDA (figure 28).

Ensemble, ces données confirment que Cav1.3 est crucial pour l'expression du phénomène de Wind-up de décharge des neurones spinaux WDR. En plus, ces données confirment que la composante synaptique participe également à l'expression de ce processus : Wind-up. Au contraire, Cav1.2 n'a pas de rôle sur l'expression de ce phénomène de Wind-up. Afin de tester l'importance physiologique de ces résultats, nous utilisons l'approche biologique chez l'animal en s'intéressant à l'impact de blocage de chaque canal sur l'expression de Wind-up.

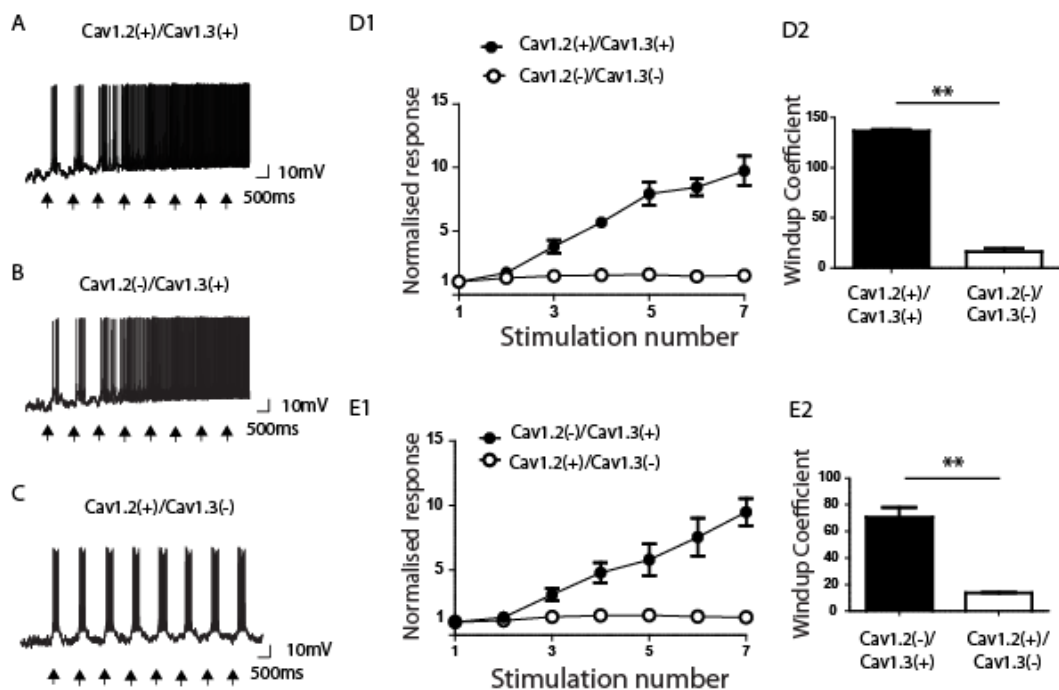


Figure 27: Le modèle computationnel des neurones WDR. A: la réponse des neurones WDR en présence des canaux L (Cav1.2(+)/Cav1.3(+)) à des stimulations. La réponse augmente progressivement au cours de l'application des stimuli. B: la suppression que de Cav1.2 (Cav1.2(-)/Cav1.3(+)) n'a aucun effet sur l'expression de Wind-up induit par des stimulations répétitives. C: en supprimant que la Cav1.3 (Cav1.2(+)/Cav1.3(-)), le Wind-up est diminué significativement et aucun post-décharge n'est observé. D1 et E1: ces deux figures représentent la réponse en fonction du nombre des stimulations dans chaque condition : (Cav1.2(+)/Cav1.3(+)) et (Cav1.2(-)/Cav1.3(-)), (Cav1.2(+)/Cav1.3(-)), (Cav1.2(-)/Cav1.3(+)). D2 et E2: Coefficient de Wind-up.

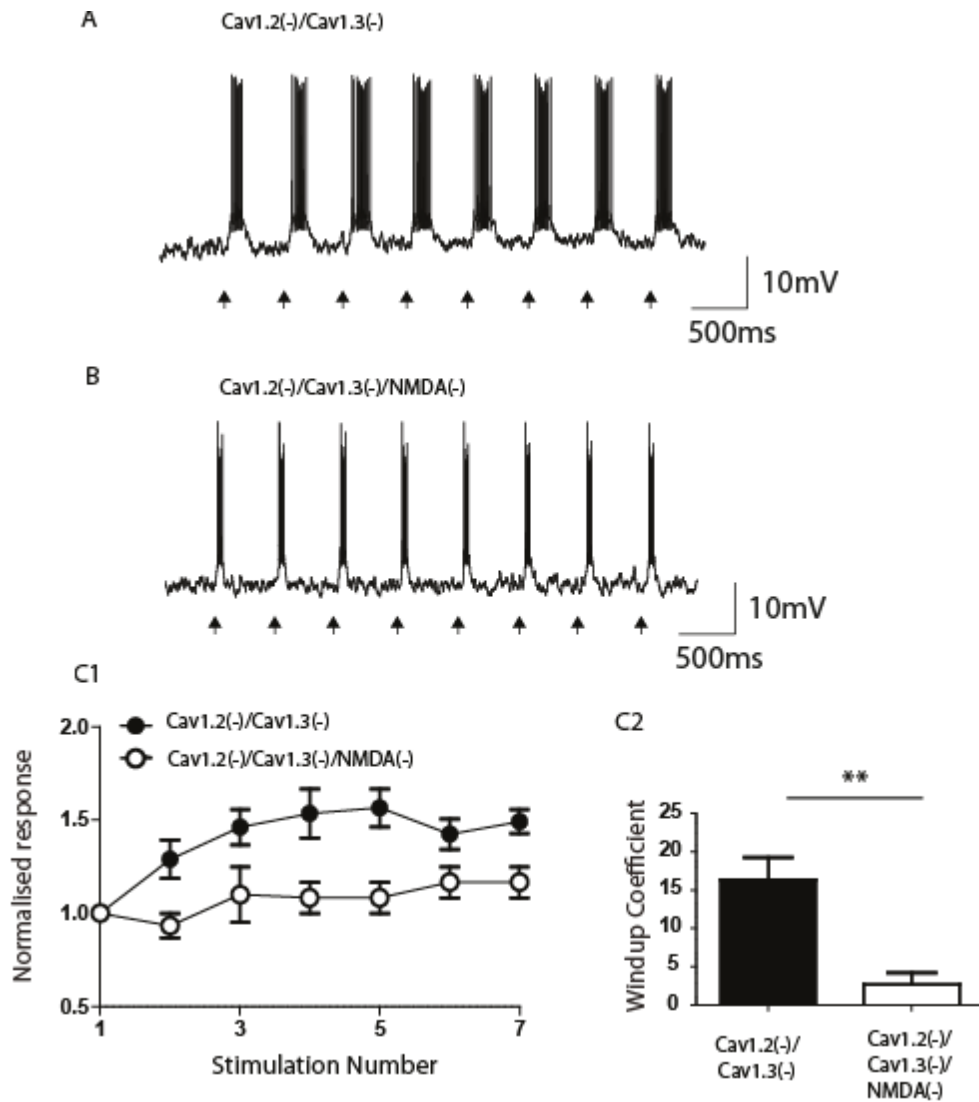
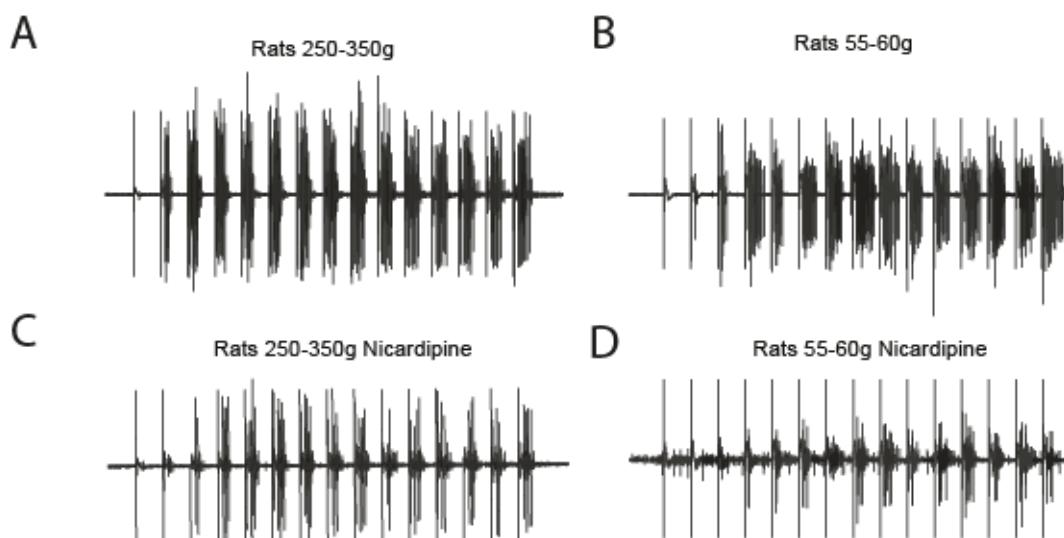


Figure 28: L'implication de la composante synaptique dans le phénomène de Wind-up. A: la figure présente la réponse des neurones WDR à des stimulations répétitives en absence des canaux calciques de type L (Cav1.2 et Cav1.3). B: le même protocole a été appliqué mais également en absence des récepteurs glutamatergiques : NMDA. C1: les récepteurs NMDA ont un effet sur l'expression de Wind-up. En absence de NMDAR, cet effet est bloqué. C2: Coefficient de Wind-up.

2) Le Wind-up du réflexe nociceptif de flexion est équivalent chez l'adulte et le jeune rat :

Nous cherchons à comparer le réflexe nociceptif de flexion chez les rats jeunes (âgé de trois semaines) et les rats adultes (âgé de deux au trois mois) afin d'étudier les éventuelles différences d'amplitude et des mécanismes moléculaires entre les deux tranches d'âges (figure 29). Le réflexe nociceptif de flexion est obtenu en appliquant des stimulations répétitives. La magnitude du

réflexe augmente progressivement au cours de l'application des stimulations répétitives caractérisant le phénomène de Wind-up de réflexe de flexion (Gozariu, 1997). Le nombre des unités musculaires activés augmente au cours de l'application des stimuli (Figure 29A, B). Nos résultats obtenus montrent qu'il n'y pas de différence entre l'amplitude de Wind-up du réflexe de flexion enregistré chez les deux groupes d'animaux (l'adulte et le jeune rat) (coefficient de Wind-up chez l'adulte (250-300g): 517 ± 148.7 et 511 ± 104.7 chez les rats jeunes (55-60 g) ($n=15$, $p=0.67$, Mann Whitney, Figure 29 E1, E2). Chez les deux groupes d'animaux, le Wind-up est supprimé après l'administration de Nicardipine (bloqueur des canaux L): chez les adultes: le coefficient de Wind-up avant Nicardipine : 397 ± 126 , alors qu'après l'application de Nicardipine, le coefficient devient : 48 ± 15.2 , ($n=7$, $p<0.05$, Wilcoxon matched-pair ranked). Chez les jeunes, le coefficient de Wind-up avant Nicardipine : 534 ± 126.6 , et après l'application de Nicardipine, le coefficient devient : 54 ± 34.8 , ($n=7$, $p<0.05$, Wilcoxon matched-pair ranked, Figure 29 F, G). Ensemble, le Wind-up est similaire chez les deux groupes d'animaux. Les expériences suivantes sont réalisées chez les deux groupes d'animaux. Dans les conditions contrôles, les expériences sont réalisées chez les rats jeunes (55-60g) et dans les conditions pathologiques (les rats neuropathiques), les expériences sont effectuées chez les rats adultes (250-350g).



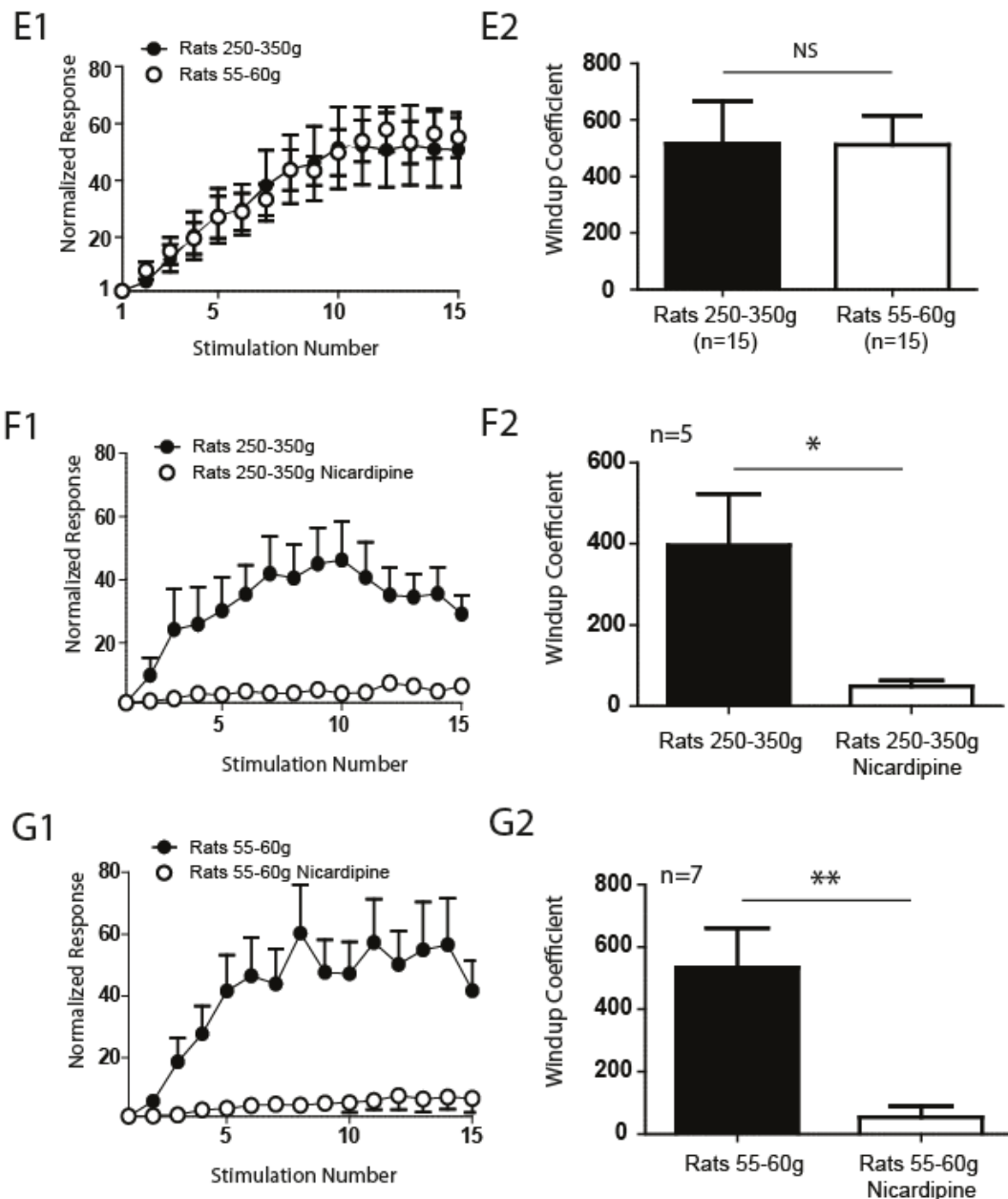
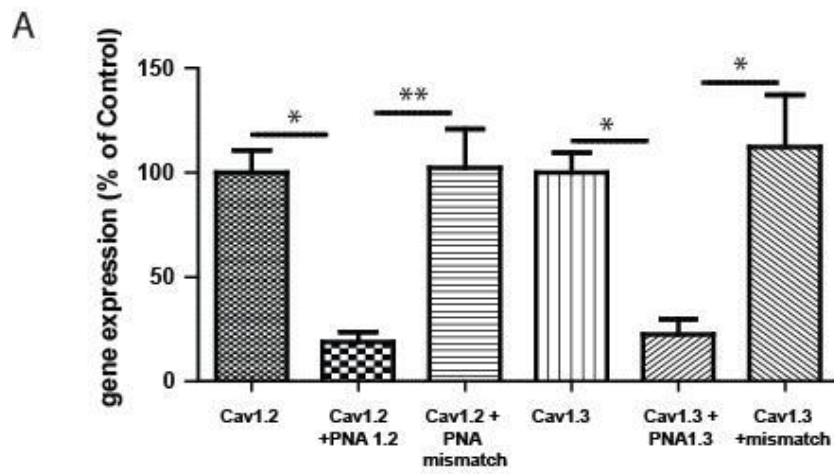


Figure 29: L'expression de Wind-up dépend des canaux calciques de type L chez le rat adulte et le rat jeune. A-D: enregistrement électromyographique en réponse à des stimulations électriques. A, C: La réponse enregistrée chez le rat adulte avant et après l'application de Nicardipine, bloqueur des canaux calciques de type L. B, D: La réponse enregistrée chez le rat jeune avant et après l'application de Nicardipine. E1: courbe de Wind-up (la réponse à chaque stimulation est normalisée par rapport à la première réponse). Les deux courbes se superposent presque parfaitement ce qui indique une sensibilisation équivalente chez l'adulte et le rat jeune. E2: Coefficient de Wind-up chez le rat adulte (histogramme noir) et chez le jeune rat (histogramme blanc). F1: la réponse enregistrée avant et après l'application de Nicardipine chez le rat adulte, et chez le rat jeune (G1). F2 et G2: Coefficient de Wind-up chez les deux groupes d'animaux.

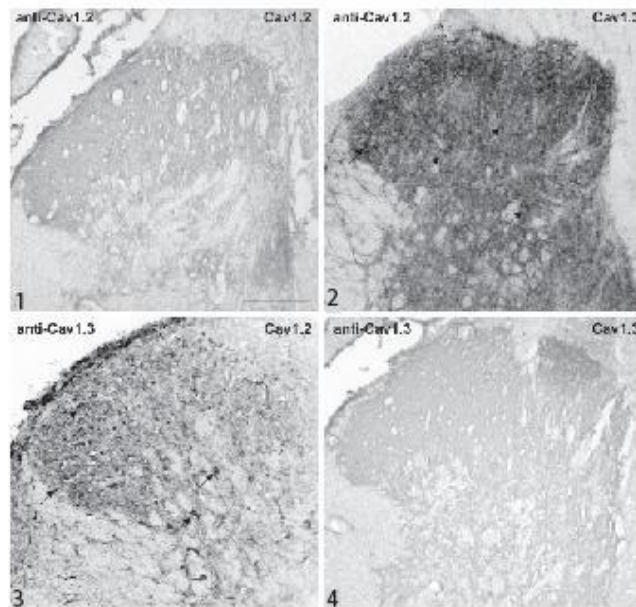
3) Validation du knockdown de Cav1.2 et Cav1.3 (stratégie d'anti-sens) : étude immunohistochimique et biochimique:

La stratégie anti-sens ciblée a été utilisée afin d'aborder précisément le rôle joué par chaque canal à la fois dans les conditions contrôles et pathologiques neuropathiques. Cette stratégie consiste à supprimer l'expression de Cav1.2 et/ou de Cav1.3. Pour ce faire, les molécules PNA: anti-Cav1.2, ou anti-Cav1.3, ou mismatch ont été injectées par la voie intrathécale une fois/jour pendant quatre jours, une durée suffisante pour le turn-over de la molécule d'intérêt (Dobremez et al., 2005). La vérification de l'efficacité et de la spécificité de ces molécules anti-sens a été évaluée au niveau de l'ARNm (RT-PCR) et au niveau protéique (figure 30). Nos résultats montrent que l'injection intrathécale de ces molécules anti-sens diminue significativement l'expression des ARNm ciblés (figure 30) : l'expression de Cav1.2 est $19\pm 5\%$ de la situation contrôle après l'injection de PNA anti-Cav1.2 ($p < 0.05$, Dunn's multiple comparison test), $102\pm 18\%$ de la situation contrôle après l'injection de PNA mismatch ($p > 0.05$, Dunn's multiple comparison test), ($n=6$ dans chaque groupe : contrôle, Anti-Cav1.2 et mismatch). Pour Cav1.3 : l'expression de Cav1.3 est $22.5\pm 7.4\%$ de la situation contrôle après l'injection de PNA anti-Cav1.3 ($p < 0.05$, Dunn's multiple comparison test), et $112\pm 25\%$ de la situation contrôle après l'injection de PNA Mismatch ($p > 0.05$, Dunn's multiple comparison test), $n=7$ pour le groupe contrôle, $n=4$ pour Anti-Cav1.3 et $n=5$ pour mismatch. Une étude immunohistochimique a été également effectuée pour évaluer l'expression de Cav1.2 et Cav1.3 après les injections de PNA (voir figure 30 B-D). Nos résultats montrent qu'il y a une diminution significative d'immunoréactivité après le traitement d'anti-Cav1.2 et anti-Cav1.3 (figure 30B). L'immunomarquage de Cav1.2 est significativement diminué après l'administration des molécules anti-Cav1.2 (figure 30 C, $57.4 \pm 9.4\%$ de la situation "sham", $p < 0.01$, Mann Whitney). L'injection des molécules PNA mismatch est sans effet sur l'immunomarquage de Cav1.2. Similairement, l'expression de Cav1.3 est diminuée significativement après l'administration des

molécules anti-Cav1.3, mais pas après l'injection des molécules Mismatch (figure 30D, $53 \pm 13.7\%$ de la situation 'sham', $p < 0.001$, Mann Whitney).



B



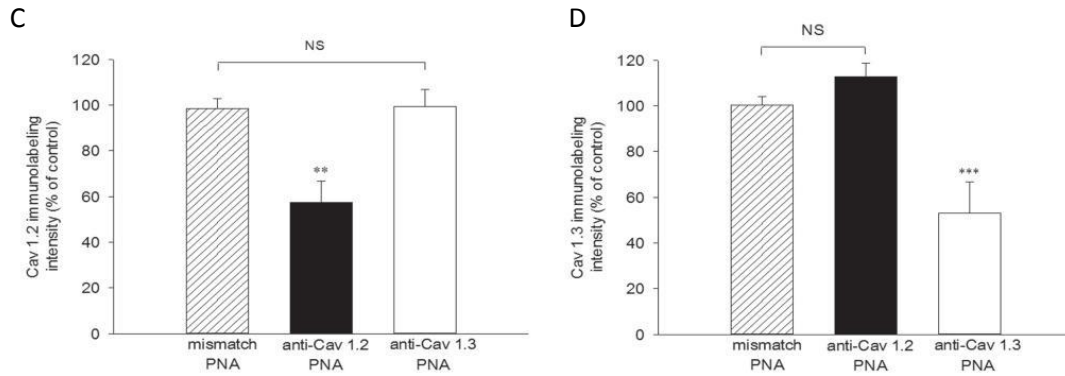


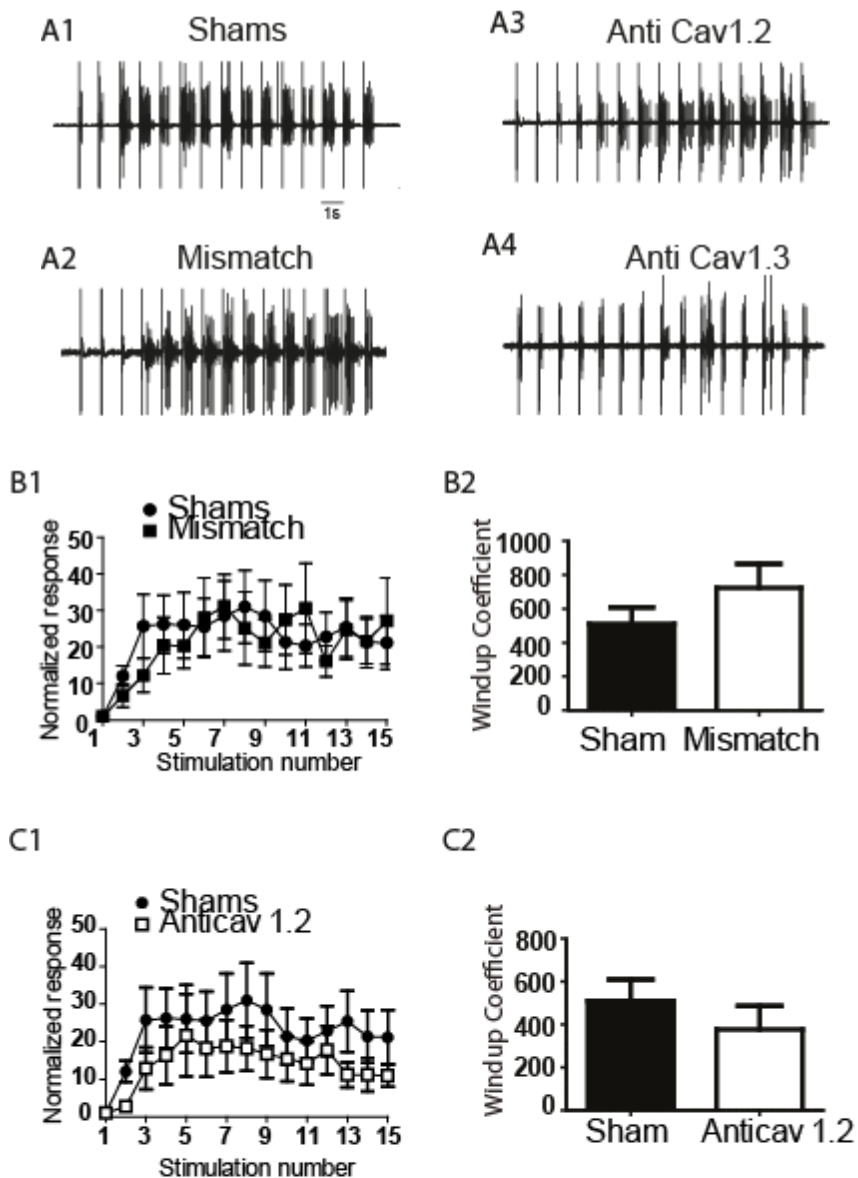
Figure 30: Le knock-down *in vivo* des canaux calciques de type L: Cav1.2 et Cav1.3 par la stratégie anti-sens. A: La figure représente l'expression de l'ARNm de Cav1.2 et Cav1.3 après l'injection des molécules PNA dirigés contre Cav1.2 ou Cav1.3. Ces molécules ciblent spécifiquement la molécule d'intérêt sans affecter l'expression d'autres molécules. B, C, et D: la figure montre l'immuno-marquage après l'injection intrathécale des PNA qui ciblent l'ARNm de Cav1.2 ou Cav1.3. Les résultats montrent qu'il y a une diminution d'expression de Cav1.2 après l'injection d'anti-Cav1.2 PNA, alors que l'injection d'anti-Cav1.2 PNA n'a aucun effet sur l'expression de Cav1.3 (B1, B2 et C). D'une façon similaire, le traitement anti-Cav1.3 PNA diminue l'expression de Cav1.3, mais sans effet sur celui de Cav1.2 (B3, B4 et D). Dans la figure B, les flèches représentent les corps cellulaires dans la corne dorsale de la moelle épinière.

En résumé, ces données obtenues nous permettent de valider le knock-down de la molécule concernée (Cav1.2 et Cav1.3), ils montrent que l'administration de PNA antisens induit une diminution de 50 % d'expression, une diminution suffisante pour induire un effet biologique (Fossat et al., 2010).

4) L'implication de Cav1.3 sur l'expression de Wind-up *in vivo*:

Après avoir validé le knockdown des canaux calciques de type L, nous nous intéressons aux conséquences de ce knockdown sur l'expression de Wind-up du réflexe nociceptif de flexion (figure 31). Nous observons que l'amplitude du Wind-up est similaire chez le groupe ayant reçu PNA mismatch et le groupe sham (Figure 31A1, A2, coefficient de Wind-up est 723 ± 142 , $n=8$, pour le groupe mismatch, et 510 ± 90 , $n=13$, pour le groupe Sham, $p=0.14$, Mann-Whitney test). De la même façon, nos données montrent que l'amplitude du

Wind-up n'est pas différent entre le groupe "sham" et le groupe traité avec PNA anti-Cav1.2 (Figure 31A3, coefficient de Wind-up est de 510 ± 90 , $n=13$ pour le groupe sham et 377 ± 110 , $n=8$ pour le groupe anti-Cav1.2, $p=0.49$, Mann-Whitney test, Figure 31 C1, C2). En revanche, l'invalidation de Cav1.3 supprime complètement l'expression du Wind-up du réflexe nociceptif de flexion (Figure 31 A4, coefficient de Wind-up est de 510 ± 90 , $n=13$ pour le groupe Sham et 39 ± 13 , $n=7$ pour le groupe anti-Cav1.3, $p=0.0004$, Mann-Whitney test, Figure 31D1, D2). Ensemble, ces résultats confirment le rôle essentiel de Cav1.3 sur l'expression du phénomène de Wind-up *in vivo*.



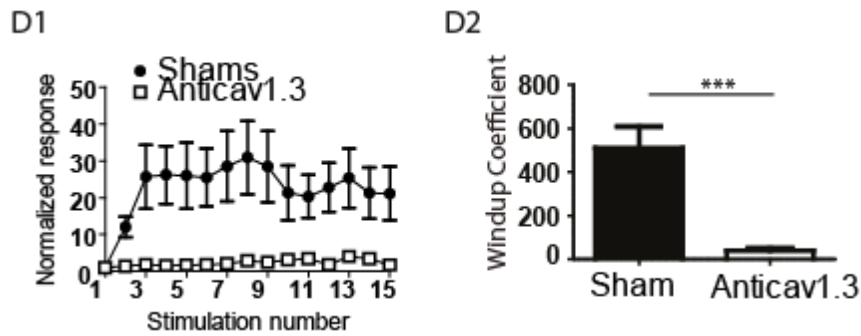


Figure 31: Cav1.3 est nécessaire pour l'expression de Wind-up du réflexe nociceptif de flexion. A1-A4: enregistrements électromyographiques chez le jeune rat du Wind-up du réflexe nociceptif de flexion chez les différents groupes : sham, mismatch, anti-Cav1.2, et anti-Cav1.3. B1: courbe de Wind-up (où la réponse à chaque stimulation est normalisée par rapport à la première réponse). B2: Coefficient de Wind-up. C1: courbe de Wind-up (où la réponse à chaque stimulation est normalisée par rapport à la première réponse) chez le groupe sham et chez le groupe traité avec des molécules PNA anti-Cav1.2. C2: Coefficient de Wind-up. D1: courbe de Wind-up (où la réponse à chaque stimulation est normalisée par rapport à la première réponse) chez le groupe sham et chez le groupe traité avec des molécules PNA anti-Cav1.3. D2: Coefficient de Wind-up.

5) Diminution de l'amplitude de Wind-up dans les conditions neuropathiques est Cav1.3 expression –dépendant :

Nous confirmons tout d'abord l'état neuropathique douloureux en utilisant le test de Von Frey afin d'évaluer la sensibilité des animaux aux stimuli mécaniques avant et après la procédure chirurgicale (modèle SNL). Nos résultats montrent qu'une semaine après la procédure chirurgicale, les rats montrent une forte allodynie mécanique caractérisée par une diminution significative du seuil de retrait de la patte de l'animal (de 74 ± 5 g à J0 à 30 ± 1.5 g à J7 après la chirurgie, $n=14$ rats, $p < 0.0001$, Paired t-test). Nous avons ensuite analysé la réponse neuronale des neurones spinaux WDR chez les rats adultes neuropathiques. D'une manière inattendue, l'amplitude de Wind-up de décharge des neurones WDR chez les rats neuropathiques est significativement diminuée en comparaison avec le groupe naïf. Chez le groupe sham,

l'amplitude du Wind-up n'a pas changé (Figure 32 A1-A2, coefficient de Wind-up est 66 ± 14 , $n=41$ cellules WDR SNL, 118 ± 4 , $n=119$ cellules WDR control, et 112 ± 16.5 , $n=6$ cellules WDR sham, $p < 0.01$: SNL vs Naïve, Dunn's multiple comparison test). Afin de comprendre ce résultat surprenant, nous avons émis l'hypothèse que dans les conditions neuropathiques, il y a un changement d'expression des canaux L (Cav1.3 et/ou Cav1.2). Nos données montrent qu'il y a une augmentation d'expression de l'ARNm Cav1.2, avec une diminution celui de Cav1.3 (Figure 32 B, l'expression de Cav1.2 chez les rats SNL est 215 ± 22.9 % de la situation sham, $p < 0.01$, Mann Whitney; alors que l'expression de Cav1.3 chez les rats SNL est $60 \pm 4.6\%$ de la situation sham, $p < 0.05$, Mann Whitney). Ces données ont été renforcées par une étude d'immunofluorescence confirmant une augmentation d'immunomarquage de Cav1.2 avec une diminution celui de Cav1.3 (Figure 32 C1-3, pour Cav1.3 : $56.2 \pm 11.6\%$; pour Cav1.2 : $132 \pm 7.3\%$, $p < 0.01$, Mann Whitney). Cependant, aucune différence sur la distribution spatiale des canaux L n'a été observée dans le contexte neuropathique (Figure 25 A). Pour mieux comprendre ces données, nous avons émis l'hypothèse suivante : sachant que Cav1.3 est crucial pour l'expression du phénomène de Wind-up chez les rats naïfs, nous proposons que la diminution d'expression de Cav1.3 dans les conditions neuropathiques est responsable de la diminution de l'expression de Wind-up dans les conditions pathologiques. Afin de tester l'hypothèse, nous avons utilisé le modèle computationnel en se basant sur les données biologiques concernant Cav1.2 et Cav1.3 obtenues chez l'animal dans les conditions neuropathiques (Figure 32 D). L'application des stimulations répétitives induit le phénomène du Wind-up, cependant son amplitude est bien diminué (Figure 32 D1 et D2, le coefficient du Wind-up est 104 ± 3 chez le groupe naïve/sham LTCs proportion et 50 ± 4 chez le groupe SNL LTCs proportion, $n=6$, $p < 0.01$, Mann Whitney). Ces données indiquent que l'amplitude de Wind-up est diminuée dans les conditions neuropathiques, et que cet effet est dépendant de l'expression de Cav1.3.

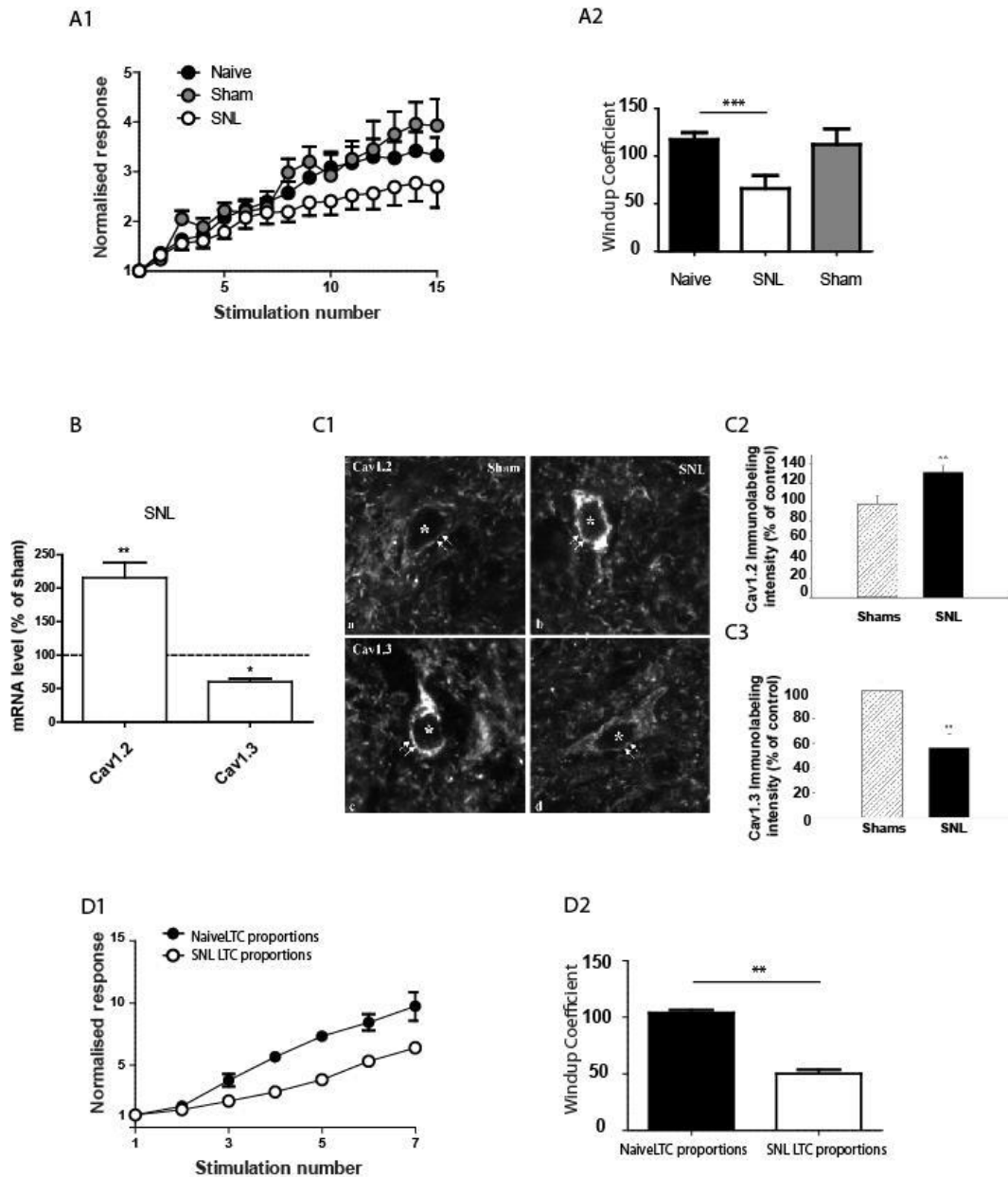


Figure 32 : Diminution d'expression de Cav1.3 et l'expression du Wind-up dans les conditions neuropathiques. A1: la réponse neuronale WDR en fonction du nombre des stimuli chez le groupe naïf, sham, et neuropathique. A2: Coefficient de Wind-up chez les différents groupes. B: les résultats de PCR révèlent qu'il y a une augmentation de 200 % d'expression de l'ARNm de Cav1.2, avec une diminution de 40% d'expression LTC de Cav1.3. C1: la figure représente la régulation d'expression de Cav1.2 (a, b) et de Cav1.3 (c, d). C2: le marquage de Cav1.2 est plus intense chez le groupe de rats SNL (C1b) en comparaison avec le groupe contrôle (C1a), alors que l'expression de Cav1.3 (C3) est plus intense chez le groupe contrôle (C1c) qu'au chez le groupe neuropathique (C1d). D1: la réponse des neurones en fonction du nombre de stimuli dans les conditions contrôles (points noirs) et neuropathiques (points blancs). D2: Coefficient de Wind-up.

Pour confirmer que la diminution de l'expression de Cav1.3 est bien responsable de la diminution de l'expression du phénomène de Wind-up dans le contexte neuropathique, la stratégie anti-sens a été utilisée. Dans un premier temps, nous avons confirmé que l'administration des PNA anti-Cav1.2 diminue significativement l'Allodynie mécanique en augmentant significativement le seuil de retrait de la patte de l'animal (Figure 33: à J11 après anti-Cav1.2, 71 ± 4.1 g, p (vs J0) = 0.057; à J11 après anti-Cav1.3, 29 ± 1.7 g, p (vs J0) < 0.01, paired t-test), alors que l'inactivation de Cav1.3 n'a aucun effet sur l'allodynie. Dans un second temps, avec la stratégie anti-sens chez l'animal, nous avons voulu vérifier si l'expression de Wind-up dans le contexte de neuropathie est dépendante de l'expression de Cav1.3. Les résultats montrent que les PNA anti-Cav1.3 diminue significativement le Wind-up, alors que les PNA anti-Cav1.2 ou PNA mismatch n'ont aucun effet sur le Wind-up (figure 34 : le coefficient : 66 ± 14 , $n=41$ pour le groupe SNL, 26 ± 10 , $n=19$ pour le groupe SNL traité avec anti-Cav1.3, 47 ± 13 , $n=20$ pour le groupe SNL traité avec anti-Cav1.2, et 66 ± 26 , $n=10$ pour le groupe SNL traité avec mismatch, $p=0.045$ pour SNL vs SNL+anti-Cav1.3, $p=0.40$ pour SNL vs SNL+anti-Cav1.2, et $p=0,9$ pour SNL vs SNL+ mismatch, Mann Whitney test). En résumé, nos données suggèrent que Cav1.3 est la composante principale pour l'expression de Wind-up à la fois dans les conditions contrôles et neuropathiques, alors que Cav1.2 est impliqué dans l'expression du phénomène d'Allodynie mécanique.

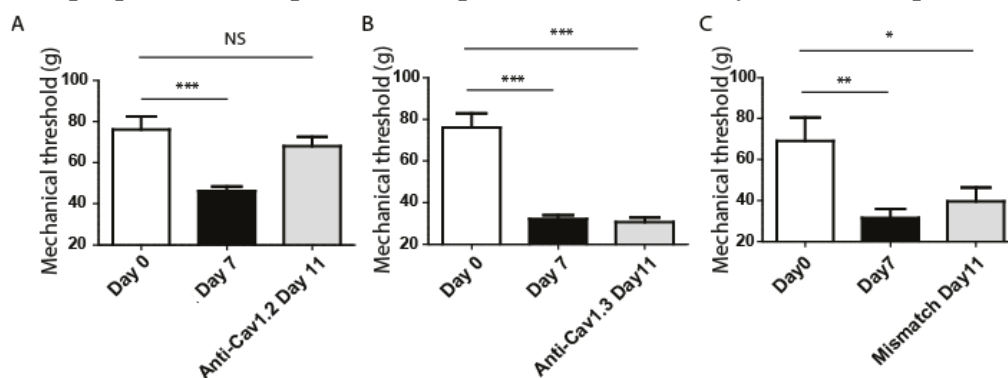


Figure 33: L'effet analgésique d'anti-Cav1.2 sur l'expression d'allodynie dans le contexte de neuropathie. A: Le modèle SNL induit une diminution significative du seuil de retrait de la patte à des stimuli mécaniques 7 jrs après la chirurgie (J7, p (vs jour 0) < 0.001, Repeated-measures ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test.). Des injections répétitives d'anti-Cav1.2 supprime l'Allodynie au J 11 (J11, p (vsDay0) > 0.05, Repeated-measures ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test). Le traitement anti-Cav1.3 PNA est sans effet sur l'expression de ce symptôme (B) (J11, p (vsDay0) < 0.001, Repeated-measures ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test). C: le traitement Mismatch n'a aucun effet sur l'allodynie (J11, p (vsDay0) < 0.05, Repeated-measures ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test).

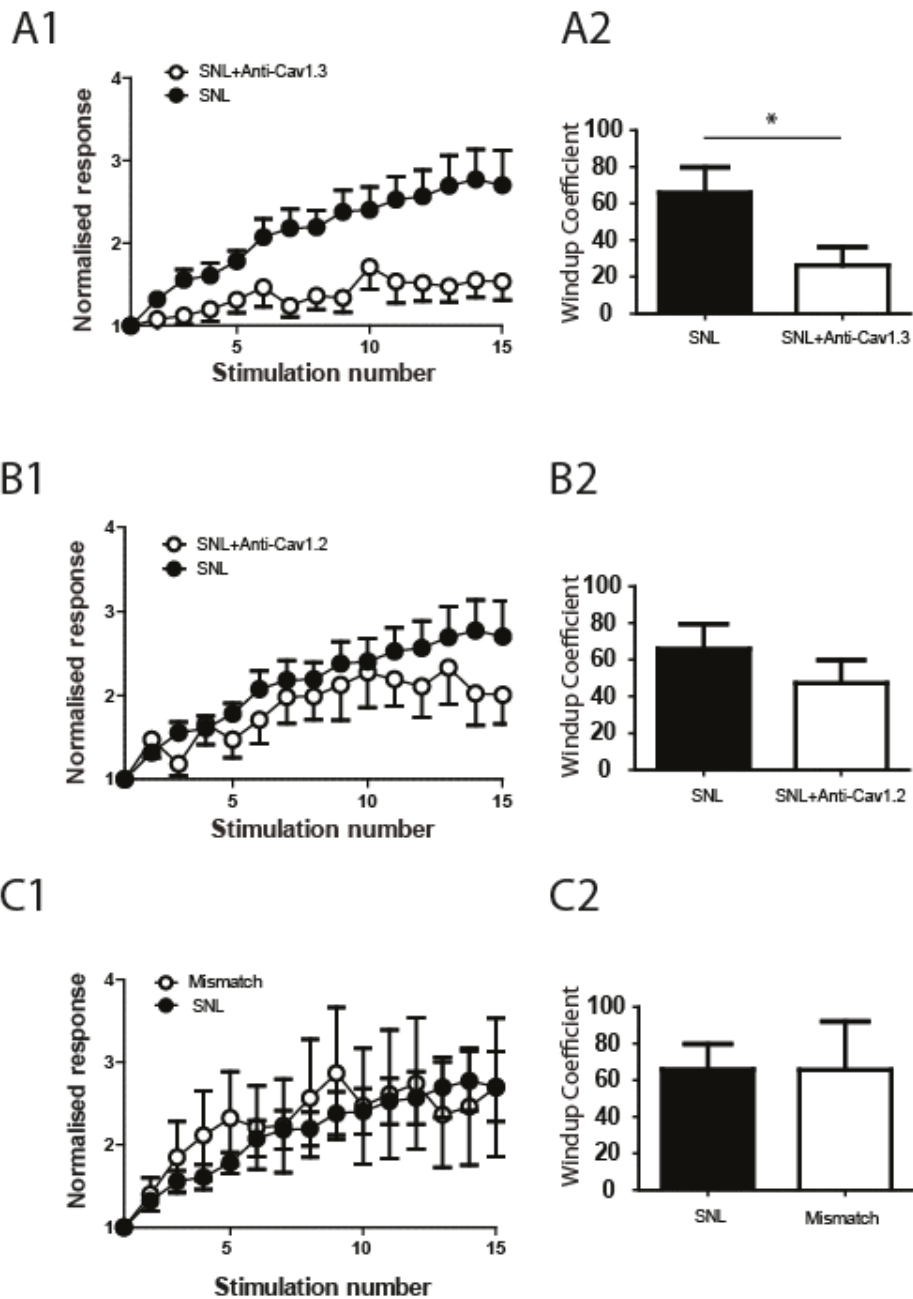


Figure 34: L'expression de Wind-up est Cav1.3-expression-dépendante dans les conditions neuropathiques. A1: comparaison de Wind-up chez les deux groups d'animaux: animaux SNL et animaux SNL traités avec anti-Cav1.3 PNA. Le traitement anti-Cav1.3 PNA bloque significativement l'expression de phénomène de Wind-up. A2: Coefficient de Wind-up. B1: comparaison de Wind-up chez les deux groups d'animaux: animaux SNL et animaux SNL traités avec anti-Cav1.2 PNA. Le traitement anti-Cav1.2 PNA a un effet très légère (mais pas significative) sur l'expression de phénomène de Wind-up. B2: Coefficient de Wind-up. C1: comparaison de Wind-up chez les deux groups d'animaux: animaux SNL et animaux SNL traités avec les molécules mismatch. Les deux courbes se superposent presque parfaitement ce qui indique que les molécules mismatch n'ont aucun effet.

6) Les Potentiels de Plateau et Wind-up dans la douleur neuropathique:

Nous avons souhaité comparer l'expression des potentiels du plateau et le Wind-up. Tout d'abord, en utilisant le modèle computationnel le rôle de chaque canal a été étudié sur l'expression des potentiels du plateau. Les résultats obtenus montrent que dans les conditions neuropathiques, les potentiels de plateau restent in affectés (Figure 35-A1 (naïve LTC proportion) et A2 (SNL LTC proportion)), que l'amplitude des potentiels de plateau est intensité de stimulation-dépendant, et que l'intensité minimum pour avoir une réponse maximale est bien inférieure dans les conditions neuropathiques en comparaison avec les conditions contrôles (Figure 35-A3). Au contraire, l'amplitude de Wind-up est significativement diminuée dans les conditions neuropathiques (Figure 35B). Ces résultats sont surprenants, des données de la littérature démontrent que les potentiels de plateau sont générés au niveau des dendrites des neurones (Hounsgaard and Kiehn, 1993), et que Cav1.3 est situé dans le compartiment somato-dendritique (Dobremez et al., 2005), et enfin nos études antérieures montrent (Fossat et al., 2010) et nos études au cours de ce présent travail confirment que dans les conditions neuropathiques il y a une diminution de l'expression de Cav1.3. Ces données indiquent que le phénomène de Wind-up et les potentiels de plateau sont deux phénomènes qui ne sont pas équivalents dans le contexte pathologique de douleurs neuropathiques.

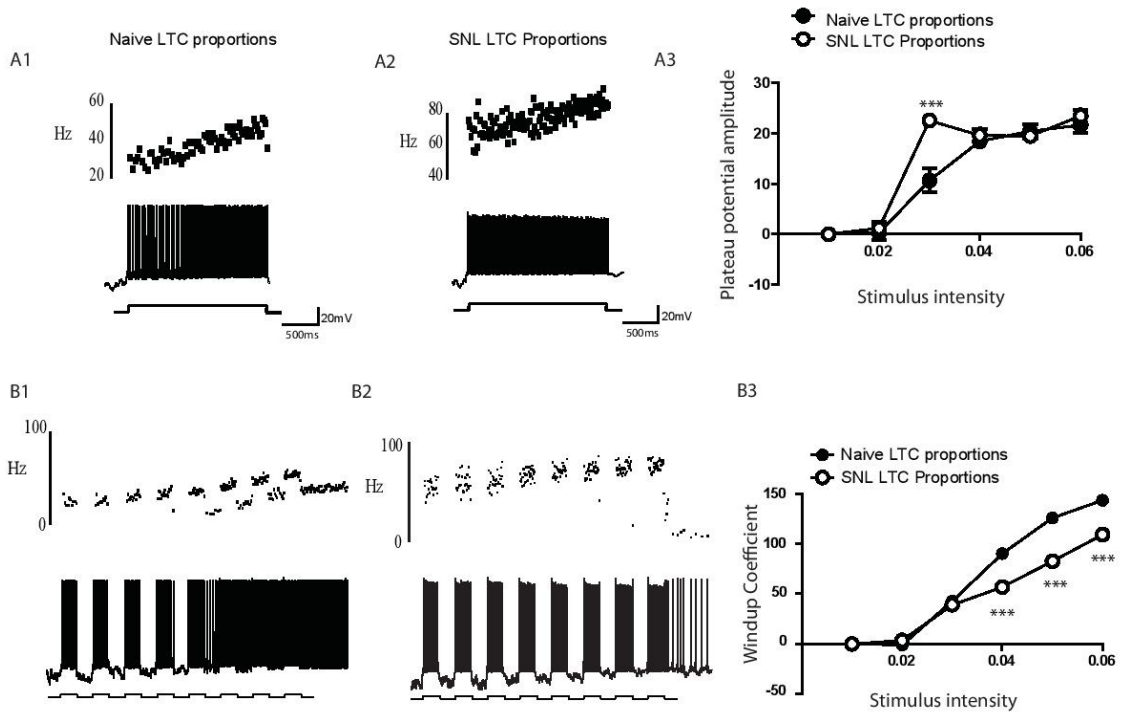


Figure 35: les potentiels du plateau et Wind-up ne sont pas affectés d'une façon similaire par le changement d'expression des canaux calciques de type L dans les conditions neuropathiques: approche mathématique. A: l'application d'un courant électrique (deux secondes) induit les potentiels du plateau chez les rats naïfs (A1) et neuropathiques (A2). L'amplitude de potentiels du plateau est similaire chez les deux groupes. Cependant, l'apparition de ces potentiels du plateau est intensité de stimulation-dépendante. L'intensité de stimulation pour avoir une réponse maximale chez les rats SNL est moins bien inférieure que celle nécessaire pour avoir une réponse maximale chez le groupe naïf (A3). B1: La figure de Wind-up induit par l'application des stimuli dans les conditions contrôles. B2: La figure de Wind-up induit par l'application des stimuli dans les conditions neuropathiques. B3: Le coefficient de Wind-up en fonction de l'intensité de stimulation.

Le schéma suivant représente une récapitulation des résultats obtenus :

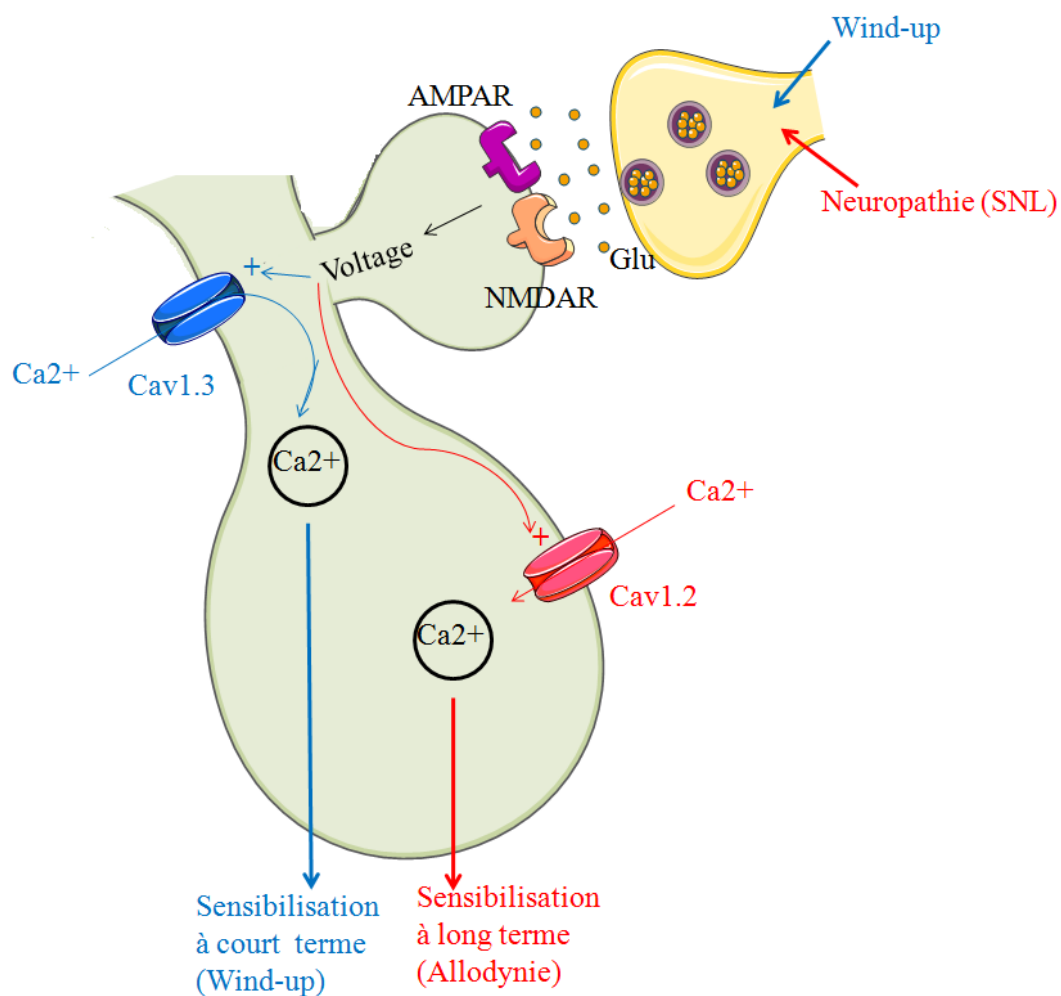


Figure 36 : l'implication des canaux calciques de type L dans la sensibilisation centrale à la douleur. Cav1.3 localisé au niveau dendritique est impliqué dans le phénomène de Wind-up, une forme de sensibilisation à courte terme, alors que Cav1.2 somatique s'implique dans la sensibilisation à long terme associée aux processus pathologiques. L'entrée du calcium via le canal Cav1.2 aboutit à des modifications géniques participant à la maintenance des états neuropathiques, ce qui indique que la source d'entrée du calcium dans la cellule est un élément clé.

DISCUSSION

Dans ce présent travail, nous avons entrepris l'étude électrophysiologique chez l'animal *in vivo* et computationnelle des propriétés intrinsèques des neurones WDR de la corne dorsale de la moelle épinière et de leur rôle dans le traitement des informations nociceptives à la fois dans les conditions contrôles et pathologiques de type neuropathiques.

L'influx de calcium dans les neurones de la corne dorsale est un facteur clé déterminant de la sensibilisation centrale à la douleur par l'augmentation de l'hyperexcitabilité neuronale. Le calcium agit d'une part en modulant les canaux membranaires via des seconds messagers intracellulaire, et d'autre part en modifiant l'expression génique, et donc en altérant l'expression des canaux membranaires, ou des récepteurs (Baranauskas et Nistri, 1998). Ces modifications liées à l'influx calcique sont considérées des éléments clés pour le passage d'une sensibilisation centrale à court terme, à la sensibilisation centrale à long terme à la douleur (Woolf, 1996). Via leur influx calcique, les canaux calciques de type L participent à l'intégration des messages nociceptifs au niveau spinal. Des études précédentes réalisées dans notre laboratoire *in vitro* avaient montré le rôle de ces canaux calciques de type L dans la transmission des informations nociceptives et plus précisément sur les potentiels de plateau (Morisset et Nagy, 2000), nécessaires pour l'expression de Wind-up (Russo et Hounsgaard, 1994; Morisset et Nagy, 2000), une forme de sensibilisation centrale à court terme. Cav1.2 et Cav1.3 sont les deux seuls iso-formes des canaux L exprimés dans la corne dorsale (Westenbroek et al., 1998). Nous avons souhaité préciser le rôle de chacun d'eux *in vivo* chez l'animal et avec l'approche computationnelle, dans deux formes de sensibilisation : à court et à long terme.

Nos résultats montrent que Cav1.2 et Cav1.3 jouent un rôle crucial mais différent dans la sensibilisation centrale spinale. Ils montrent que Cav1.3 mais pas Cav1.2 est essentiel pour l'expression du phénomène de Wind-up de décharge des neurones spinaux dans les conditions contrôles, processus qui représente la capacité des neurones à augmenter leur réponse à des entrées

nociceptives soutenues (Baranauskas et Nistri, 1998; Li et al., 1999). Les neurones spinaux WDR n'expriment le Wind-up qu'en présence de Cav1.3. Nos travaux ont également mis en évidence une composante synaptique essentielle dans ce phénomène de Wind-up (les récepteurs NMDA). Un léger Wind-up s'exprime en présence de Cav1.2 et les récepteurs NMDA. Cela, probablement due à l'activation des récepteurs excitateurs NMDA. Ce résultat concernant l'implication des récepteurs NMDA confirme les données bibliographiques (Baranauskas et Nistri, 1998; Herrero, 2000). Évidemment, l'intervention d'autres canaux calciques et/ou des récepteurs présents au niveau de la corne dorsale ne sont pas exclus dans l'expression de ce phénomène du Wind-up. Il a été montré qu'*in vivo* le blocage pharmacologique de Cav3 (une autre classe des canaux calciques) est capable de diminuer significativement l'expression du Wind-up (Matthews et Dickenson, 2001). D'autre part, sachant que le Wind-up est dû à une sommation des potentiels lents *in vitro* (Price et al., 1971), et que la substance P est capable d'induire les mêmes potentiels, son implication dans le phénomène de Wind-up a été ainsi suggéré. Des antagonistes des récepteurs de la substance P inhibent les potentiels lents provoqués par une stimulation des racines dorsales (Urban et Randic, 1984). Des études électrophysiologiques *in vivo* ont montré que l'administration intrathécale d'antagonistes des récepteurs de la substance P (NK1), le peptide DPDT (Kellstein, 1990) ou le RP67580 (Chapman et Dickenson, 1993) entraîne une diminution de Wind-up des neurones WDR de la corne dorsale de la moelle. Les récepteurs métabotropiques glutamatergiques (mGluRs) à leur tour participent au Wind-up. L'application iontophorétique de (1S, 3R)-ACPD, agoniste des mGluRs de groupe I renforce l'expression de Wind-up chez le rat (Morisset et Nagy, 1996). Cet effet est supprimé après l'administration de (S)-4-carboxy-3-hydroxyphenyl-glycine, antagoniste des mGluRs de groupe I (Budai et Larson, 1998). Il a été également mis en évidence que les opioïdes ont un effet dépressif sur le phénomène de Wind-up. L'administration directe dans la moelle épinière d'opioïdes induit une dépression de Wind-up des neurones de la corne dorsale (Dickenson et Sullivan, 1986). De la même façon,

l'administration intrathécale d'endomorphines 1 et 2 (agonistes des récepteurs opioïdes de type mu) induit une réduction significative du Wind-up des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (Chapman et al., 1997). Encore, une étude menée a montré que, quand il est administré par la voie intrathécale dans la moelle épinière, la Nociceptine (molécule qui agit au niveau des neurones comme les autres agonistes opioïdes) déprime le Wind-up *in vivo* des neurones de la corne dorsale (Stanfa et al., 1996). Quant à la sérotonine, Gjerstad et ses collègues (Gjerstad et al., 1996) ont étudié le rôle des récepteurs à la sérotonine 5-HT1A dans le Wind-up dans la corne dorsale *in vivo* chez le rat. Les résultats montrent que l'activation des récepteurs sérotoninergiques de type 5-HT1A réduit l'expression du Wind-up.

D'un autre côté, toujours dans les conditions contrôles, nous montrons que la présence de Cav1.3 est essentielle pour l'expression des potentiels de plateau, mécanisme neuronal intrinsèque d'amplification du signal afférent qui permet l'expression de Wind-up. Autrement dit, ces potentiels de plateau sont des mécanismes qui peuvent favoriser l'hyperexcitabilité des neurones qui les expriment, en permettant une fréquence de décharge élevée.

Nous nous sommes intéressés ensuite aux éventuelles modifications de ces différentes propriétés sur des neurones spinaux d'animaux neuropathiques. Les données montrent que la présence de Cav1.3 reste toujours essentielle pour l'expression de Wind-up même dans le cadre des douleurs neuropathiques. Il a été mis en évidence (Fossat et al., 2010), et nous confirmons dans cette étude qu'il y a une diminution de l'expression de Cav1.3 dans les conditions neuropathiques. Cette diminution d'expression est bien corrélée avec la diminution de l'expression de Wind-up dans ce contexte pathologique et aussi bien dans les conditions contrôles. En revanche, l'expression des potentiels de plateau restent in affecté chez les animaux neuropathiques. Ce résultat est étonnant étant donné que : i) Cav1.3 joue un rôle important dans la genèse des potentiels de plateau, ii) les potentiels de plateau sont générés au niveau des dendrites des neurones (Hounsgaard et Kiehn, 1993), iii) Cav1.3 est situé dans

le compartiment somato-dendritique (Dobremez et al., 2005), et iii) enfin, nos études antérieures montrent (Fossat et al., 2010) et ce présent travail confirme que dans les conditions neuropathiques il y a une diminution de l'expression de Cav1.3. Ce résultat peut être expliqué par le fait que Cav1.3 est la composante essentielle des courants L activée dans la phase précoce du plateau, provoquant la dépolarisation progressive du neurone et sa décharge, permettant l'activation de d'autres canaux tel que Cav1.2 à haut seuil dont l'expression est augmenté dans les conditions neuropathiques qui va laisser entrer le calcium nécessaire pour l'activation prolongée de d'autres canaux (tel que les canaux ICAN) et donc l'expression de ces potentiels de plateau. Bien que ce résultat reste surprenant, il est quand même en faveur de l'implication de ces potentiels de plateau dans la nociception, et dans la plasticité fonctionnelle qui y est associée, suggérant que ces propriétés pourraient participer au développement ainsi qu'au maintien de l'hyperexcitabilité centrale associée. Une des caractéristiques de la sensibilisation centrale à laquelle ces potentiels de plateau pourraient participer est l'augmentation de taille du champ récepteur cutané des neurones spinaux (Calvino et al., 1987 ; Cook et al., 1987 ; Laird et Cervero, 1989). L'expression des potentiels de plateau pourrait être un des moyens de transformer une réponse sous-liminaire en une décharge, et permettre ainsi une augmentation de taille du champ récepteur des neurones spinaux. D'autre part, ces données restent toujours étonnant puisque les potentiels de plateau sont strictement nécessaire à l'expression du Wind-up (Russo et Hounsgaard, 1994; Morisset et Nagy, 2000). Ces données suggèrent que d'autres facteurs peuvent être impliqués dans la genèse de Wind-up (autre que les potentiels de plateau), et que les potentiels de plateau et le Wind-up restent deux processus non équivalents dans les conditions douloureuses neuropathiques.

Il a été mis en évidence une distribution (Dobremez et al., 2005), et aussi bien une régulation (Fossat et al., 2010); et cette étude) différentielle de Cav1.2 et Cav1.3. Ces données supportent l'idée de rôle distinct de ces canaux dans la plasticité neuronale manifestée sous forme du comportement nociceptif. Toujours dans le contexte de neuropathie, nous avons alors cherché étudier le

rôle de chaque canal dans l'un des symptômes exprimé dans le cadre de douleurs neuropathique : l'allodynie mécanique. Afin d'aborder le rôle propre de chaque canal, l'inactivation spécifique par la stratégie anti-sens a été réalisée. Nos résultats montrent que l'administration des molécules PNA anti-sens complémentaires de la séquence de Cav1.2 a permis une réversion du comportement allodynique chez les animaux neuropathiques. Ces données confirment nos travaux antérieurs menés (Fossat et al., 2010). La réversion de ce comportement nociceptif permet de retrouver des mesures du seuil de retrait de la patte semblables à la situation préopératoire. Ces données illustrent à la fois le ciblage précis du mécanisme en cause et la puissance de ce mode de traitement par la stratégie anti-sens. D'ailleurs, il a été montré que dans le modèle SNL, il y a une augmentation de la phosphorylation de CREB, l'un des facteurs principaux de transcription, et l'altération d'expression génique qui caractérise le phénomène de sensibilisation à long terme (Fossat et al., 2010), et que le blocage de Cav1.2 (mais pas de Cav1.3) supprime cette augmentation de phosphorylation. Encore, le blocage de CREB reverse l'allodynie mécanique dans le modèle PNL (Ma et al., 2003). Pour les animaux ayant reçu des molécules PNA anti-Cav1.3, ce traitement sur le seuil douloureux est sans effet. À la fin du traitement, les animaux gardent un seuil bien significativement bas, en comparaison avec la situation préopératoire. Ces données sont en accord avec la littérature. La souris dépourvue de canal Cav1.3 ne présente en effet pas des modifications de la sensibilité nociceptive mécanique (Clark et al., 2003).

En résumé, ces données révèlent que les canaux calciques Cav1.2 et Cav1.3 régulent différemment la sensibilisation centrale. Cav1.2 joue un rôle crucial sur la suppression de l'allodynie (sensibilisation à long terme), probablement par son participation à l'expression génique associée à la douleur chronique neuropathique, alors qu'il n'a aucun rôle ou très limité sur l'expression du Wind-up, une forme de sensibilisation à court terme. Quant à Cav1.3, sa présence reste cruciale pour l'expression du phénomène de Wind-up avec aucun effet sur le comportement nociceptif. Cependant, l'expression de Wind-

up fait intervenir également une composante synaptique excitatrice (tel que: les récepteurs NMDA).

À la lumière de ces résultats, on peut penser que l'administration d'un antagoniste des canaux calciques de type L pourrait provoquer des effets bénéfiques sur la sensibilisation douloureuse en plan clinique. Bien que ces bloquants soient aussi employés pour leur propriétés anti-hypertensives et anti-arythmiques cardiaques, ce qui peut freiner l'utilisation de ces antagonistes par la voie veineuse, l'administration par la voie intrathécale semble alors plus pertinente. D'ailleurs, des études menées ont montré qu'ils ont des propriétés analgésiques chez les patients souffrants des douleurs cancéreuses (Filos, 1993), et qu'ils renforcent également les effets analgésiques de la morphine chez ces patients cancéreux (Vaupel et al., 1993; Santillan et al., 1994).

Encore, on peut aussi penser à l'administration d'une molécule anti-sens. Les approches thérapeutiques qui ciblent les changements de l'expression génique Cav1.2-dépendants peuvent être plus pertinentes que ceux qui ciblent l'expression des phénomènes à court terme (les potentiels de plateau et Wind-up Cav1.3-dépendants). Les voies de signalisation intracellulaire activées par Cav1.2 mettent en jeu les cascades des seconds messagers, aboutissent à l'activation du facteur de transcription CREB dans les modèles de douleur à long terme. L'entrée de calcium par le canal Cav1.2 surexprimé dans les conditions de neuropathie est susceptible de provoquer des transcriptions géniques aboutissant à des modifications durables des neurones spinaux. Cette plasticité serait responsable à long terme, expliquant les signes caractéristiques des états de douleur chronique. En effet, il a été montré que les gènes codants pour le cyclooxygénase 2 (Cox 2) sont activés en condition inflammatoire dans les neurones de la corne dorsale (Ji, 2003). Cette enzyme est responsable de la synthèse des prostaglandines, des molécules impliquées dans les processus inflammatoires. Il a été montré que Cox 2 modifié après le blocage de Cav1.2 participe à l'hyperexcitabilité des neurones de la corne dorsale après sensibilisation par des agents irritants (You et al., 2003).

CHAPITRE II

OBJECTIFS

La première partie de ce présent travail a permis de mettre en évidence le rôle des canaux calciques de type L dans les douleurs neuropathiques, nous avons donc voulu dans cette deuxième partie de généraliser les effets des canaux calciques de type L à d'autres types des douleurs : les douleurs inflammatoires. Dans ce cadre, nous souhaitons aborder les questions suivantes :

1/ Les canaux calciques de type L sont-ils également impliqués dans un autre cadre pathologique tel que le cadre de douleur inflammatoire ? Pourraient-ils être une cible intéressante dans le contexte inflammatoire ? Ou bien leur implication dépend du contexte pathologique ?

2/ Il a été montré que l'activité des canaux L est influencée par une composante excitatrice de type glutamatergique : par les récepteurs métabotropiques glutamatergiques de groupe I (mGluRs I) au niveau spinal. Quel est l'effet d'activation de ce groupe de récepteur sur la transmission nociceptive spinale dans les conditions contrôles et inflammatoires ? Cet effet est-il dépendant des canaux L ? L'effet d'activation de ce groupe de récepteur pourrait passer via les canaux L ?

3/L'activation des mGluRs I spinaux modifie-t-il efficacement les seuils de la réponse à la douleur ?

4/Les mGluRs I, groupe des récepteurs incluant le récepteur mGluR5 et le récepteur mGluR1. Quel est le rôle respectif de chaque récepteur à la fois dans les conditions contrôles et inflammatoires ?

Ce travail a donc pour objectifs la caractérisation des canaux L et/ou mGluRs I en tant qu'acteurs principaux dans le contexte inflammatoire ainsi que l'évaluation de leur intérêt comme cibles pharmacologiques dans le traitement des douleurs inflammatoires. L'ensemble des résultats est présenté dans le deuxième chapitre incluant une discussion.

MATÉRIEL

&

MÉTHODES

1) Animaux et conditions d'hébergement :

Pour cette partie, des rats adultes âgés de six à huit semaines de la souche *Sprague Dawley*, pesant entre 270-350g ont été utilisés. Les animaux proviennent de la société commerciale : "Janvier" (France). Les mêmes conditions d'hébergements citées dans la première partie ont été suivies pour éviter le stress de l'animal, ainsi les mêmes procédures d'éthiques ont été respectés pour le bien être de l'animal. Le numéro de saisine pour ce présent travail est : #3765.

2) Préparation des animaux pour l'électrophysiologie :

- **L'anesthésie et le maintien de l'animal :**

Les animaux sont placés tout d'abord dans une cage en plexiglas pour les pré-anesthésiés légèrement à l'Isoflurane à 5 % avec un mélange air/oxygène. Dès que l'animal s'est endormi, une injection intra-péritonéale de 1.5 g/kg d'Uréthane à 20 % lui est administrée, dose à la fois non toxique et permettant de le maintenir sous sédation tout au long de l'expérience électrophysiologique (Field, 1993). L'expérience débute après la vérification de l'absence totale de réflexes, à l'aide de pincement d'orteil ou de la queue. L'animal est ensuite installé sur un appareil stéréotaxique sur une plaque chauffante ($37 \pm 0,5$ °C) afin de prévenir l'hypothermie. Le rythme cardiaque (350-450 battements/min) est également surveillé durant toute l'expérience.

- **La dissection :**

Cette étape consiste à réaliser une laminectomie dorsale au niveau du renflement lombaire de la moelle épinière lombaire correspondant au site de projection des afférences primaires du nerf sciatique, pour effectuer l'enregistrement extracellulaire *in vivo* de Potentiel du champ C qui consiste d'enregistrer des potentiels de champ locaux (LFP : Local Field Potential), où les variations de potentiel d'une population neuronale d'une zone précise sont enregistrées grâce à une électrode extracellulaire. Le nerf sciatique est ensuite

exposé pour appliquer des stimulations. Le nerf sciatique est exposé au niveau de la cuisse, et maintenu dans une huile de Paraffine.

3) Électrophysiologie:

- **Technique d'enregistrement:**

Les enregistrements électrophysiologiques *in vivo* sont effectués en réponse à la stimulation électrique du nerf sciatique. La patience, la motivation et la surveillance continues sont des qualités nécessaires que l'expérimentateur doit avoir pour la réussite de ces expériences d'électrophysiologie *in vivo*. Tous ces enregistrements électrophysiologiques sont réalisés à l'aide de l'électrode en verre (Borosilicate glass capillaries), étirées (Model P-97 Flaming, Brown micropipette Puller, Sutter instruments CO, USA), et remplies d'une solution conducteur de chlorure de sodium à 4 %. Sous contrôle d'une loupe, et grâce à un micromanipulateur, l'électrode d'enregistrement est descendue délicatement dans la moelle épinière pour effectuer les enregistrements. Le signal électrique correspondant à l'activité neuronale enregistrée est capté par l'électrode, amplifié par l'amplificateur (World precision instruments, DAM80, AC différentiel amplifier, USA), envoyé ensuite à l'Interface CED 1401, et à un moniteur audio, puis visualisé sur l'oscilloscope (DL708 E, Yokogawa France). Il est ensuite stocké sur l'ordinateur, et traité à l'aide du programme informatique *Spike 2*. Ce logiciel utilisé permet d'analyser les résultats (valeurs bruts).

- **Mise en place de l'électrode de stimulation:**

Après avoir exposé le nerf sciatique, une électrode bipolaire (deux électrodes) constituée d'un câble conducteur (fil d'argent) est placée délicatement sous le nerf sciatique. Cette électrode est connectée avec un stimulateur (ISO-Flex, AMPI) qui permet de délivrer un courant électrique. Ce stimulateur est lui-même lié avec un générateur (90 Volts). En stimulant le nerf sciatique, on recherche le seuil d'apparition du potentiel du champ C qui varie généralement

entre 10 et 20V. Puis, on augmente l'intensité de stimulation d'une façon graduelle jusqu'à obtenir la réponse maximale (généralement avec une intensité qui varie entre 40 et 60V). On se place à une intensité de stimulation nécessaire à l'obtention d'une bonne réponse. La latence d'apparition de la réponse "potentiel du champ C" est 100-200 ms après la stimulation, due à la transmission de l'information par les fibres C non myélinisées (ne contiennent pas la gaine de myéline), après la réponse des fibres A bêta myélinisées et les fibres A delta moyennement myélinisées (figure 37).

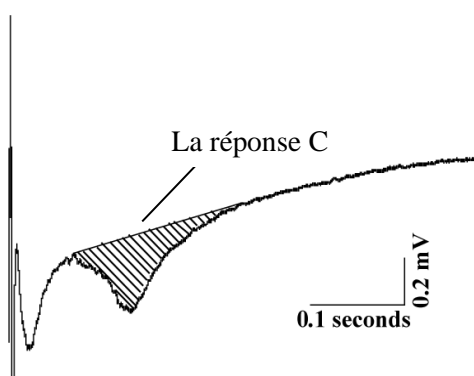


Figure 37: Représentation de la réponse C nociceptive apparaît 100 ms après l'application de la stimulation après la réponse des fibres A bêta myélinisées et les fibres A delta moyennement myélinisées.

4) Les injections intrathécales :

Ce type d'injection (figure 38) a été utilisé pour tester les effets d'une drogue administrée par la voie intrathécale sur le comportement douloureux (allodynie mécanique) en utilisant le test de Von Frey avant et après l'injection intrathécale. Les expériences ont été faites en aveugle, les réponses comportementales sont prises par l'expérimentateur qui n'est pas informé du groupe expérimental testé.

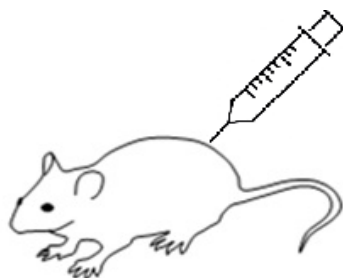
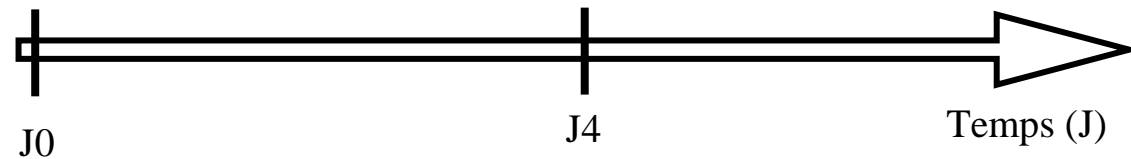


Figure 38 : Administration de la drogue par la voie intrathécale chez le rat

- **Design expérimental:**

Le schéma expérimental est présenté ci-dessous :

- Test de Von Frey
- Injection intraplantaire: Saline ou CFA
- Test de Von Frey
- Injection par voie intrathécale: Drogue / Saline
- Re-tester le comportement



5) Pharmacologie : les drogues utilisées :

Une solution mère est tout d'abord préparée pour chaque drogue, stockée à -20°C sous forme d'aliqots, et diluée à la concentration appropriée au moment de l'emploi dans une solution physiologique NaCl à 0.9%.

Les différentes substances utilisées, leur cible, et leur référence sont les suivantes : (1S,3R)-ACPD : agoniste des récepteurs métabotropiques glutamatergiques de groupe I (Tocris, 100 μ M) ; Nifedipine inhibiteur de canaux calciques de type L, (Tocris, 100 μ M) ; Strychnine : antagoniste des récepteurs glycinergiques, (Sigma, 5 μ M) ; Picrotoxine : antagoniste des récepteurs ionotropiques de type GABA-A, (Sigma, 50 μ M) ; CHPG : agoniste spécifique des récepteurs métabotropiques glutamatergiques de type 5 (Tocris, 100 μ M); MPEP : antagoniste spécifique des récepteurs métabotropiques glutamatergiques de type 5 (Tocris, 100 μ M).

Les drogues sont administrées soit par la voie intrathécale : injection dans l'espace sous-arachnoïdien pour les études comportementales, soit perfusées à l'aide d'une seringue avec un cathéter connecté à une pompe pour les études électrophysiologiques d'enregistrements extracellulaires au niveau de la moelle épinière.

6) Modèle d'inflammation :

Modèle qui consiste à injecter dans la partie dorsale de la patte postérieure droite (inflammation périphérique unilatéral) de l'animal 100 microlitres d'Adjuvant Complet de Freund (CFA : composé de mycobactéries) (Sigma) à l'aide d'une aiguille de 25 G, dose suffisante pour créer une inflammation importante au niveau de la patte. Le gonflement et la rougeur de la patte sont des critères qui caractérisent cette inflammation. Les injections intra-plantaires ont été réalisées sous anesthésie générale légère en utilisant l'Isoflurane à 5 % pour l'induction puis à 2,5 % pour la maintenance avec un mélange air/oxygène. Les animaux contrôles sont injectés avec un volume équivalent d'une solution physiologique : saline à 0.9% en suivant le même protocole.

7) Étude comportementale : Test de Von Frey électronique :

Pour réaliser l'étude comportementale, le même protocole de chapitre I a été suivi afin de vérifier la présence ou non de l'allodynie chez les animaux enflammés et non enflammés (pour plus de détail, voir partie I).

8) Analyse de l'expression de l'ARNm par la technique de la Réaction en Chaîne par Polymérase (PCR) :

Même procédure expérimentale appliquée dans la partie I a été suivi pour quantifier l'ARNm des molécules cibles : les canaux L (Cav1.2, Cav1.3), les mGluRs I (mGluR1 et mGluR5). Les amorces suivantes ont été utilisées :

mGluR1a:Forward: 5' ACATAGTCAAGCGTTACAACCTG 3'
Reverse: 5' GCCGTAATTCCTTCTGTG 3'

mGluR1b:Forward: 5' TTCCGGAGAAAGAAGCCC 3'
Reverse: 5' ACTTGCCGTTAGAAACATTCAC 3'

mGluR5:Forward: 5' AGACTTGCAACAGTTCTCTGAC 3'
Reverse: 5' AGGGACATCTGCATATTGTGG 3'

9) Analyse de l'expression protéique des récepteurs : la technique de Western Blot:

- **Principe :**

Le Western Blot est une technique qui permet la détection d'une protéine spécifique en fonction de son poids moléculaire dans un extrait en utilisant un anticorps spécifique dirigé contre cette protéine d'intérêt. Elle se fait en plusieurs étapes:

- **Extraction et dosage protéique:**

Les animaux sont mis en mort après décapitation (guillotine) après les avoir profondément anesthésiés avec l'Isoflurane à 5 %. Les parties dorsales ipsilatérales et dorsales controlatérales de la région lombaire de la moelle épinière sont disséquées rapidement après la dissection, et conservées séparément à -80°C jusqu'à l'extraction des protéines et leur quantification. Le segment lombaire prélevé de la moelle épinière est lysé mécaniquement dans une solution PBS refroidis dans la glace contenant des inhibiteurs de protéases (pepstatine A à 1 µg/ml, leupeptine à 1 µg/ml, aprotinine à 1 µg/ml, PMSF à 1 µg/ml, benzamidine à 0.1 µg/ml, et inhibiteur de calpaine I et II à 8 µg/ml) (Sigma). Les protéines contenues sont ensuite dosées après leur extraction en suivant un protocole approprié (Ren et al., 2012) par la méthode colorimétrique de Bradford.

- **Électrophorèse et Electro-transfert des protéines:**

Les échantillons ont été repris dans du tampon de dénaturation Laemmli 2X (1 volume de tampon de dénaturation pour 1 volume d'échantillon), chauffés ensuite pendant 5 min à 99°C pour être dénaturés. Ils sont ensuite déposés sur un gel d'électrophorèse sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide à 10 % (SDS-PAGE). Les échantillons sont ensuite déposés, les protéines sont séparées par électrophorèse selon leurs poids moléculaires. La migration est réalisée à 100 V dans un tampon de migration, et est arrêtée lorsque le front de migration (coloré par le bleu de bromophénol) atteint la limite inférieure du gel. Le

transfert est ensuite réalisé sur une membrane de difluorure de polyvinylidène : PVDF (Bio-Rad, Etats-Unis) des protéines séparées par électrophorèse pendant une heure à 90 V dans un tampon de transfert (figure 39).

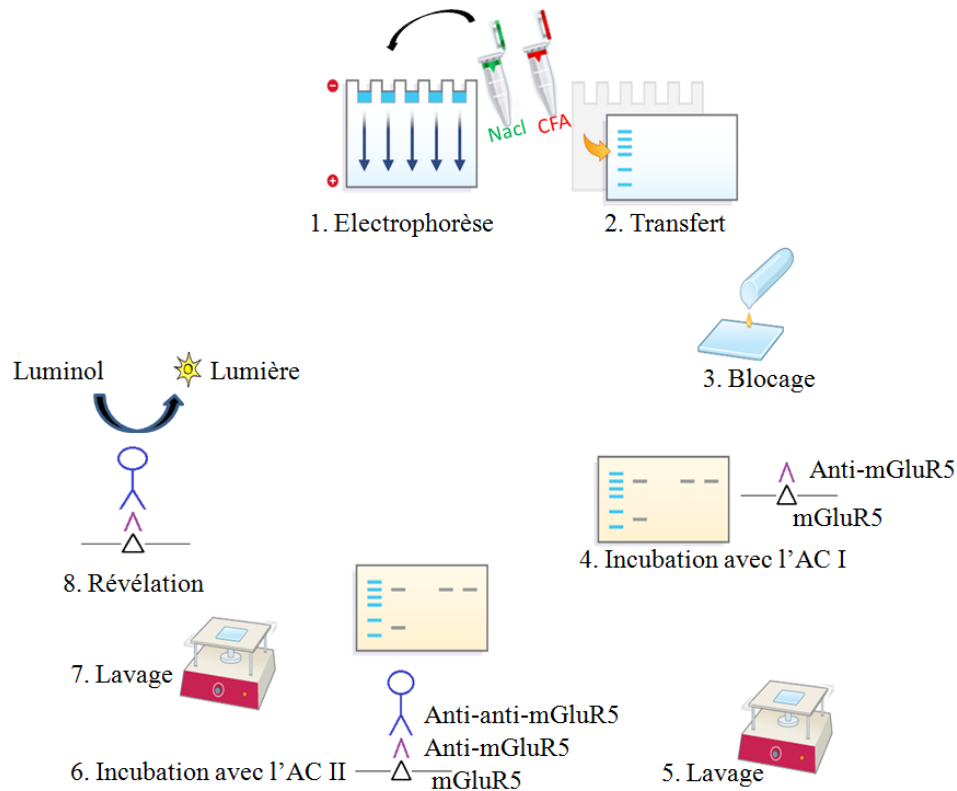


Figure 39 : Schéma résume les principales étapes de Western-Blot. 1 : dépôt des échantillons dans les puits pour la migration, les protéines vont migrer sous l'influence d'un champ électrique de pole négatif vers le pole positif. 2 : transfert des protéines : les bandes représentent des marqueurs à différents poids moléculaire par lequel on peut localiser la protéine d'intérêt recherchée. 3 : l'étape de blocage des sites aspécifiques. 4 : incubation avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt (mGluR5). 5 : lavage. 6 : incubation avec l'anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire. 7: lavage pour éliminer l'excès des anticorps. 8 : Révélation.(https://www.licor.com/bio/applications/quantitative_western_blots/workflows.html).

- **Détection immunologique des protéines transférées :**

Les sites aspécifiques présents sur la membrane sont saturés par incubation à température ambiante sous agitation modérée pendant une demi-heure dans du tampon Tween 20 PBS (Tween 20 Phosphate Buffered Saline) contenant 5%

de lait. La membrane est incubée ensuite sous agitation modérée pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps (l'AC) primaire dilué dans TPBS contenant 3 % de lait. L'AC primaire est fait chez le lapin et utilisé au 1/1000 (Sigma) dirigé contre mGluR5 (pour mGluR1, les expériences sont en cours), et un AC primaire fait chez la souris et utilisé au 1/100.000 contre la Tubiline : protéine de référence exprimée de façon constitutive et son expression ne varie pas en fonction de nos conditions expérimentales (Abcam, Etats-Unis).Après une nuit d'incubation, les membranes sont rincées une fois dans du TBS-Tween, suivi de 3 fois dans TBS (10-15 min/rinçage), avant d'être d'incubées pendant une heure à température ambiante, sous agitation modérée avec les anticorps secondaires, couplés à la peroxydase, utilisés au 1/2000, et dirigés contre les AC primaires, et dilués dans TPBS contenant 3 % de lait. A la fin de l'incubation, les membranes sont incubées une fois dans du TBS-Tween, suivi de 3 fois dans TBS (15 min/rinçage). Les bandes immuno-réactives sont ensuite détectées en utilisant le système de chémiluminescence avec ECL (Enhanced Chemoluminescence Analysis). Les images sont acquises avec une caméra CDD.

- **Analyse des résultats de Western-Blot:**

Les niveaux d'expression de protéine d'intérêt dans chaque échantillon sont analysés par le logiciel '*Image Lab*'. La quantité de protéine d'intérêt est calculé par rapport à la bande de protéine de référence (protéine d'intérêt/protéine de référence), ensuite, les valeurs sont normalisées sur la moyenne de la quantité du groupe contrôle. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM.

10) Analyse statistique :

Selon le protocole expérimental, les données ont été analysées par les tests suivant: pour les études électrophysiologiques le test 'Wilcoxon signed-rank test' a été utilisé. Dans toutes les expériences, l'effet de la drogue administrée a été mesuré une demi-heure après son application. Pour les études de comportement, le test ANOVA suivi de test Benferroni ont été utilisés. Pour les résultats de western-blot, le test Mann & Whitney a été utilisé.

Enfin, pour les résultats de PCR, le test de Fisher et le Student's test ont été utilisés. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software©). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM. Le N représente le nombre d'animaux utilisés. Le critère de significativité est $p < 0.05$

RÉSULTATS

Cette deuxième partie de ces travaux de thèse a été consacrée à l'étude du rôle des récepteurs métabotropiques du Glutamate de groupe I (mGluRs I) dans la transmission nociceptive spinale, leur interaction avec les canaux L, et les éventuelles modifications qui peuvent se mettre en place lors de l'induction d'un état de douleur de type inflammatoire.

1) L'activation des mGluRs I induit une augmentation des potentiels de champ C nociceptifs chez les animaux naïfs : rôle des canaux calciques de type L :

Les mGluRs I spinaux sont connus pour leur rôle excitateur dans la transmission nociceptive. L'activation des mGluRs I spinaux par l'1S, 3R-ACPD induit une augmentation du nombre de spikes au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (Budai et Larson, 1998). Nous avons tout d'abord testé l'effet d'agoniste des mGluRs I (l'1S, 3R-ACPD) sur la transmission nociceptive spinale dans les conditions contrôles. Nos résultats montrent que l'administration de l'1S, 3R-ACPD induit une augmentation significative du potentiel du champ C nociceptif traduisant une augmentation de la transmission nociceptive spinale (figure 40-A et D : sous l'1S, 3R-ACPD, il y a une augmentation de 26 % de potentiel du champ C nociceptif: 26 ± 7.22 %, $n=9$, $p=0.0039$, Wilcoxon signed-rank test). Un des modes d'action des mGluRs I pour augmenter l'excitabilité des neurones est l'activation secondaire des canaux calciques voltage dépendant comme cela a été montré dans différentes structures nerveuses y compris la corne dorsale de la moelle épinière (Morisset et Nagy, 1996 ; Morisset et Nagy, 1998 ; Russo et al., 1998 ; Heinke et Sandkuhler, 2007). Nous avons voulu alors chercher si cette augmentation induite par l'1S, 3R-ACPD dépendait des canaux calciques de type L. La co-application de l'1S, 3R-ACPD et Nifédipine, bloqueur des canaux L, supprime l'augmentation de la réponse induite par l'agoniste des mGluRs I (figure 40-B et D : sous l'1S, 3R-ACPD et Nifedipine, il y a une diminution de 6.33 % de potentiel du champ C : -6.33 ± 5.31 %, $n=5$, $p=0.29$, non significatif, Wilcoxon signed-rank test). En revanche, l'application de Nifedipine est sans effet sur le

potentiel du champ C (figure 40-C et D: en présence de Nifedipine : $0.95 \pm 15.12 \%$, $n=5$, $p=0,95$, non significative, Wilcoxon signed-rank test), ce qui est en accord avec la littérature (Fossat et al., 2007), montrant que le blocage des canaux L ne change pas la transmission nociceptive basale.

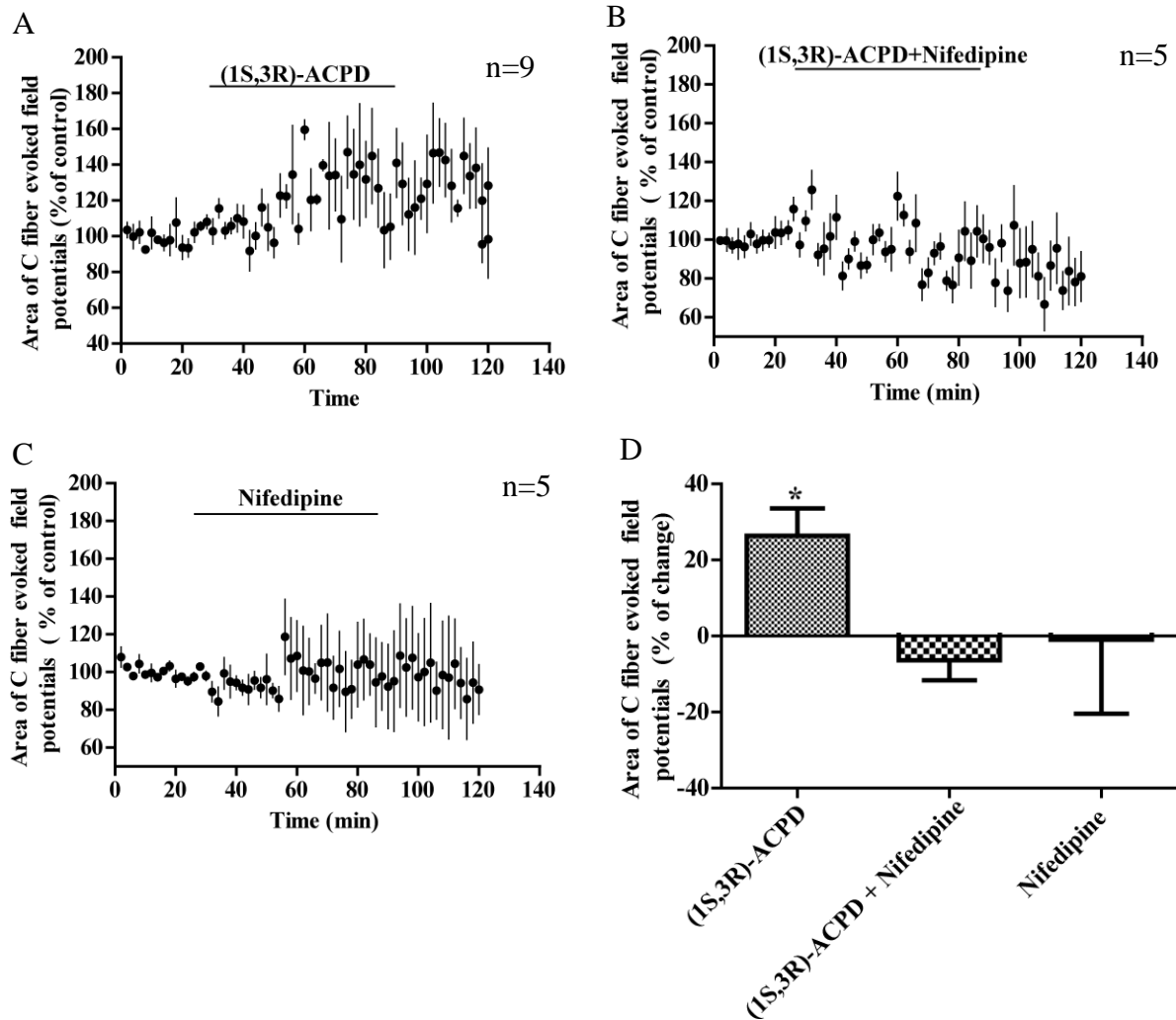


Figure 40 : L'effet nociceptif de l'1S, 3R-ACPD nécessite l'activation des canaux calciques de type L chez les animaux naïfs. En A et D, l'application de l'1S, 3R-ACPD induit une augmentation significative de potentiel du champ C. En B et D, le blocage des canaux L bloque l'augmentation de la réponse induite par l'1S, 3R-ACPD. En C et D, l'application de Nifedipine n'a pas d'effet sur la réponse. En D, potentiel du champ C (pourcentage de changement) dans les différentes conditions : 1S, 3R-ACPD tout seul, 1S, 3R-ACPD+Nifedipine, Nifedipine tout seul.

2) L'injection intrathécale de l'1S, 3R-ACPD induit un comportement nociceptif chez les animaux naïfs:

Nous avons voulu voir si cet effet excitateur dû à l'activation des mGluRs I se retrouvait en comportement douloureux, autrement dit, de voir si les changements observés en électrophysiologie pourraient être également exprimés de point de vue comportemental. Pour cela, nous avons évalué si l'activation des mGluRs I par l'1S, 3R-ACPD a des conséquences sur le seuil de retrait de la patte de l'animal. Les animaux sont soumis au test Von Frey pour la sensibilité mécanique. Le test a été effectué avant l'injection puis quinze et trente minutes après l'injection de l'1S, 3R-ACPD ou de NaCl à 0.9 % (saline) par la voie intrathécale. Nos résultats montrent que l'activation des mGluRs I par l'application de l'1S, 3R-ACPD par la voie intrathécale diminue significativement le seuil de retrait de la patte (figure 41 : à T= 30 min, la patte droite après l'injection de l'1S, 3R-ACPD : $74.15 \pm 7,55$ % de la situation contrôle avant injection (n = 5) (les valeurs sont exprimées en pourcentage par rapport aux seuils obtenus avant l'injection du l'1S, 3R-ACPD/saline, $p < 0.01$, Anova test a été utilisé afin d'étudier l'effet de : facteur drogue, facteur temps, et l'interaction entre ces deux facteurs. Ensuite, le test de "Bonferroni" a été utilisé pour faire la comparaison entre les différentes pattes). De la même façon, à T= 30 min, la patte gauche après l'injection de l'1S, 3R-ACPD : $64.79 \pm 8,84$ % de la situation contrôle avant injection (n = 5), ($p < 0.001$, Anova test, suivi par le test de "Bonferroni"). Ces données comportementales sont en corrélation avec les résultats électrophysiologiques, montrant l'impact de l'activation des mGluRs I dans l'intégration de l'information nociceptive douloureuse à l'étage spinal.

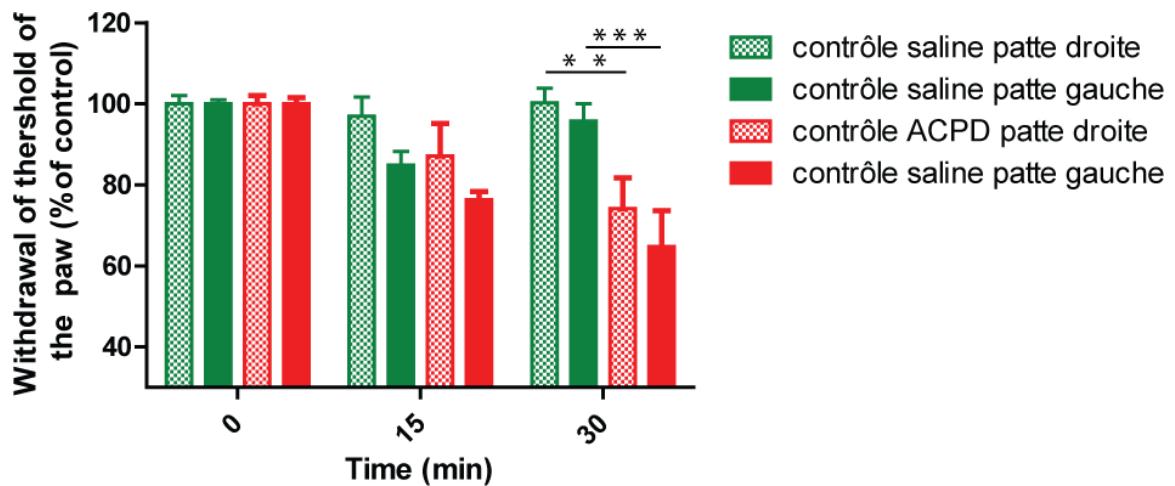


Figure 41 : l'effet de l'activation des mGluRs I par la voie intrathécale sur l'allodynie mécanique évaluée par le test Von-Frey 15 et 30 minutes après l'injection de l'1S, 3R-ACPD ou de NaCl à 0.9 % (saline) chez les animaux naïfs. L'injection de l'1S, 3R-ACPD induit une allodynie à partir de 15 min après l'injection pour atteindre un effet significatif une demi-heure après l'injection pour les deux pattes.

3) L'injection intrathécale de l'1S, 3R-ACPD diminue l'allodynie chez les animaux enflammés :

Nous avons ensuite cherché à savoir si l'effet de cet agoniste est modifié en conditions de douleur inflammatoire. Pour cela, nous avons utilisé le modèle d'inflammation induit par un agent inflammatoire (CFA) injecté dans la patte postérieure droite ipsilatérale de l'animal. Ce produit provoque une inflammation périphérique qui se prolonge plusieurs jours créant donc un état d'inflammation persistante entretenu et accompagné par des modifications centrales au niveau spinal. Nous avons commencé tout d'abord à quantifier la réponse comportementale douloureuse après l'injection de CFA ou de Saline (NaCl à 0.9%). Les données comportementales montrent que l'injection de CFA entraîne une diminution significative qui persiste au moins quatre jours du seuil de retrait de la patte de l'animal (figure 42 : (au Jour 4 (D 4) par exemple, il y a une diminution de 31.51 % du seuil de retrait de la patte chez les animaux CFA, $p < 0.001$, Two way Anova test, suivi par le test de Bonferroni), sans

aucun changement sur la sensibilité mécanique de la patte postérieure droite chez les animaux traités par Saline.

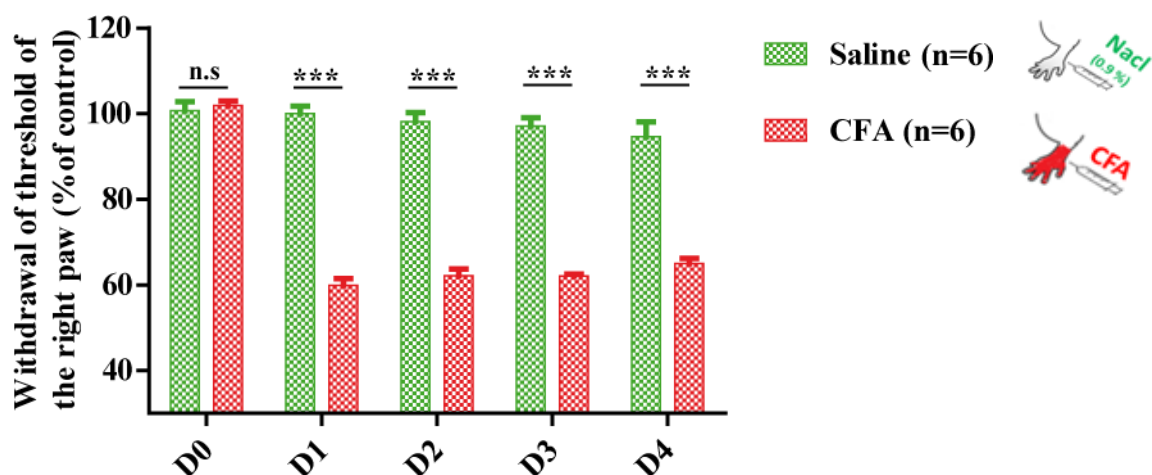


Figure 42 : L'injection de CFA induit une allodynie exprimée par une diminution significative du seuil de retrait de la patte de l'animal. Cette allodynie persiste jusqu'au moins Jour 4.

Nous nous sommes intéressés ensuite aux éventuelles modifications de l'effet de l'activation des mGluRs I sur la transmission nociceptive chez les animaux enflammés. Les résultats attendus c'était d'avoir une exagération de l'effet nociceptif induit par l'activation des mGluRs I par l'1S, 3R-ACPD dans le contexte d'inflammation où les systèmes excitateurs sont amplifiés. Le même protocole expérimental que précédemment a été appliqué dans les conditions inflammatoires. Le résultat obtenu est alors surprenant. L'application pharmacologique de l'1S, 3R-ACPD par la voie intrathécale chez les animaux enflammés induit une augmentation du seuil de retrait de la patte droite enflammée de l'animal, avec une légère allodynie sur la patte gauche saine non enflammée. La différence côté ipsilatérale/controlatérale est significative (figure 43 : à T= 30 min, il y a une augmentation de 38.7 % du seuil de retrait de la patte droite enflammée après l'injection de l'1S, 3R-ACPD avec une diminution de 16.39 % du seuil de retrait de la patte gauche saine non enflammée après l'injection de l'1S, 3R-ACPD ($p < 0.05$, Anova test suivi par le

test de “Bonferroni”). L’injection de saline est sans effet sur le seuil de retrait de la patte de l’animal.

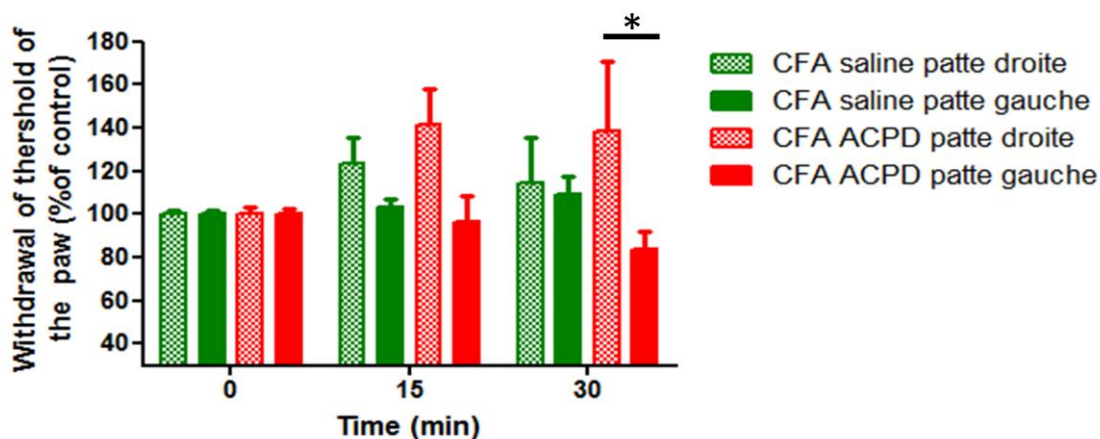


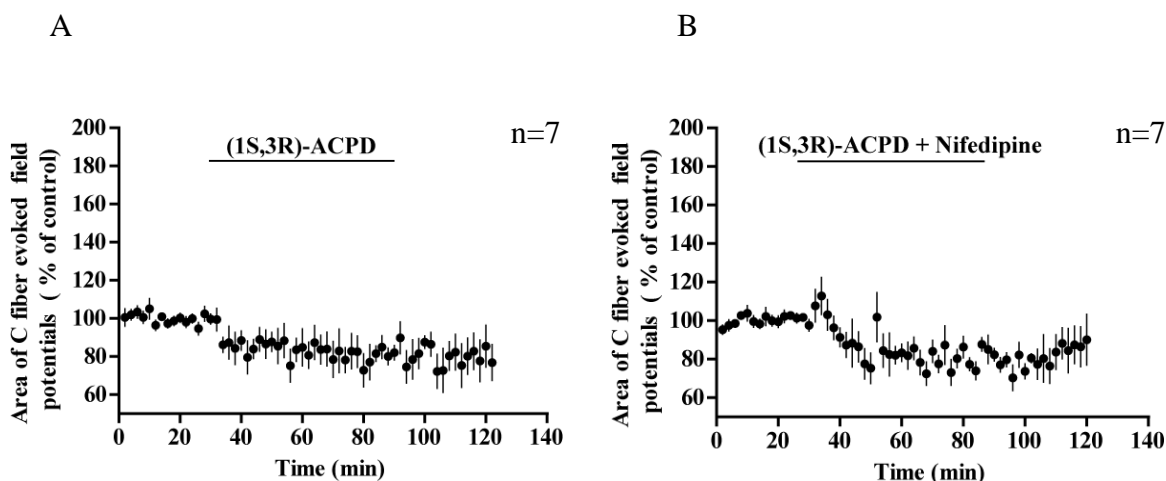
Figure 43 : l’effet de l’activation des mGluRs I par la voie intrathécale sur l’allodynie mécanique évaluée par le test Von-Frey 15 et 30 minutes après l’injection de l’1S, 3R-ACPD ou de NaCl à 0.9 % (saline) chez les animaux enflammés. L’administration de l’1S, 3R-ACPD induit un effet analgésique en augmentant le seuil de retrait de la patte droite enflammée, avec un effet nociceptif en diminuant le seuil de retrait de la patte gauche non enflammée. La différence entre les deux pattes est significative à T=30 min post-injection. L’injection de NaCl à 0.9 % (saline) est sans effet significatif chez les animaux enflammés.

4) L’activation des mGluRs I induit une diminution des potentiels de champ C nociceptifs chez les animaux enflammés : rôle des canaux calciques de type L :

Nous avons voulu chercher si les changements observés en comportement dû à l’activation des mGluRs I par l’1S, 3R-ACPD en condition inflammatoire pourraient être retrouvés en électrophysiologie. Encore, le résultat obtenu est surprenant. Nous montrons que l’activation des mGluRs I par l’1S, 3R-ACPD induit un effet totalement opposé en induisant une diminution significative de potentiel du champ C nociceptif (figure 44 A-D : il y a une diminution de 18.21% du potentiel du champ C sous l’1S, 3R-ACPD en conditions

inflammatoires ($-18.21 \pm 6.23\%$, $n= 7$, $p=0,031$, Wilcoxon signed-rank test). Ces données renforcent nos données comportementales, et ils confirment sur le plan électrophysiologique le changement d'action du l'1S, 3R-ACPD dans le contexte d'inflammation, montrant que l'effet d'activation des mGluRs I dépend du contexte physiopathologique.

Nous avons ensuite essayé de savoir si les canaux L pouvaient intervenir dans cet effet. Pour cela, nous avons appliqué la Nifedipine et l'1S, 3R-ACPD et nous montrons que l'application de Nifedipine ne supprime pas la diminution de la réponse induite par l'application de l'1S, 3R-ACPD dans les conditions inflammatoires (figure 44-B et E : il y a une diminution de 19.13 % du potentiel du champ C en présence de la Nifedipine et de l'1S, 3R-ACPD ($-19.13 \pm 3.005 \%$, $n = 7$, $p=0,015$, Wilcoxon signed-rank test), indiquant que la diminution du potentiel de champ C nociceptif en condition inflammatoire est indépendante des canaux calciques de type L. De la même façon, le blocage des canaux calciques de type L en appliquant la Nifedipine reste sans effet dans le contexte d'inflammation (figure 44-C et E : il y a une diminution de 0.22% du potentiel du champ C sous la Nifedipine ($-0.22 \pm 6.31 \%$, $n = 7$, $p=1$, non significative, Wilcoxon signed-rank test)).



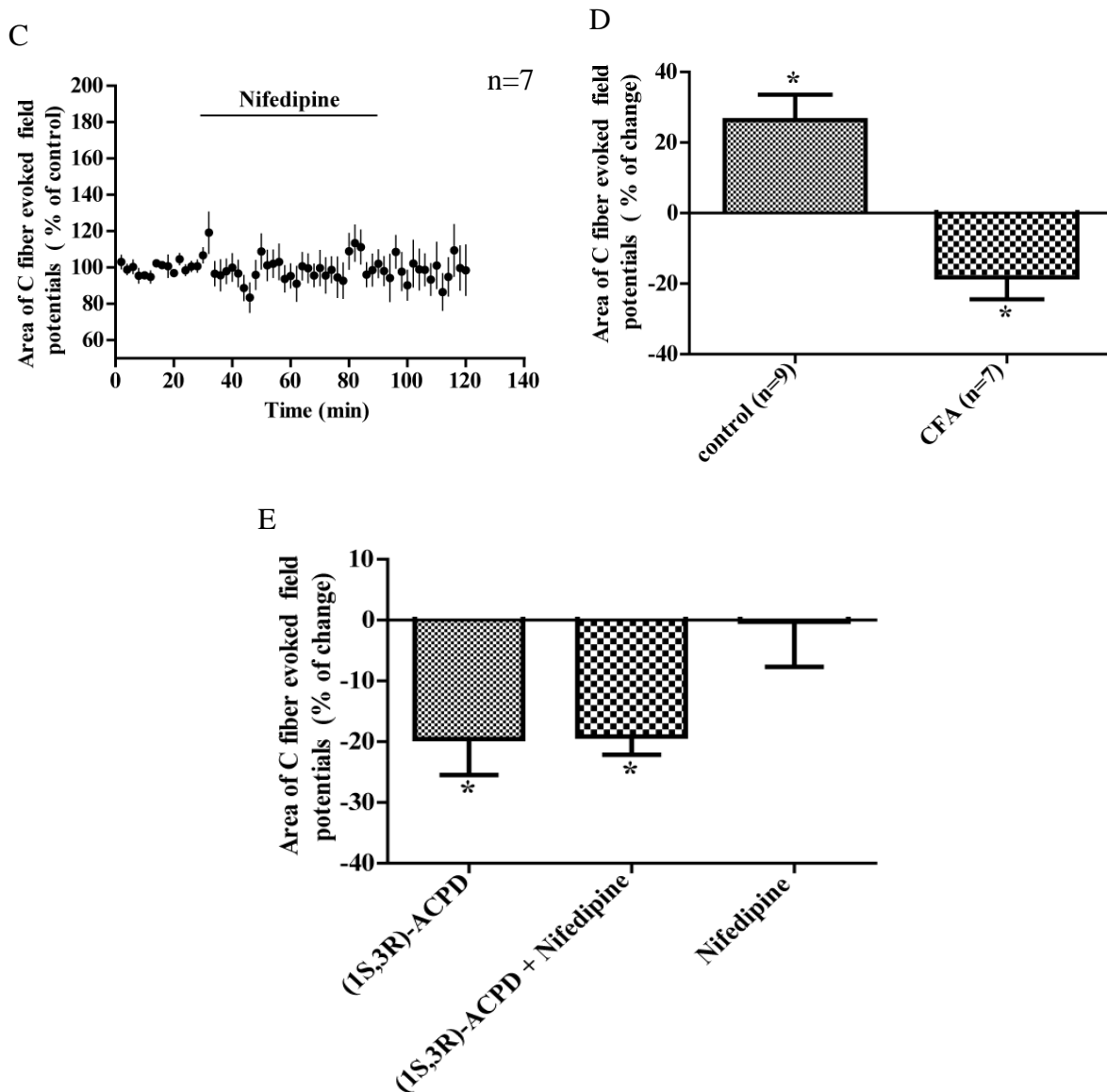


Figure 44 :L'effet anti-nociceptif de l'1S, 3R-ACPD est indépendant des canaux calciques de type L chez les animaux enflammés. En A et E, l'application de l'1S, 3R-ACPD induit une diminution significative de potentiel du champ C. Par rapport aux conditions contrôles, l'1S, 3R-ACPD induit un effet totalement opposé dans les conditions inflammatoires (D). En B et E, le blocage des canaux L ne supprime pas la diminution de la réponse induite par l'activation des mGluRs I par l'1S, 3R-ACPD. En C et E, l'application de Nifedipine n'a pas d'effet sur la réponse. En E, le potentiel du champ C (pourcentage de changement) dans les différentes conditions : 1S, 3R-ACPD tout seul, 1S, 3R-ACPD+Nifedipine, Nifedipine tout seul chez les animaux enflammés.

5) L'effet contradictoire de l'activation des mGluRs I : d'où vient-il ?

Nous avons ensuite essayé de comprendre le mécanisme inhibiteur induit par l'activation des mGluRs I dans le contexte inflammatoire. Les canaux calciques de type L ne sont pas impliqués dans l'effet de l'1S, 3R-ACPD. D'autre part, il a été montré que le blocage de la transmission GABAergique empêche la dépression à long terme (LTD) induite par l'1S, 3R-ACPD au niveau de l'hippocampe (O'Mara et al., 1995). Nous proposons alors que peut être au niveau spinal, dans les conditions inflammatoires, l'activation des mGluRs I entraîne une diminution de la réponse via un réseau inhibiteur. Le GABA et la Glycine sont deux principaux neurotransmetteurs inhibiteurs clés au niveau spinal pour l'intégration de l'information nociceptive. Les récepteurs GABA-ergiques et glycinergiques sont largement distribués dans la moelle épinière (Johnston, 1996 ; Rajendra et al., 1997). Pour valider l'hypothèse, nous appliquons des antagonistes des récepteurs GABAergiques et glycinergiques en activant en même temps les mGluRs I. Les résultats ont révélé que le blocage de cette transmission inhibitrice supprime totalement la diminution du potentiel du champ C induite par l'application de l'1S, 3R-ACPD dans les conditions inflammatoires (figure 45: il y a une augmentation de 2.05% du potentiel du champ C sous l'1S, 3R-ACPD, PicROTOXINE, et Strychnine ($2.05 \pm 7.04 \%$, $n = 7$, $p=0,77$, non significative, Wilcoxon signed-rank test)).

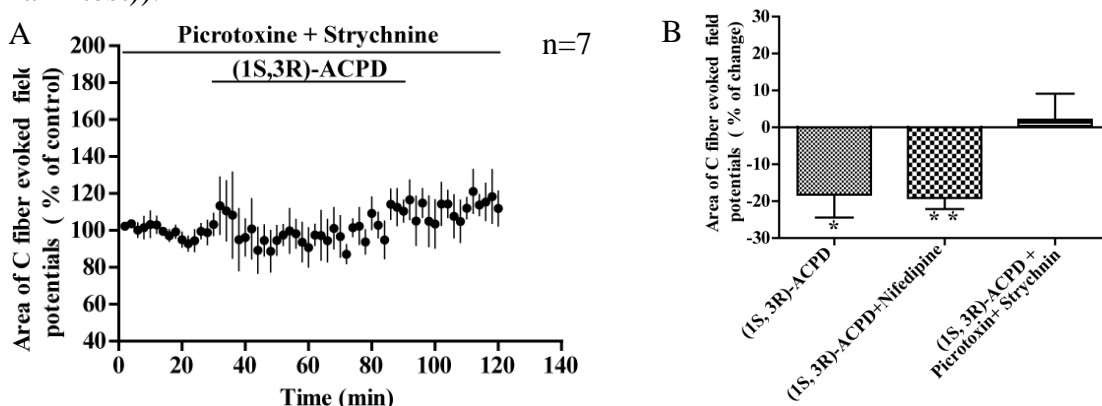


Figure 45 : En A : L'effet de l'3R-ACPD en présence des antagonistes des récepteurs GABAergiques (PicROTOXINE) et Glycinergiques (Strychnine) dans les conditions inflammatoires. En B : potentiel du champ C (pourcentage de changement) dans les différentes conditions : l'3R-ACPD tout seul, l'3R-ACPD+Nifedipine, et ACPD+PicROTOXINE+Strychnine.

6) Par quel(s) récepteur (s) l'effet de l'1S, 3R-ACPD pourrait passer dans les conditions inflammatoires ?

Les mGluRs I incluent deux récepteurs : mGluR1 et mGluR5. Nos données montrent que l'effet de l'3R-ACPD dans les conditions inflammatoires fait intervenir la transmission inhibitrice. Les mGluRs I sont connus par leur expression au niveau post-synaptique par rapport aux afférences (Alvarez et al., 2000). Nous avons émis l'hypothèse que dans les conditions inflammatoires il y a un changement d'expression de mGluR5 et/ou de mGluR1. Nous avons alors commencé de quantifier l'expression de l'ARNm des mGluRs I. Avec la technique de PCR, nos résultats ne révèlent aucun changement de l'expression de l'ARNm pour mGluRs I (ni pour mGluR5 ni pour mGluR1) (figure 46 : (pour mGluR1 a/b : $n = 6$, $p > 0,05$, non significative, Test de Fisher + Student's test; pour mGluR5 : $n = 6$, $p > 0,05$, non significative, Test de Fisher + Student's test), les quantités de transcrit sont normalisées par le gène de référence). Nous avons ensuite évalué l'expression protéique. D'une façon inattendue, les résultats d'évaluation d'expression protéique par la technique de Western blot est assez étonnant pour mGluR5 (pour mGluR1, les expériences sont en cours) montrant une augmentation significative d'expression pour le mGluR5 (figure 47: il y a une augmentation de 41.7 ± 10.25 % d'expression protéique, $n=6$, $p=0.0096$, Mann & Whitney test). Nous avons alors cherché à tester si la diminution de la réponse par l'1S, 3R-ACPD dans les conditions inflammatoires pourrait passer par l'activation accrue de mGluR5. L'administration de CHPG, agoniste de mGluR5 induit une diminution significative de potentiel du champ C (figure 48 A et D: il y a une diminution de 28.49% du potentiel du champ C sous le CHPG (-28.49 ± 6.18 %, $n = 9$, $p=0,0017$, Wilcoxon signed-rank test). Nous retrouvons un effet inhibiteur similaire à celui de l'1S, 3R-ACPD (figure 48 D). Dans les conditions contrôles, l'administration de CHPG induit également une diminution du potentiel du champ C (figure 48 C ($n=3$, reste à confirmer)). Cela, suggère que dans les conditions inflammatoires, la diminution du potentiel du champ C induite par l'activation des mGluRs I passerait par l'activation de mGluR5. En

revanche, dans les conditions contrôles, ces données suggèrent que l'augmentation du potentiel du champ C est indépendante de l'activation de mGluR5, mais plutôt est due à l'activation de mGluR1. De plus, dans les conditions inflammatoires, afin de confirmer que l'activation de mGluR5 est bien responsable de l'effet anti-nociceptif de l'1S, 3R-ACPD, le mGluR5 a été bloqué en utilisant un antagoniste : MPEP en présence de l'1S, 3R-ACPD. Nos résultats montrent que le blocage pharmacologique de mGluR5 par MPEP en présence de l'1S, 3R-ACPD bloque la diminution de la réponse induite par l'activation des mGluRs I par l'1S, 3R-ACPD (figure 48 B et D: il y a une diminution de 4.77% du potentiel du champ C en présence de l'1S, 3R-ACPD et MPEP ($-4.77 \pm 3.59\%$, $n = 6$, $p=0,25$, non significatif, Wilcoxon signed-rank test), suggérant la nécessité d'activation de mGluR5 pour la diminution de la réponse induite par l'1S, 3R-ACPD dans les conditions inflammatoires.

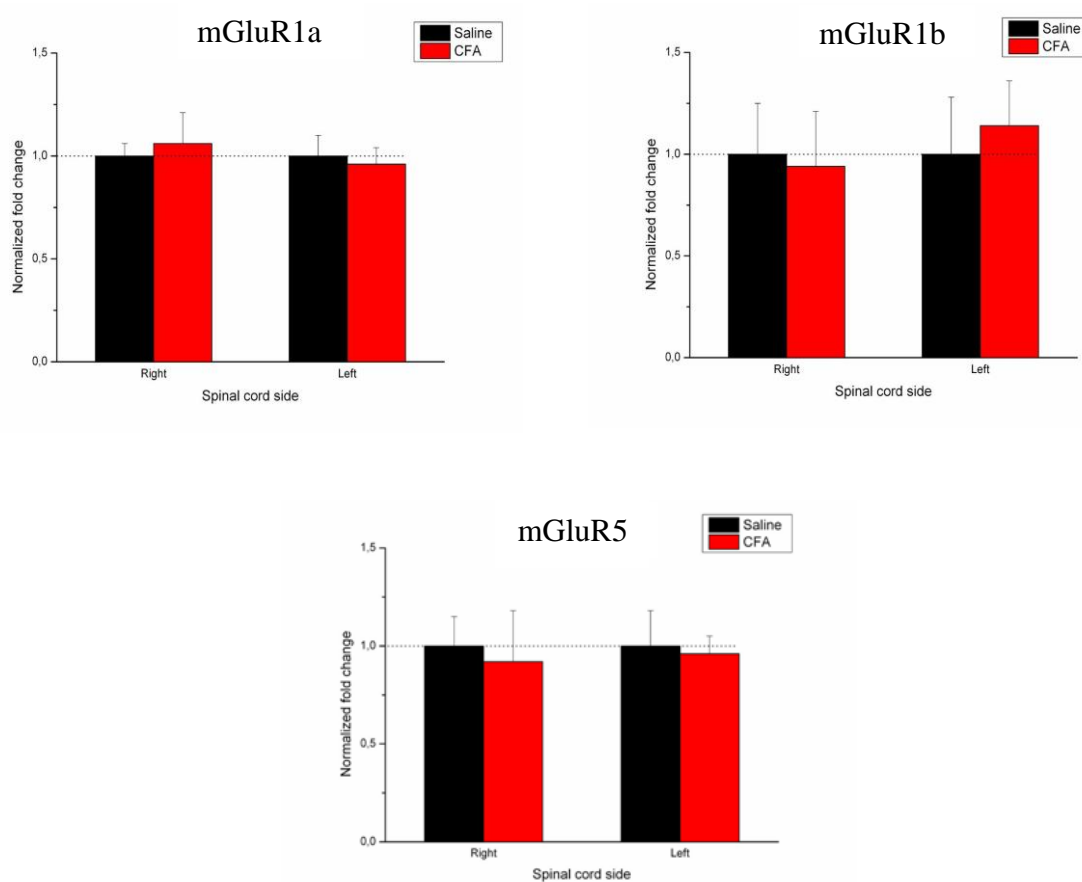


Figure 46 : L'impact de l'inflammation sur la transcription de mGluR1a/b et mGluR5 évaluée par PCR. Aucun changement d'expression de l'ARNm ni pour mGluR1 ni pour mGluR5 dans les conditions inflammatoires a été détecté. La patte droite est enflammée.

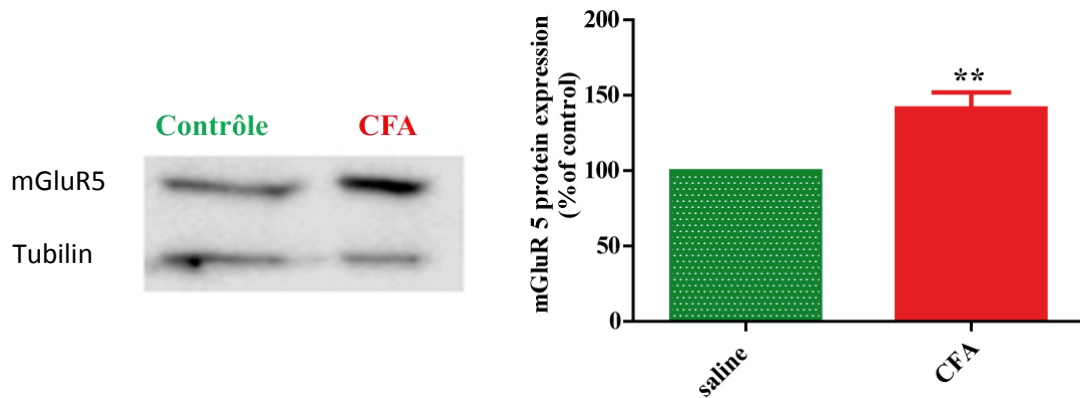


Figure 47 : L'impact de l'inflammation sur l'expression protéique de mGluR5 évalué par le Western-Blot sur le côté droit ipsilatéral enflammé. À gauche, un exemple d'immunoblot. La Tubulin est la protéine de référence. À droite, représentation des résultats montrant une augmentation significative d'expression protéique de mGluR5.

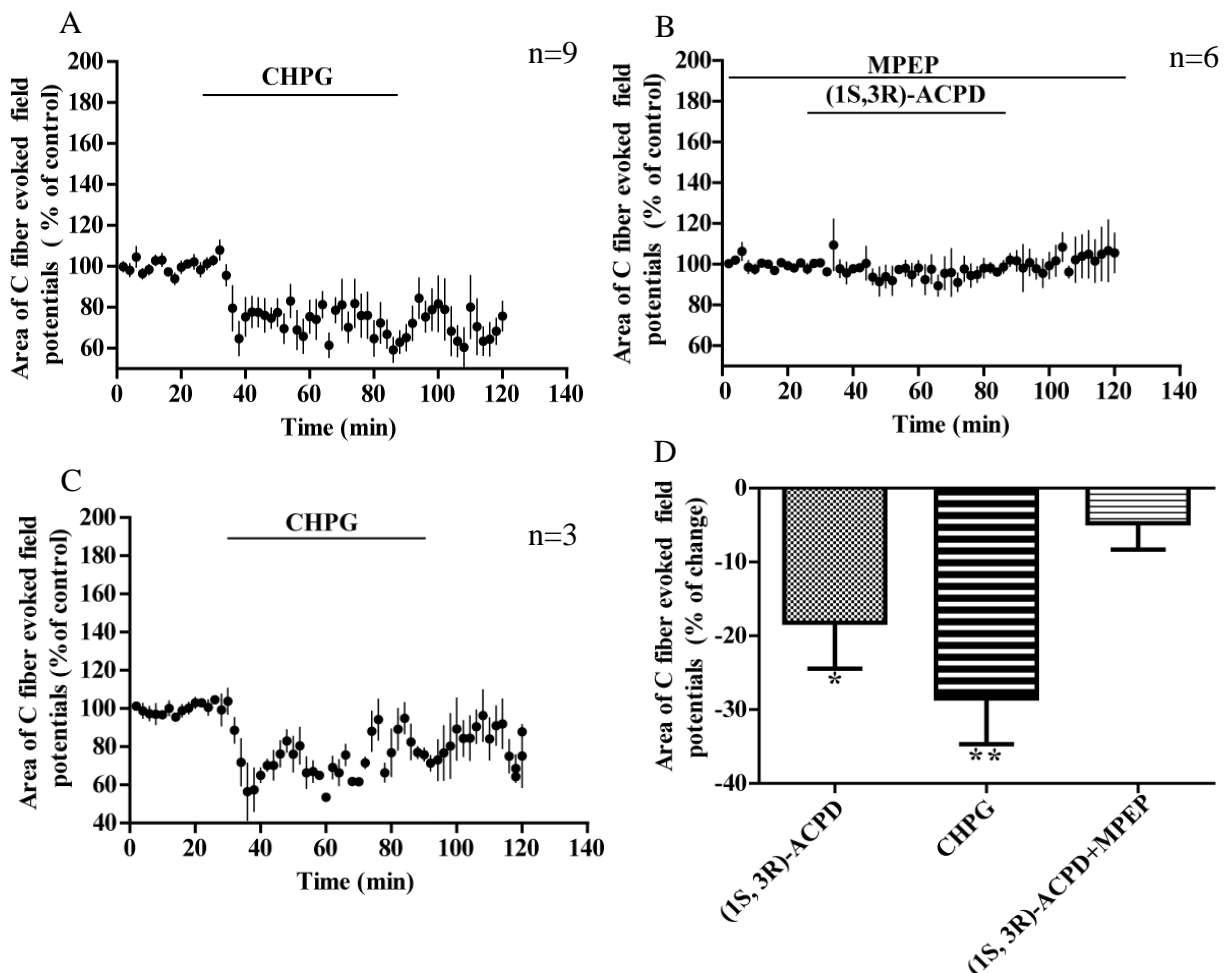


Figure 48 : En A, l'effet anti-nociceptif de CHPG dans les conditions inflammatoires. L'application de CHPG mime l'effet anti-nociceptif de 1S, 3R-ACPD. En B, l'effet de l'1S, 3R-ACPD est supprimé en présence de MPEP. En C, l'application de CHPG dans les conditions contrôles diminue la réponse. En D, l'effet de l'1S, 3R-ACPD, CHPG, et l'1S, 3R-ACPD+ MPEP dans les conditions inflammatoires.

Le blocage de la transmission inhibitrice ou de mGluR5 dans les conditions inflammatoires en présence de l'1S, 3R-ACPD supprime la diminution de la réponse induite par l'activation des mGluRs I par l'1S, 3R-ACPD, mais n'aboutit pas à une augmentation de la réponse comme celle observée dans les conditions contrôles, ce qui suggère l'implication d'autres facteurs. Bien que le blocage des canaux L ne supprime pas la diminution de la réponse induite par l'1S, 3R-ACPD dans les conditions inflammatoires, nous avons voulu quand même vérifier qu'il n'y a pas une diminution de l'expression des canaux L dans les conditions inflammatoires. Nous avons alors quantifié l'expression de l'ARNm de Cav1.2 et Cav1.3. Les résultats révélés par la technique de PCR ne montrent aucun changement de l'expression de l'ARNm des canaux L (ni pour Cav1.2 ni pour Cav1.3) dans les conditions inflammatoires. Aucune variation significative du transcrit Cav1.3 ou de Cav1.2 n'a pu être mise en évidence dans les conditions inflammatoires que ce soit du côté ipsilatéral ou controlatéral, d'ailleurs, pour Cav1.2 une tendance à l'augmentation mais non significative a été marquée (Figure 49 : (pour Cav1.2 : $n = 6$, $p > 0,05$, non significative, Test de Fisher + Student's test; pour Cav1.3 : $n = 6$, $p > 0,05$, non significative, Test de Fisher + Student's test), les quantités de transcrit sont normalisées par le gène de référence). Ensemble, ces données confirment que l'effet de l'1S, 3R-ACPD reste indépendant des canaux L dans les conditions inflammatoires, ce qui suggère que d'autres mécanismes / facteurs peuvent être impliqués dans l'action de l'1S, 3R-ACPD.

Ensemble, ces résultats montrent que le système nociceptif subit des changements fonctionnels suggérant que des mécanismes pourraient s'installer dans le contexte d'inflammation aboutissant à un effet totalement opposé dû à l'activation des mGluRs I par l'application de l'1S, 3R-ACPD.

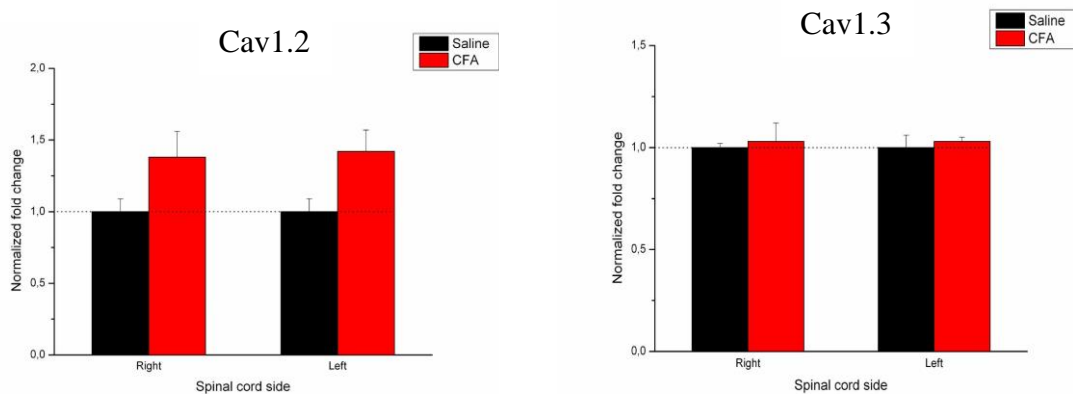


Figure 49 : L'impact de l'inflammation sur la transcription du canal Cav1.2 et Cav1.3 évaluée par PCR. L'inflammation ne cause aucun changement significative de l'expression ni pour Cav1.3 ni pour Cav1.2. La patte droite est enflammée.

Les deux figures suivantes représentent un récapitulatif dans les conditions contrôles (figure 50 A) et dans les conditions inflammatoires (figure 50 B) :

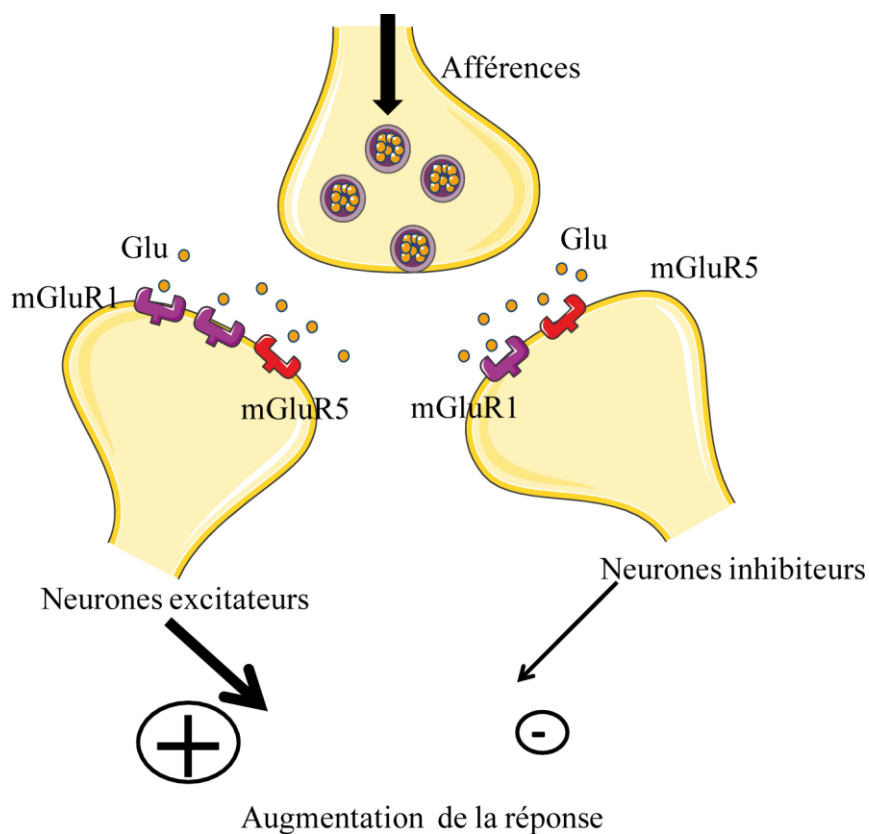


Figure 50 A : schéma récapitulatif hypothétique expliquant l'effet de l'1S, 3R-ACPD dans les conditions contrôles. Le glutamate libéré par les afférences va activer ses récepteurs mGlu1 et mGlu5. L'effet de l'1S, 3R-ACPD dans ces conditions contrôles semble médié par l'activation de mGluR1 (mais pas de mGluR5) aboutissant à l'augmentation de la réponse.

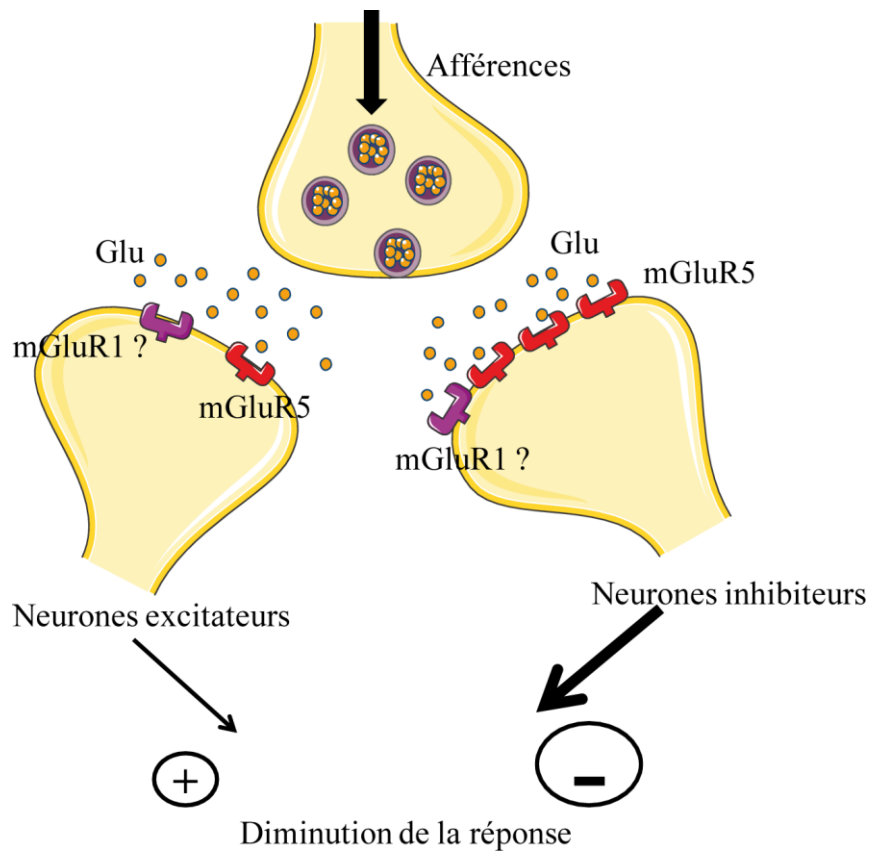


Figure 50 B : schéma récapitulatif hypothétique expliquant l'effet de l'1S, 3R-ACPD dans les conditions inflammatoires. Le glutamate libéré par les afférences va activer ses récepteurs mGlu1 et mGlu5. Ce dernier est connu par son up-régulation dans les conditions d'inflammation, probablement au niveau des neurones inhibiteurs. L'activation de mGluR5 va alors aboutir à une libération accrue des neurotransmetteurs inhibiteurs par les neurones inhibiteurs, conduisant à la diminution de la réponse.

DISCUSSION

Notre étude s'est intéressé au rôle des récepteurs métabotropiques du glutamate de groupe I dans la transmission nociceptive et leur éventuelle modulation des canaux calciques de type L au niveau spinal à la fois dans les conditions contrôles et inflammatoires.

Le rôle du système glutamatergique dans les voies nociceptives est associé à différents types de douleurs (Smith, 1994 ; Baron, 2000 ; Devor, 2001 ; Jensen, 2003). Le niveau du glutamate augmente au niveau spinal dans le cadre inflammatoire chez le rat (Dmitrieva et al., 2004 ; Pitcher et al., 2007), et dans le cadre de douleur neuropathique (al-Ghoul et al., 1993 ; Hudson, 2002). Le glutamate agit via les récepteurs ionotropiques et métabotropiques. Le rôle des récepteurs ionotropiques dans la transmission de l'information nociceptive est bien documenté. Cependant, les différents effets secondaires de traitements ciblant ces récepteurs limitent l'avancement de recherche sur ce type de récepteurs (Eide, 1995 ; Jevtovic-Todorovic, 1998), aboutissant à mieux approfondir l'étude sur les récepteurs métabotropiques (mGluRs) (Budai et Larson, 1998; Neugebauer, 2002; Chiechio, 2004).

Dans cette étude, nous avons cherché à étudier le rôle des mGluRs, et plus particulièrement le rôle des mGluRs I au niveau spinal, premier relai de traitement de l'information nociceptive. Ce présent travail fournit des évidences électrophysiologiques et comportementales que les mGluRs I spinaux modulent la transmission nociceptive à la fois dans les conditions contrôles et en conditions pathologiques des douleurs inflammatoires.

Tout d'abord, dans les conditions contrôles, nous avons montré que l'administration spinale de l'1S, 3R-ACPD facilite la transmission nociceptive en augmentant le potentiel C nociceptif au niveau spinal. Ces données sont en accord avec la littérature montrant que l'1S, 3R-ACPD induit une excitation des neurones spinaux (Budai et Larson, 1998). Ensuite, nous avons voulu chercher si l'activation de ces récepteurs mGluRs I a des conséquences sur le comportement nociceptif. L'administration par la voie intrathécale de l'agoniste de mGluRs I induit une allodynie dans ces conditions contrôles. Ces

données sont en accord avec nos données électrophysiologiques. Encore, ces données renforcent des études comportementales montrant que l'administration spinale de trans-ACPD ou de l'1S, 3R-ACPD induit un comportement nociceptif (mordre et gratter) chez le rat (Meller, 1996), et que l'injection intrathécale de (RS)-DHPG (un autre agoniste de mGluRs I) induit une allodynie mécanique et une hyperalgésie thermique chez le rat (Fisher et Coderre, 1998).

Il a été mis en évidence au niveau spinal que l'activité des canaux calciques de type L est influencée par une composante métabotrope de type glutamatergique et plus précisément par les mGluRs I (Morisset et Nagy, 1999; Derjean et al., 2003). Il a été notamment montré *in vitro* chez le rat que l'activation des mGluRs I permet l'activation des canaux L : une facilitation métabotrope par les mGluRs I des canaux L. Le même phénomène a été aussi observé dans les structures supra-spinales, au niveau de la cellule granuleuse du cervelet (Chavis et al., 1995), et aussi bien au niveau du medulla (Mironov et al., 1998); (Mironov et al., 2000). Cependant, au niveau du néocortex, l'activation des mGluRs I inhibe les courants calciques de type L (Sayer et al., 1992). Nous avons alors souhaité étudier *in vivo* si cet effet de l'1S, 3R-ACPD dans la transmission nociceptive permet toujours une activation des canaux L en augmentant le potentiel du champ C nociceptif. Nos résultats montrent que le blocage des canaux L est capable de bloquer l'effet nociceptif induit par l'activation des mGluRs I par l'1S, 3R-ACPD. Ces données suggèrent l'existence d'une interaction/un lien entre les mGluRs I / les canaux L pour induire cet effet. Au niveau spinal, cette interaction semble être de nature post-synaptique puisque : i) les canaux L sont largement et préférentiellement exprimés au niveau post-synaptique (Heinke, 2005), ce qui indique une participation mineure de ces canaux à la libération des neurotransmetteurs par l'élément pré-synaptique, mais avec un rôle majeur et crucial dans l'activité calcium-dépendant dans l'élément post-synaptique, ii) les mGluRs I qui sont connus par leur localisation anatomique principalement au niveau post-synaptique par rapport aux afférences primaires (Tang, 1999;

Alvarez et al., 2000). L'un des mécanismes hypothétiques possibles de l'effet direct facilitateur des mGluRs I sur les canaux L est médié par la voie Phospholipase C (PLC) -dAG (diacylglycerol) -IP3 (inositol triphosphate), qui conduit à la libération de calcium de stock intracellulaire qui va se fixer sur CaM (calmodulin) aboutissant à l'activation des canaux L. D'ailleurs, il a été montré qu'au niveau des motoneurones que le blocage de CaM empêche la facilitation du courant calcique par le calcium intracellulaire (Perrier et al., 2000), et que le complexe Ca^{2+}/CaM facilite les canaux calciques de type L (Zühlke, 1999 ; Zühlke, 2000). Ces mGluRs I peuvent aussi entraîner un effet positif sur les canaux L d'une façon indirecte par l'éventuelle implication d'autres éléments. Il a été montré que les mGluRs I peuvent augmenter l'excitabilité neuronale en inhibant les canaux potassiques (Conn et Pin, 1997; Derjean et al., 2003). Cela, induit une dépolarisation membranaire qui est nécessaire pour l'activation des canaux L. Encore, ces mGluRs I peuvent potentialiser l'activité des récepteurs excitateurs tel que les récepteurs NMDA ou AMPA (Cerne et Randic, 1992 ; Bond et Lodge, 1995 ; Budai et Larson, 1998), ce qui entraîne une dépolarisation membranaire aboutissant à l'activation des canaux L.

Nous nous sommes intéressés ensuite aux éventuelles modifications de l'effet de l'activation des mGluRs I sur la transmission nociceptive chez les animaux enflammés. D'une façon inattendue, nos résultats montrent que l'inflammation périphérique altère l'action de l'1S, 3R-ACPD. L'activation pharmacologique des mGluRs I spinaux induit une diminution significative de la réponse nociceptive C enregistrée dans le contexte d'inflammation, indiquant un changement de point de vue fonctionnel/distribution de ces mGluRs I dans ces conditions. Ces données électrophysiologiques ont été renforcées par l'étude comportementale montrant que l'activation des mGluRs I par la voie intrathécale diminue significativement l'allodynie exprimée dans le contexte inflammatoire. En comparant avec nos données obtenues dans les conditions contrôles, ces résultats indiquent que l'action de 1S, 3R-ACPD dépend du contexte physiopathologique (contrôle/inflammation). Cependant, il a été

montré que l'administration intrathécale de DHPG (un autre agoniste de mGluRs I) renforce la réponse nocifensive dans le cadre de l'inflammation à la Formaline chez le rat (Fisher et Coderre, 1996b). Le modèle inflammatoire utilisé peut être l'origine de cette différence. L'effet de Formaline est de court terme (aiguë (une heure)) alors que le modèle inflammatoire utilisé dans notre étude est à long terme (chronique (des jours/semaines)). De plus, l'effet de l'activation de mGluRs I dépend aussi de leur localisation neuroanatomique. Au niveau des afférences périphériques, l'activation des mGluRs I est nécessaire pour l'expression de l'hyperalgésie inflammatoire, et le blocage de ces récepteurs mGluRs I inverse l'hypersensibilité inflammatoire chez la souris (Bhave, 2001), ou encore le prétraitement avec un antagoniste des mGluRs I prévient le développement du comportement nociceptif induit par l'injection intra-plantaire de Formaline chez le rat (Bhave, 2001), et l'hypersensibilité inflammatoire induite par l'injection de Carragénine chez le rat (Walker, 2001). Dans les centres supra-spinaux, les mGluRs I peuvent également moduler le processus nociceptif (Maione et al., 2000 ; Neugebauer, 2001; Ren et Neugebauer, 2010; Tappe-Theodor et al., 2011). La microinjection d'agoniste dans la substance grise périaqueducatale des mGluRs I, produit des effets anti-nociceptifs (Maione et al., 2000), alors que l'activation des mGluRs I au niveau des noyaux ventraux-postéro-latéraux thalamiques renforce les réponses douloureuses dans le test inflammatoire à la Formaline (Miyata et al., 2003). Ensemble, l'activation des mGluRs I peut alors induire à la fois des effets nociceptifs ou anti-nociceptifs selon le contexte physiopathologique mis en jeu mais aussi en fonction de leur localisation neuroanatomique.

Par la suite, toujours dans le cadre inflammatoire, nous avons voulu savoir si l'effet anti-nociceptif de l'1S, 3R-ACPD pourrait passer par les canaux L. Nos données électrophysiologiques montrent que le blocage des canaux L n'a aucun effet sur l'effet anti-nociceptif dû à l'activation des mGluRs I par l'1S, 3R-ACPD. Ces données suggèrent que l'action de l'1S, 3R-ACPD fait intervenir

d'autres éléments autre que les canaux L dans les conditions pathologiques des douleurs inflammatoires.

L'effet contradictoire de l'1S, 3R-ACPD ne semble pas être dépendant des processus de transcription. Nos résultats ne montrent aucun changement d'expression de l'ARNm ni pour mGluR1 ni pour mGluR5 chez les animaux enflammés. Pour le mGluR5, ce résultat est assez surprenant puisqu'il a été constaté une augmentation d'expression de l'ARNm de mGluR5 au niveau de la corne dorsale, dans le cadre d'un modèle inflammatoire périphérique persistant induit par l'inflammation des tissus du pied chez la chèvre (Dolan et al., 2003). Cette différence est probablement due au modèle animal et/ou de protocole expérimental utilisés. Encore, l'inflammation n'a aucun effet sur l'expression de l'ARNm pour Cav1.3, alors qu'une tendance à l'augmentation (mais pas significative) d'expression pour Cav1.2 a été observée, ce qui est en cohérence avec nos données électrophysiologiques : l'action de l'1S, 3R-ACPD est indépendante des canaux L dans le contexte inflammatoire. Cependant, la quantification protéique de mGluR5 montre qu'il y a une augmentation significative d'expression de mGluR5 dans le contexte inflammatoire, suggérant que le niveau protéique n'est pas proportionnel à l'ARNm. La signification fonctionnelle expliquant la non-proportionnalité l'ARNm / protéine expression n'est pas explorée dans cette étude. Moins de dégradation protéique, des changements au niveau de transcription, de translation, ou bien des changements pour la dégradation de l'ARNm, restent des possibilités pour expliquer ce résultat (Vogel et al., 2010).

D'autre part, le blocage de la transmission inhibitrice (médiée par le GABA et le Glycine, deux principaux neurotransmetteurs inhibiteurs clés pour l'intégration de l'information douloureuse) supprime l'effet anti-nociceptif de l'1S, 3R-ACPD dans les conditions inflammatoires. L'augmentation protéique de mGluR5 connu par son expression post-synaptiquement au niveau des neurones inhibiteurs (Vidnyánszky et al., 1994) peut être responsable de l'effet opposé de l'1S, 3R-ACPD. L'administration d'un agoniste spécifique de

mGluR5 induit une diminution significative de la réponse nociceptive similaire à celle obtenue avec l'1S, 3R-ACPD. Encore, le blocage de mGluR5 bloque la diminution de la réponse induite par l'application de l'1S, 3R-ACPD de la même façon qu'en bloquant la transmission inhibitrice. Ensemble, ces données suggèrent que l'effet anti-nociceptif de l'1S, 3R-ACPD nécessite l'activation de mGluR5 probablement localisé à la surface des neurones inhibiteurs. Cependant, le même effet de l'1S, 3R-ACPD obtenu dans les conditions contrôles n'a pas été retrouvé en bloquant la transmission inhibitrice ou le mGluR5 dans le cadre d'inflammation, ce qui suggère que d'autres facteurs peuvent être impliqués dans l'effet de l'1S, 3R-ACPD dans ces conditions.

En résumé, tous ces résultats pourraient permettre de mettre en lumière des nouvelles pistes thérapeutiques contre les douleurs inflammatoires en ciblant les récepteurs mGluRs I.

En perspective de ce projet, le travail actuel en cours de réalisation consiste toujours à définir les causes/mécanismes exacts de l'effet contradictoire de l'1S, 3R-ACPD. Tout d'abord, par l'approche électrophysiologique, confirmer dans les conditions contrôles que l'effet nociceptif de l'1S, 3R-ACPD passe par l'activation de mGluR1 (mais pas par de mGluR5), puis dans les conditions inflammatoires, tester l'effet d'activation de mGluR1. Ensuite, nous souhaitons étudier les conséquences de l'activation de chaque récepteur (mGluR1 et mGluR5) sur le comportement nociceptif. Dans un second temps, par une étude immunohistochimique, nous allons s'intéresser à la distribution cellulaire de chaque récepteur et plus précisément à la surface membranaire des interneurons excitateurs et inhibiteurs. La continuité de cette étude permettra d'étendre nos connaissances liées à l'inflammation concernant le rôle précis de chaque récepteur dans la modulation de l'information douloureuse au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière, premier relai d'intégration et de traitement de l'information douloureuse.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Mon projet de thèse s'est inscrit dans l'un des axes de recherche du laboratoire français où j'ai effectué ma thèse qui porte sur l'étude du rôle des canaux calciques de type L et leurs modulateurs dans la sensibilisation centrale spinale à la douleur. Les résultats publiés par l'équipe (principalement par Dr. Pascal Fossat, Dr. Frédéric Nagy, et Pr. Marc Landry) ont montré que les canaux calciques de type L localisés à la membrane neuronale, représentent des propriétés intrinsèques permettant l'amplification de message nociceptif provenant de la périphérie. L'objectif de ma thèse alors a été d'étudier le rôle de ces canaux L et plus précisément le rôle de chaque canal Cav1.2 et Cav1.3 dans la sensibilisation centrale à la douleur. Autrement dit, ce travail de thèse a permis de caractériser le rôle joué par le canal Cav1.2 et Cav1.3 dans deux formes de sensibilisation centrale : à court terme (Wind-up) et à long terme dans le cadre de la douleur chronique neuropathique. L'utilisation des différentes approches : le modèle computationnel ainsi que la confrontation des données biologiques chez l'animal : le modèle de Knock-down (ciblage spécifique de la molécule concernée), données comportementales, électro-physiologiques, et moléculaires, nous a permis de tirer des conclusions claires concernant le rôle joué par chaque canal, et d'apporter des éléments de réponse importants quant à leur implication dans le cas de douleur neuropathique. En effet, le canal Cav1.3 est impliqué dans la génération et l'expression du phénomène de Wind-up, une forme de sensibilisation centrale à court terme à la douleur, à la fois dans les conditions contrôles et neuropathiques. Cependant, son blocage est sans effet sur l'expression de l'allodynie mécanique, une forme de comportement douloureux. Il convient de noter que l'expression du phénomène de Wind-up fait intervenir aussi une composante synaptique excitatrice tel que le récepteur NMDA. Quant au canal Cav1.2, il s'implique sur la forme de sensibilisation à long terme associée aux douleurs neuropathiques caractérisées par des changements profonds et durables du système nociceptif (modifications de l'expression génique), son blocage pourrait s'avérer efficace dans la réduction de l'allodynie, ce qui indique qu'en contrôlant l'activité de Cav1.2, on pourrait donc diminuer le comportement douloureux mis en place dans la neuropathie, cependant, son rôle sur l'expression du Wind-up reste très limité. Ces

données indiquent que la source d'entrée du calcium dans la cellule reste un élément clé pour déterminer la voie de la signalisation intracellulaire.

L'équipe a mis également en évidence l'existence des modulateurs de ces canaux calciques L. Des modulateurs tels que les récepteurs métabotropiques du glutamate de groupe I (mGluRs I) qui sont capables d'activer ces canaux L en faveur de l'augmentation de la transmission nociceptive. Le deuxième objectif alors de ces travaux de thèse est d'étudier l'implication de ces canaux dans un autre cadre pathologique : les douleurs inflammatoires, et l'éventuelle interaction canaux L/mGluRs I. En utilisant les approches suivantes : électrophysiologie *in vivo*, comportement, et étude moléculaire, nos résultats ont montré que contrairement aux douleurs neuropathiques, les canaux L ne s'impliquent pas dans le cadre des douleurs inflammatoires. Par contre, nos résultats ont montré que les mGluRs I pourraient être des cibles intéressants dans les conditions inflammatoires en diminuant la transmission nociceptive au niveau spinal, et que leur effet anti-nociceptif reste indépendant des canaux L. Quant en conditions contrôles, les mGluRs I augmentent la transmission nociceptive, cet effet nécessite l'activation des canaux calciques L.

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

(1S, 3R)-ACPD: (1R, 3R)-1-Aminocyclopentane-*cis*-1, 3-dicarboxylic acid

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

ASIC: acid-sensing ion channels

BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor (facteur neurotrophique issu du cerveau)

BK: Bradykinine receptor

CaM: calmodulin

CaMK: Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase

CAN: Cationic Non specific

CAv: voltage dependant Calcium channel

CCI: Chronic Constriction Injury

CFA: Complete Freund Adjuvant (Adjuvant complet de Freund)

CGRP: Calcitonin-Gené Related Peptide (peptide relié au gène calcitonine)

Cox: CycloOxygénase

CRE: cAMP responsive element

CREB : CRE-binding protein

DHNs: Dorsal Horn Neurons (neurones de la corne dorsale)

DMSO: DiMethyl SulfOxyde

DRG: Dorsal Root Ganglion (ganglion rachidien dorsal)

ERK: extracellular signal regulated kinase

GABA: gamma-aminobutyric acid (L'acide γ -aminobutyrique)

IP₃: inositol 1,4,5-triphosphate

MAPK: mitogen-activated protein kinase

mGluRs I: Metabotropic Glutamate Receptors group I (récepteurs métabotropiques de groupe I)

MPEP: 6-Methyl-2-(phenylethynyl)pyridine hydrochloride

CHPG: α -Amino-2-chloro-5-hydroxybenzeneacetic acid, (RS)-2-Chloro-5-hydroxyphenylglycine

N.S: Non Significatif

Nav : voltage dependant sodium channels

NMDA: N-méthyl-D-aspartate

NSAIDs: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (Anti-inflammatoires nons stéroïdiens)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PA : Potentiel d'Action

PKA: protein kinase A

PKC: Protein kinase C

PLC: Phospholipase C

PNA: Peptid Nucleic Acid

PNL: Partial Nerve Ligation (Ligation Partielle nerveuse)

SNI: Spare Nerve Injury

SNL: Spinal Nerve Ligation (ligature du nerf spinal)

TREK: Temperature Responsive potassium channel

TRMP: Temperature sensitive channel

TRPV: Temperature sensitive vanilloid receptor-like

WDR: Wide Dynamic Range (neurone à convergence)

FIGURES & TABLEAUX

Figure 1 : les différents récepteurs aux stimuli nociceptifs et transduction du signal.....	17
Figure 2 : les quatre composantes de la douleur	19
Figure 3 : l'échelle allant de 0 jusqu'à 10 représente les différentes intensités de douleur	20
Figure 4 : les différents capteurs sensoriels cutanés.....	26
Tableau 1 : Le tableau récapitule les différentes caractéristiques de fibres nociceptives	28
Figure 5 : le canal vertébral contenant la moelle épinière. Une coupe transversale de la moelle épinière.....	29
Figure 6 : organisation laminaire de la moelle épinière	30
Figure 7 : projection de différentes afférences primaires.....	31
Figure 8 : l'élargissement d'un champ récepteur cutané au niveau de la patte de l'animal	32
Figure 9 : le phénomène d'Hyperalgésie et d'Allodynie	33
Figure 10 : le phénomène de Wind up chez le rat (exemple 1)	37
Figure 11 : le phénomène de Wind up chez le rat (exemple 2)	38
Figure 12 : machinerie intracellulaire mise en place sans activation génique	41
Figure 13 : maintenance de la sensibilisation centrale "sensibilisation à long terme" qui implique des modifications de l'expression génique	42
Figure 14 : les quatre modèles de neuropathie périphérique	46
Figure 15 : la soupe inflammatoire	49
Figure 16 : structure générale d'un canal calcique	51
Figure 17 : phylogénie de canaux calciques voltage-dépendants	51
Figure 18 : les plus importantes distributions des canaux calciques de type L.....	54
Figure 19 : représentation schématique du récepteur métabotrope au glutamate ...	56
Figure 20 : l'organigramme de différents types de récepteurs métabotropiques glutamatergiques.....	57
Figure 21 : illustration schématique de différents groupes de récepteurs métabotropiques du glutamate : groupe I, II, et III	57
Figure 22 : représentation schématique définie pour étudier l'implication de Cav1.2 et Cav1.3 dans le phénomène de Wind-up	70
Tableau 02 : les composantes synaptiques g en S/cm^2	71
Tableau 03 : les composantes non-synaptiques g en S/cm^2	72
Figure 23 : instrument du test de Von Frey	79
Figure 24 : le plan expérimental	79
Figure 25 A : distribution différentielle au niveau de la corne dorsal de la moelle épinière Cav1.2 et Cav1.3	84
Figure 25 B, C, D, et E : le modèle computationnel de décharge neuronal des neurones WDR en absence et en présence les canaux calciques de type L.....	85
Figure 26 A : rôle de Cav1.2 et de Cav1.3 sur les potentiels du plateau et Wind-up....	86
Figure 26 B, C, et D : rôle de Cav1.2 et de Cav1.3 sur les potentiels du plateau et Wind-up	87

Figure 27 : le modèle computationnel de neurones WDR	88
Figure 28 : l'implication de la composante synaptique dans le phénomène de Wind-up	89
Figure 29 : L'expression de Wind-up dépende de canaux calciques de type L chez le rat adulte et le raton	91
Figure 30 : le knock-down in vivo des canaux calciques de type L: Cav1.2 et Cav1.3 par la stratégie anti-sens.....	94
Figure 31 : Cav1.3 est nécessaire pour l'expression de Wind-up du reflexe nociceptif de flexion	95
Figure 32 : diminution d'expression de Cav1.3 et l'amplitude de Wind-up dans les conditions neuropathiques	98
Figure 33 : l'effet analgésique d'Anti-Cav1.2 sur l'expression d'allodynie mécanique dans le contexte de neuropathie	99
Figure 34 : l'expression de Wind-up est Cav1.3 –expression- dépendante dans les conditions neuropathiques	100
Figure 35 : potentiel du plateau et Wind-up ne sont pas affectés d'une façon similaire par le changement d'expression de canaux calciques de type L	102
Figure 36 : représentation de la réponse C nociceptive	103
Figure 37 : administration de la drogue par la voie intrathécale.....	118
Figure 38 : les principaux étapes de Western-Blot	118
Figure 39 : l'effet nociceptif de l'1S, 3R-ACPD nécessite l'activation des canaux calciques de type L chez les animaux naïfs.....	122
Figure 40 : l'effet de l'activation des mGluRs I par la voie intrathécale sur l'allodynie mécanique chez les animaux contrôles	127
Figure 41 : l'injection de CFA induit une allodynie.....	129
Figure 42 : l'effet de l'activation des mGluRs I par la voie intrathécale sur l'allodynie mécanique chez les animaux enflammés	130
Figure 43 : l'effet anti-nociceptif de l'1S, 3R-ACPD est indépendant des canaux calciques de type L chez les animaux enflammés	131
Figure 44 : l'effet de l'3R-ACPD en présence des antagonistes des récepteurs GABA-ergiques (Picrotoxine) et Glycinergiques (Strychnine) dans les conditions inflammatoires	132
Figure 45 : l'impact de l'inflammation sur la transcription de mGluR1a / b et mGluR5 spinaux.....	134
Figure 46 : l'impact de l'inflammation sur l'expression protéique de mGluR5.....	136
Figure 47 : l'effet anti-nociceptif de CHPG dans les conditions inflammatoires.....	137
Figure 48 : l'impact de l'inflammation sur la transcription du Cav1.2 et Cav1.3....	137
Figure 49 : schéma récapitulatif hypothétique expliquant l'effet de l'1S, 3R-ACPD dans les conditions contrôles	139
Figure 50 A : schéma récapitulatif hypothétique expliquant l'effet de l'1S, 3R-ACPD dans les conditions inflammatoires.....	139
Figure 50 B : schéma récapitulatif hypothétique expliquant l'effet de l'1S, 3R-ACPD dans les conditions inflammatoires.....	140

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aguiar, P., Sousa, M., Lima, D., 2010. NMDA channels together with L-type calcium currents and calcium-activated nonspecific cationic currents are sufficient to generate windup in WDR neurons. *J Neurophysiol* 104, 1155-1166.
- Al-Ghoul, W.M., Li Volsi, G., Weinberg, R.J., Rustioni, A., 1993. Glutamate immunocytochemistry in the dorsal horn after injury or stimulation of the sciatic nerve of rats. *Brain Res Bull* 30, 453-459.
- Alvarez, F.J., Villalba, R.M., Carr, P.A., Grandes, P., Somohano, P.M., 2000. Differential distribution of metabotropic glutamate receptors 1a, 1b, and 5 in the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 422, 464-487.
- Anwyl, R., 1999. Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Brain Res Rev* 29, 83-120.
- Apkarian, A.V., Sosa, Y., Krauss, B.R., Thomas, P.S., Fredrickson, B.E., Levy, R.E., Harden, R.N., Chialvo, D.R., 2004. Chronic pain patients are impaired on an emotional decision-making task. *Pain* 108, 129-136.
- Arner, S., Meyerson, B.A., 1988. Lack of analgesic effect of opioids on neuropathic and idiopathic forms of pain. *Pain* 33, 11-23.
- Artola, A., Brocher, S., Singer, W., 1990. Different voltage-dependent thresholds for inducing long-term depression and long-term potentiation in slices of rat visual cortex. *Nature* 347, 69-72.
- Attal, N., Bouhassira, D., 2006. Chapter 47 Pain in syringomyelia/bulbia. *Handb Clin Neurol* 81, 705-713.
- Azkue, J.J., Murga, M., Fernandez-Capetillo, O., Mateos, J.M., Elezgarai, I., Benitez, R., Osorio, A., Diez, J., Puente, N., Bilbao, A., Bidaurrezaga, A., Kuhn, R., Grandes, P., 2001. Immunoreactivity for the group III metabotropic glutamate receptor subtype mGluR4a in the superficial laminae of the rat spinal dorsal horn. *J Comp Neurol* 430, 448-457.
- Baker, H.J., Lindsey, J.R., and Weisbroth, S.H., 1980. *The laboratory rat*. Academic press.
- Baranauskas, G., Nistri, A., 1996. NMDA receptor-independent mechanisms responsible for the rate of rise of cumulative depolarization evoked by trains of dorsal root stimuli on rat spinal motoneurons. *Brain Res* 738, 329-332.
- Baranauskas, G., Nistri, A., 1998. Sensitization of pain pathways in the spinal cord: cellular mechanisms. *Prog Neurobiol* 54, 349-365.
- Barbieri, M., Nistri, A., 2001. Depression of windup of spinal neurons in the neonatal rat spinal cord in vitro by an NK3 tachykinin receptor antagonist. *J Neurophysiol* 85, 1502-1511.
- Baron, R., 2000. Peripheral neuropathic pain: from mechanisms to symptoms. *Clin J Pain* 16, S12-20.
- Basbaum A, J.T., 2000. The perception of pain.
- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., Julius, D., 2009. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139, 267-284.
- Basbaum, A.I., Julius, D., 2006. Toward better pain control. *Sci Am* 294, 60-67.
- Battaglia, G., Rustioni, A., 1988. Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. *J Comp Neurol* 277, 302-312.
- Bennett, G.J., Xie, Y.K., 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33, 87-107.
- Besson, J.M., Chaouch, A., 1987. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol Rev* 67, 67-186.
- Bessou, P., Perl, E.R., 1969. Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *J Neurophysiol* 32, 1025-1043.

Bhave, G., Karim, F., Carlton, S.M., Gereau, R.W.t., 2001. Peripheral group I metabotropic glutamate receptors modulate nociception in mice. *Nat Neurosci* 4, 417-423.

Kolber BJ, 2015. mGluRs head to toe in pain. *Prog Mol Biol Transl Sci* 281-324.

Bliddal, H., Danneskiold-Samsoe, B., 2007. Chronic widespread pain in the spectrum of rheumatological diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 21, 391-402.

Bond, A., Lodge, D., 1995. Pharmacology of metabotropic glutamate receptor-mediated enhancement of responses to excitatory and inhibitory amino acids on rat spinal neurones *in vivo*. *Neuropharmacology* 34, 1015-1023.

Bourinet, E., Alloui, A., Monteil, A., Barrere, C., Couette, B., Poirot, O., Pages, A., McRory, J., Snutch, T.P., Eschalier, A., Nargeot, J., 2005. Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *EMBO J* 24, 315-324.

Boxall, S.J., Berthele, A., Laurie, D.J., Sommer, B., Zieglgansberger, W., Urban, L., Tolle, T.R., 1998. Enhanced expression of metabotropic glutamate receptor 3 messenger RNA in the rat spinal cord during ultraviolet irradiation induced peripheral inflammation. *Neuroscience* 82, 591-602.

Braz, J.M., Nassar, M.A., Wood, J.N., Basbaum, A.I., 2005. Parallel "pain" pathways arise from subpopulations of primary afferent nociceptor. *Neuron* 47, 787-793.

Bridges, D., Thompson, S.W., Rice, A.S., 2001. Mechanisms of neuropathic pain. *Br J Anaesth* 87, 12-26.

Budai, D., Larson, A.A., 1998. The involvement of metabotropic glutamate receptors in sensory transmission in dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience* 83, 571-580.

Bussing, A., Khalsa, S.B., Michalsen, A., Sherman, K.J., Telles, S., 2012. Yoga as a therapeutic intervention. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012, 174291.

Calvino, B., Villanueva, L., Le Bars, D., 1987. Dorsal horn (convergent) neurones in the intact anaesthetized arthritic rat. II. Heterotopic inhibitory influences. *Pain* 31, 359-379.

Campbell, J.N., Meyer, R.A., 2006. Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron* 52, 77-92.

Carlton, S.M., Du, J., Zhou, S., 2009. Group II metabotropic glutamate receptor activation on peripheral nociceptors modulates TRPV1 function. *Brain Res* 1248, 86-95.

Carlton, S.M., Hargett, G.L., Coggeshall, R.E., 2001. Localization of metabotropic glutamate receptors 2/3 on primary afferent axons in the rat. *Neuroscience* 105, 957-969.

Caterina, M.J., Rosen, T.A., Tominaga, M., Brake, A.J., Julius, D., 1999. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398, 436-441.

Catterall, W.A., Few, A.P., 2008. Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron* 59, 882-901.

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

Cerne, R., Randic, M., 1992. Modulation of AMPA and NMDA responses in rat spinal dorsal horn neurons by trans-1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid. *Neurosci Lett* 144, 180-184.

Chaplan, S.R., Pogrel, J.W., Yaksh, T.L., 1994. Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in experimental tactile allodynia. *J Pharmacol Exp Ther* 269, 1117-1123.

Chapman, V., Diaz, A., Dickenson, A.H., 1997. Distinct inhibitory effects of spinal endomorphin-1 and endomorphin-2 on evoked dorsal horn neuronal responses in the rat. *Br J Pharmacol* 122, 1537-1539.

Chapman, V., Dickenson, A.H., 1993. The effect of intrathecal administration of RP67580, a potent neurokinin 1 antagonist on nociceptive transmission in the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 157, 149-152.

Chapman, V., Haley, J.E., Dickenson, A.H., 1994. Electrophysiologic analysis of preemptive effects of spinal opioids on N-methyl-D-aspartate receptor-mediated events. *Anesthesiology* 81, 1429-1435.

Chen, S.R., Pan, H.L., 2005. Distinct roles of group III metabotropic glutamate receptors in control of nociception and dorsal horn neurons in normal and nerve-injured Rats. *J Pharmacol Exp Ther* 312, 120-126.

Chiechio S, C.A., Melchiorri D, Canudas AM, Storto M, Calvani M, Nicolai R, Nicoletti F., 2004. Metabotropic receptors as targets for drugs of potential use in the treatment of neuropathic pain. *J Endocrinol Invest.*, 171-176.

Choi, S., Na, H.S., Kim, J., Lee, J., Lee, S., Kim, D., Park, J., Chen, C.C., Campbell, K.P., Shin, H.S., 2007. Attenuated pain responses in mice lacking Ca(V)3.2 T-type channels. *Genes Brain Behav* 6, 425-431.

Woolf CJ, 1996. Windup and central sensitization are not equivalent. *Pain*, 105-108.

Clark, N.C., Nagano, N., Kuenzi, F.M., Jarolimek, W., Huber, I., Walter, D., Wietzorrek, G., Boyce, S., Kullmann, D.M., Striessnig, J., Seabrook, G.R., 2003. Neurological phenotype and synaptic function in mice lacking the CaV1.3 alpha subunit of neuronal L-type voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Neuroscience* 120, 435-442.

Coggeshall, R.E., Lekan, H.A., Doubell, T.P., Allchorne, A., Woolf, C.J., 1997. Central changes in primary afferent fibers following peripheral nerve lesions. *Neuroscience* 77, 1115-1122.

Conn, P.J., Pin, J.P., 1997. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37, 205-237.

Cook, A.J., Woolf, C.J., Wall, P.D., McMahon, S.B., 1987. Dynamic receptive field plasticity in rat spinal cord dorsal horn following C-primary afferent input. *Nature* 325, 151-153.

Croft P., L.M., Hannaford P., , 2003. Is all chronic pain the same? A 25-year follow-up study. *Pain*.

Cruccu, G., Aziz, T.Z., Garcia-Larrea, L., Hansson, P., Jensen, T.S., Lefaucheur, J.P., Simpson, B.A., Taylor, R.S., 2007. EFNS guidelines on neurostimulation therapy for neuropathic pain. *Eur J Neurol* 14, 952-970.

Dai Y., Wang, H., Ogawa, A., Yamanaka, H., Obata, K., Tokunaga, A., Noguchi, K., 2005. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in the spinal cord contributes to neuropathic pain in a rat model of mononeuropathy. *Eur J Neurosci* 21, 2467-2474.

Dalton, 1998. A call for standardizing the clinical rating of pain intensity using a 0 to 10 rating scale. *Cancer Nurs* 46-9.

David Borsook, M.D., 2012. A future without chronic pain: Neuroscience and clinical research *Cerebrum*.

Davies SN, L.D., 1987. Evidence for involvement of N-methylaspartate receptors in 'wind-up' of class 2 neurones in the dorsal horn of the rat. *Brain Res.* 402-6.

DE., C., 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature.*, 517-524.

Decosterd, I., Woolf, C.J., 2000. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87, 149-158.

Derjean, D., Bertrand, S., Le Masson, G., Landry, M., Morisset, V., Nagy, F., 2003. Dynamic balance of metabotropic inputs causes dorsal horn neurons to switch functional states. *Nat Neurosci* 6, 274-281.

Devor, M., 2001. neuropathic pain : what do we do with all these theories ? . *Acta Anaesthesiol scand* 45;; 1121, 1127.

Diaz, A., Dickenson, A.H., 1997. Blockade of spinal N- and P-type, but not L-type, calcium channels inhibits the excitability of rat dorsal horn neurones produced by subcutaneous formalin inflammation. *Pain* 69, 93-100.

Dickenson, A.H., Sullivan, A.F., 1986. Electrophysiological studies on the effects of intrathecal morphine on nociceptive neurones in the rat dorsal horn. *Pain* 24, 211-222.

Dickenson, A.H., Sullivan, A.F., 1987. Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurones following C fibre stimulation. *Neuropharmacology* 26, 1235-1238.

Dmitrieva, N., Rodriguez-Malaver, A.J., Perez, J., Hernandez, L., 2004. Differential release of neurotransmitters from superficial and deep layers of the dorsal horn in response to acute noxious stimulation and inflammation of the rat paw. *Eur J Pain* 8, 245-252.

Dobremez, E., Bouali-Benazzouz, R., Fossat, P., Monteils, L., Dulluc, J., Nagy, F., Landry, M., 2005. Distribution and regulation of L-type calcium channels in deep dorsal horn neurons after sciatic nerve injury in rats. *Eur J Neurosci* 21, 3321-3333.

Dogrul, A., Ossipov, M.H., Lai, J., Malan, T.P., Jr., Porreca, F., 2000. Peripheral and spinal antihyperalgesic activity of SIB-1757, a metabotropic glutamate receptor (mGluR(5)) antagonist, in experimental neuropathic pain in rats. *Neurosci Lett* 292, 115-118.

Dolan, S., Kelly, J.G., Monteiro, A.M., Nolan, A.M., 2003. Up-regulation of metabotropic glutamate receptor subtypes 3 and 5 in spinal cord in a clinical model of persistent inflammation and hyperalgesia. *Pain* 106, 501-512.

Dowdall, T., Robinson, I., Meert, T.F., 2005. Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury. *Pharmacol Biochem Behav* 80, 93-108.

Dubin, A.E., Patapoutian, A., 2010. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest* 120, 3760-3772.

Dubner, R., 1983. Pain research in animals. *Ann N Y Acad Sci* 406, 128-132.

Dubner, R., Bennett, G.J., 1983. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. *Annu Rev Neurosci* 6, 381-418.

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

Dworkin, R.H., O'Connor, A.B., Backonja, M., Farrar, J.T., Finnerup, N.B., Jensen, T.S., Kalso, E.A., Loeser, J.D., Miaskowski, C., Nurmikko, T.J., Portenoy, R.K., Rice, A.S., Stacey, B.R., Treede, R.D., Turk, D.C., Wallace, M.S., 2007. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain* 132, 237-251.

Egholm M, B.O., Christensen L, Behrens C, Freier SM, et al., 1993. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rule . *Nature*, 566-568.

Eide PK, S.A., Stenehjem AE. , 1995. Central dysesthesia pain after traumatic spinal cord injury is dependent on N-methyl-D-aspartate receptor activation. *Neurosurgery*, 1080-1087.

Enz, R., 2012. Structure of metabotropic glutamate receptor C-terminal domains in contact with interacting proteins. *Front Mol Neurosci* 5, 52.

Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R.W., Catterall, W.A., 2000. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25, 533-535.

Boureau F, 1999. Modèles théoriques cognitifs et comportementaux de la douleur chronique. *Douleur analog*, 265 – 272

Festing, M.F.W., 1979. Suitability of the rat for different investigations. In: *Inbred and Genetically Defined Strains of Laboratory Animals*. . Fed. Am. Soc. Exper. Biol., 237-238.

Field KJ, W.W., Lang CM., 1993. Anaesthetic effects of chloral hydrate, pentobarbitone and urethane in adult male rats. *Lab Anim*, 258-269.

Filos KS, G.L., Patroni O, Tassoudis V., 1993. Analgesia with epidural nimodipine. *Lancet*.

Fink, R., 2000. Pain assessment: the cornerstone to optimal pain management. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 13, 236-239.

Finnerup, N.B., Otto, M., McQuay, H.J., Jensen, T.S., Sindrup, S.H., 2005. Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. *Pain* 118, 289-305.

Fisher, K., Coderre, T.J., 1996a. Comparison of nociceptive effects produced by intrathecal administration of mGluR agonists. *Neuroreport* 7, 2743-2747.

Fisher, K., Coderre, T.J., 1996b. The contribution of metabotropic glutamate receptors (mGluRs) to formalin-induced nociception. *Pain* 68, 255-263.

Fisher, K., Coderre, T.J., 1998. Hyperalgesia and allodynia induced by intrathecal (RS)-dihydroxyphenylglycine in rats. *Neuroreport* 9, 1169-1172.

Fisher, K., Lefebvre, C., Coderre, T.J., 2002. Antinociceptive effects following intrathecal pretreatment with selective metabotropic glutamate receptor compounds in a rat model of neuropathic pain. *Pharmacol Biochem Behav* 73, 411-418.

Flavell, S.W., Greenberg, M.E., 2008. Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 31, 563-590.

Fossat, P., Dobremez, E., Bouali-Benazzouz, R., Favereaux, A., Bertrand, S.S., Kilk, K., Leger, C., Cazalets, J.R., Langel, U., Landry, M., Nagy, F., 2010. Knockdown of L calcium channel subtypes: differential effects in neuropathic pain. *J Neurosci* 30, 1073-1085.

Fossat, P., Sibon, I., Le Masson, G., Landry, M., Nagy, F., 2007. L-type calcium channels and NMDA receptors: a determinant duo for short-term nociceptive plasticity. *Eur J Neurosci* 25, 127-135.

Fukuizumi, T., Ohkubo, T., Kitamura, K., 2003. Spinal sensitization mechanism in vincristine-induced hyperalgesia in mice. *Neurosci Lett* 343, 89-92.

Fundytus, M.E., 2001. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. *CNS Drugs* 15, 29-58.

Fundytus, M.E., Yashpal, K., Chabot, J.G., Osborne, M.G., Lefebvre, C.D., Dray, A., Henry, J.L., Coderre, T.J., 2001. Knockdown of spinal metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR(1)) alleviates pain and restores opioid efficacy after nerve injury in rats. *Br J Pharmacol* 132, 354-367.

Gao, Y.J., Ji, R.R., 2010. Light touch induces ERK activation in superficial dorsal horn neurons after inflammation: involvement of spinal astrocytes and JNK signaling in touch-evoked central sensitization and mechanical allodynia. *J Neurochem* 115, 505-514.

Gebhart GF, B.A., BIRD SJ et al. , 2009. Recognition and alleviation of pain in laboratory animals. The National Academies Press, Washington, D.C.

Gereau RW, S.G., 2008. The Glutamate Receptors. Totowa, NJ: Humana Press.

Gilchrist, H.D., Allard, B.L., Simone, D.A., 1996. Enhanced withdrawal responses to heat and mechanical stimuli following intraplantar injection of capsaicin in rats. *Pain* 67, 179-188.

Gjerstad, J., Tjolsen, A., Hole, K., 1996. The effect of 5-HT_{1A} receptor stimulation on nociceptive dorsal horn neurones in rats. *Eur J Pharmacol* 318, 315-321.

Glass, J.M., Park, D.C., Minear, M., Crofford, L.J., 2005. Memory beliefs and function in fibromyalgia patients. *J Psychosom Res* 58, 263-269.

Gozariu M, B.D., Willer JC, Le Bars D, 1997. Temporal summation of C-fiber afferent inputs: competition between facilitatory and inhibitory effects on C-fiber reflex in the rat. *J Neurophysiol*, 3165-3179.

Grelik, C., Bennett, G.J., Ribeiro-da-Silva, A., 2005. Autonomic fibre sprouting and changes in nociceptive sensory innervation in the rat lower lip skin following chronic constriction injury. *Eur J Neurosci* 21, 2475-2487.

Gupta, M., Singh, J., Sood, S., Arora, B., 2003. Mechanism of antinociceptive effect of nimodipine in experimental diabetic neuropathic pain. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 25, 49-52.

Hains, B.C., Saab, C.Y., Lo, A.C., Waxman, S.G., 2004. Sodium channel blockade with phenytoin protects spinal cord axons, enhances axonal conduction, and improves functional motor recovery after contusion SCI. *Exp Neurol* 188, 365-377.

Hara, K., Saito, Y., Kirihaara, Y., Sakura, S., Kosaka, Y., 1998. Antinociceptive effects of intrathecal L-type calcium channel blockers on visceral and somatic stimuli in the rat. *Anesth Analg* 87, 382-387.

Hargreaves KM, T.E., Dionne RA, Schmidt EA, Schafer SC, Joris JL, 1988. Bradykinin is increased during acute and chronic inflammation: therapeutic implications. *Clin Pharmacol Ther*, 613-621.

Heinke, B., Sandkuhler, J., 2007. Group I metabotropic glutamate receptor-induced Ca(2+)-gradients in rat superficial spinal dorsal horn neurons. *Neuropharmacology* 52, 1015-1023.

Heinke B, S.J., 2005. Signal transduction pathways of group I metabotropic glutamate receptor-induced long-term depression at sensory spinal synapses. *Pain* 145–154.

Helton, T.D., Xu, W., Lipscombe, D., 2005. Neuronal L-type calcium channels open quickly and are inhibited slowly. *J Neurosci* 25, 10247-10251.

Hendrich, J., Van Minh, A.T., Hebllich, F., Nieto-Rostro, M., Watschinger, K., Striessnig, J., Wratten, J., Davies, A., Dolphin, A.C., 2008. Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the alpha2delta ligand gabapentin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3628-3633.

Herrero JF, L.J., López-García JA., 2000. Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? *Prog Neurobiol.*, 169-203.

Hirata, H., Aston-Jones, G., 1994. A novel long-latency response of locus coeruleus neurons to noxious stimuli: mediation by peripheral C-fibers. *J Neurophysiol* 71, 1752-1761.

HL, F., 1988. Can opiates relieve neuropathic pain? *Pain*.

Hounsgaard, J., Kiehn, O., 1993. Calcium spikes and calcium plateaux evoked by differential polarization in dendrites of turtle motoneurons in vitro. *J Physiol* 468, 245-259.

Hu, J., Milenkovic, N., Lewin, G.R., 2006. The high threshold mechanotransducer: a status report. *Pain* 120, 3-7.

Hudson LJ, B.S., McNair K, Gentry C, Fox A, Kuhn R & Winter J 2002. Metabotropic glutamate receptor up-regulation in A-fibers after spinal nerve injury: 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP) reverses the induced thermal hyperalgesia. *J neurosciences* 22,, 2660-2668.

Iadarola, M.J., Brady, L.S., Draisci, G., Dubner, R., 1988. Enhancement of dynorphin gene expression in spinal cord following experimental inflammation: stimulus specificity, behavioral parameters and opioid receptor binding. *Pain* 35, 313-326.

Jankowski, M.P., Koerber, H.R., 2010. Neurotrophic Factors and Nociceptor Sensitization.

Jensen TS, B.R., 2003. Translation of symptoms and signs into mechanisms in neuropathic pain. *Pain*, 1-8.

Jevtovic-Todorovic V, W.D., Powell S, Nardi A, Olney JW., 1998 Clonidine potentiates the neuropathic pain-relieving action of MK-801 while preventing its neurotoxic and hyperactivity side effects. *Brain Res*, 202-211.

Ji RR, K.T., Moore KA, Woolf C.J., 2003a. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci*, 696-705.

Jia, H., Rustioni, A., Valtschanoff, J.G., 1999. Metabotropic glutamate receptors in superficial laminae of the rat dorsal horn. *J Comp Neurol* 410, 627-642.

Johnston, G.A., 1996. GABAA receptor pharmacology. *Pharmacol Ther* 69, 173-198.

Julius, D., Basbaum, A.I., 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203-210.

Kaneko, M., Hammond, D.L., 1997. Role of spinal gamma-aminobutyric acidA receptors in formalin-induced nociception in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 282, 928-938.

Kellstein DE, P.D., Hayes RL, Mayer DJ., 1990. Evidence that substance P selectively modulates C-fiber-evoked discharges of dorsal horn nociceptive neurons. *Brain Res.*, 291-298.

Kim, K.J., Yoon, Y.W., Chung, J.M., 1997. Comparison of three rodent neuropathic pain models. *Exp Brain Res* 113, 200-206.

Kim, S.H., Chung, J.M., 1992. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50, 355-363.

Koch T, H.H., Andersen P, Larsen T, Batz HG, et al. , 1997. Improvements in automated PNA synthesis using Boc/Z monomers. *J Pept Res*, 80-88.

Koschak, A., Reimer, D., Huber, I., Grabner, M., Glossmann, H., Engel, J., Striessnig, J., 2001. alpha 1D (Cav1.3) subunits can form I-type Ca²⁺ channels activating at negative voltages. *J Biol Chem* 276, 22100-22106.

Krause, J.E., DiMaggio, D.A., McCarson, K.E., 1995. Alterations in neurokinin 1 receptor gene expression in models of pain and inflammation. *Can J Physiol Pharmacol* 73, 854-859.

Laird, J.M., Bennett, G.J., 1993. An electrophysiological study of dorsal horn neurons in the spinal cord of rats with an experimental peripheral neuropathy. *J Neurophysiol* 69, 2072-2085.

Laird, J.M., Cervero, F., 1989. A comparative study of the changes in receptive-field properties of multireceptive and nociceptive rat dorsal horn neurons following noxious mechanical stimulation. *J Neurophysiol* 62, 854-863.

Lambert, R.C., McKenna, F., Maulet, Y., Talley, E.M., Bayliss, D.A., Cribbs, L.L., Lee, J.H., Perez-Reyes, E., Feltz, A., 1998. Low-voltage-activated Ca²⁺ currents are generated by members of the CavT subunit family (alpha1G/H) in rat primary sensory neurons. *J Neurosci* 18, 8605-8613.

LaMotte, R.H., Shain, C.N., Simone, D.A., Tsai, E.F., 1991. Neurogenic hyperalgesia: psychophysical studies of underlying mechanisms. *J Neurophysiol* 66, 190-211.

Larsson, M., Broman, J., 2008. Translocation of GluR1-containing AMPA receptors to a spinal nociceptive synapse during acute noxious stimulation. *J Neurosci* 28, 7084-7090.

Latremoliere, A., Woolf, C.J., 2009. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 10, 895-926.

Lawson, S.N., Crepps, B.A., Perl, E.R., 1997. Relationship of substance P to afferent characteristics of dorsal root ganglion neurones in guinea-pig. *J Physiol* 505 (Pt 1), 177-191.

Lekan HA, C.S., Coggeshall RE., 1996. Sprouting of A beta fibers into lamina II of the rat dorsal horn in peripheral neuropathy. *Neurosci Lett*, 147-150.

Li, H., Ohishi, H., Kinoshita, A., Shigemoto, R., Nomura, S., Mizuno, N., 1997. Localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR7, in axon terminals of presumed nociceptive, primary afferent fibers in the superficial layers of the spinal dorsal horn: an electron microscope study in the rat. *Neurosci Lett* 223, 153-156.

Li, J., Simone, D.A., Larson, A.A., 1999. Windup leads to characteristics of central sensitization. *Pain* 79, 75-82.

Lipscombe, D., Helton, T.D., Xu, W., 2004. L-type calcium channels: the low down. *J Neurophysiol* 92, 2633-2641.

Lipscombe, D., Pan, J.Q., Gray, A.C., 2002. Functional diversity in neuronal voltage-gated calcium channels by alternative splicing of Ca(v)alpha1. *Mol Neurobiol* 26, 21-44.

Livak KJ, S.T., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods.*, 402-408.

Lundberg, L.E., Jorum, E., Holm, E., Torebjork, H.E., 1992. Intra-neural electrical stimulation of cutaneous nociceptive fibres in humans: effects of different pulse patterns on magnitude of pain. *Acta Physiol Scand* 146, 41-48.

Luo C, G.V., Bali KK, Xie RG, Agarwal N, Kurejova M, Tappe-Theodor A, Tegeder I, Feil S, Lewin G, Polgar E, Todd AJ, Schlossmann J, Hofmann F, Liu DL, Hu SJ, Feil R, Kuner T, Kuner R., 2012. Presynaptically localized cyclic GMP-dependent protein kinase 1 is a key determinant of spinal synaptic potentiation and pain hypersensitivity. *PLoS Biol.*

Lytton, W.W., 1996. Optimizing synaptic conductance calculation for network simulations. *Neural Comput* 8, 501-509.

Ma, Q.P., Woolf, C.J., 1996. Basal and touch-evoked fos-like immunoreactivity during experimental inflammation in the rat. *Pain* 67, 307-316.

Ma, W., Hatzis, C., Eisenach, J.C., 2003. Intrathecal injection of cAMP response element binding protein (CREB) antisense oligonucleotide attenuates tactile allodynia caused by partial sciatic nerve ligation. *Brain Res* 988, 97-104.

Macdonald G, L.M., 2005. Why does social exclusion hurt? The relationship between social and physical pain. *Psychological bulletin*, 281-287.

Magerl, W., Wilk, S.H., Treede, R.D., 1998. Secondary hyperalgesia and perceptual wind-up following intradermal injection of capsaicin in humans. *Pain* 74, 257-268.

Maione, S., Oliva, P., Marabese, I., Palazzo, E., Rossi, F., Berrino, L., Filippelli, A., 2000. Periaqueductal gray matter metabotropic glutamate receptors modulate formalin-induced nociception. *Pain* 85, 183-189.

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

Malmberg, A.B., Yaksh, T.L., 1994. Voltage-sensitive calcium channels in spinal nociceptive processing: blockade of N- and P-type channels inhibits formalin-induced nociception. *J Neurosci* 14, 4882-4890.

Mannion, R.J., Costigan, M., Decosterd, I., Amaya, F., Ma, Q.P., Holstege, J.C., Ji, R.R., Acheson, A., Lindsay, R.M., Wilkinson, G.A., Woolf, C.J., 1999. Neurotrophins: peripherally and centrally acting modulators of tactile stimulus-induced inflammatory pain hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9385-9390.

Matthews, E.A., Dickenson, A.H., 2001. Effects of ethosuximide, a T-type Ca(2+) channel blocker, on dorsal horn neuronal responses in rats. *Eur J Pharmacol* 415, 141-149.

McCracken, L.M., Iverson, G.L., 2001. Predicting complaints of impaired cognitive functioning in patients with chronic pain. *J Pain Symptom Manage* 21, 392-396.

McQuay, H.J., Tramer, M., Nye, B.A., Carroll, D., Wiffen, P.J., Moore, R.A., 1996. A systematic review of antidepressants in neuropathic pain. *Pain* 68, 217-227.

Meller ST, D.C., Gebhart GF, 1996. Acute thermal hyperalgesia in the rat is produced by activation of N-methyl-D-aspartate receptors and protein kinase C and production of nitric oxide. *Neuroscience*, 327-335.

Mellstrom, B., Naranjo, J.R., 2001. Ca²⁺-dependent transcriptional repression and derepression: DREAM, a direct effector. *Semin Cell Dev Biol* 12, 59-63.

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

Mendell, L.M., 1966. Physiological properties of unmyelinated fiber projection to the spinal cord. *Exp Neurol* 16, 316-332.

Mendell, L.M., Wall, P.D., 1965. Responses of Single Dorsal Cord Cells to Peripheral Cutaneous Unmyelinated Fibres. *Nature* 206, 97-99.

Mico, J.A., Ardid, D., Berrocoso, E., Eschalier, A., 2006. Antidepressants and pain. *Trends Pharmacol Sci* 27, 348-354.

Miletic, G., Pankratz, M.T., Miletic, V., 2002. Increases in the phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein (CREB) and decreases in the content of calcineurin accompany thermal hyperalgesia following chronic constriction injury in rats. *Pain* 99, 493-500.

Millan, M.J., 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57, 1-164.

Millan, M.J., Czlonkowski, A., Morris, B., Stein, C., Arendt, R., Huber, A., Holtt, V., Herz, A., 1988. Inflammation of the hind limb as a model of unilateral, localized pain: influence on multiple opioid systems in the spinal cord of the rat. *Pain* 35, 299-312.

Miller LR, C.A., 2009. Comorbid chronic pain and depression: who is at risk? . *J Pain*, 619-627.

Milligan, E.D., Watkins, L.R., 2009. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 10, 23-36.

Mills, C.D., Fullwood, S.D., Hulsebosch, C.E., 2001. Changes in metabotropic glutamate receptor expression following spinal cord injury. *Exp Neurol* 170, 244-257.

Miyata, M., Kashiwadani, H., Fukaya, M., Hayashi, T., Wu, D., Suzuki, T., Watanabe, M., Kawakami, Y., 2003. Role of thalamic phospholipase C[β]₄ mediated by metabotropic glutamate receptor type 1 in inflammatory pain. *J Neurosci* 23, 8098-8108.

Morisset, V., Nagy, F., 1996. Modulation of regenerative membrane properties by stimulation of metabotropic glutamate receptors in rat deep dorsal horn neurons. *J Neurophysiol* 76, 2794-2798.

Morisset, V., Nagy, F., 1998. Nociceptive integration in the rat spinal cord: role of non-linear membrane properties of deep dorsal horn neurons. *Eur J Neurosci* 10, 3642-3652.

Morisset, V., Nagy, F., 1999. Ionic basis for plateau potentials in deep dorsal horn neurons of the rat spinal cord. *J Neurosci* 19, 7309-7316.

Morisset, V., Nagy, F., 2000. Plateau potential-dependent windup of the response to primary afferent stimuli in rat dorsal horn neurons. *Eur J Neurosci* 12, 3087-3095.

Mountcastle, V.B., 1980. Pain and temperature sensibilities. In V. B. Mountcastle (Ed.), *Medical physiology* (Chap. 13), 391-427.

Munoz, M., Esteve, R., 2005. Reports of memory functioning by patients with chronic pain. *Clin J Pain* 21, 287-291.

Murase, K., Ryu, P.D., Randic, M., 1986. Substance P augments a persistent slow inward calcium-sensitive current in voltage-clamped spinal dorsal horn neurons of the rat. *Brain Res* 365, 369-376.

Nebe J, V.H., Neugebauer V, Schaible HG., 1997. Omega-agatoxin IVA, a P-type calcium channel antagonist, reduces nociceptive processing in spinal cord neurons with input from the inflamed but not from the normal knee joint--an electrophysiological study in the rat in vivo. *Eur J Neurosci*, 2193-2201.

Neugebauer, V., 2001. Metabotropic glutamate receptors: novel targets for pain relief. *Expert Rev Neurother* 1, 207-224.

Neugebauer V, C.S., 2002. Peripheral metabotropic glutamate receptors as drug targets for pain relief. *Expert Opin Ther Targets.*, 349-361.

Neugebauer, V., Vanegas, H., Nebe, J., Rumenapp, P., Schaible, H.G., 1996. Effects of N- and L-type calcium channel antagonists on the responses of nociceptive spinal cord neurons to mechanical stimulation of the normal and the inflamed knee joint. *J Neurophysiol* 76, 3740-3749.

Niswender, C.M., Conn, P.J., 2010. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50, 295-322.

Noda, K., Anzai, T., Ogata, M., Akita, H., Ogura, T., Saji, M., 2003. Antisense knockdown of spinal-mGluR1 reduces the sustained phase of formalin-induced nociceptive responses. *Brain Res* 987, 194-200.

O'Mara, S.M., Rowan, M.J., Anwyl, R., 1995. Metabotropic glutamate receptor-induced homosynaptic long-term depression and depotentiation in the dentate gyrus of the rat hippocampus in vitro. *Neuropharmacology* 34, 983-989.

Olausson, H., Wessberg, J., Morrison, I., McGlone, F., Vallbo, A., 2010. The neurophysiology of unmyelinated tactile afferents. *Neurosci Biobehav Rev* 34, 185-191.

Park, D.C., Glass, J.M., Minear, M., Crofford, L.J., 2001. Cognitive function in fibromyalgia patients. *Arthritis Rheum* 44, 2125-2133.

Perrier, J.F., Alaburda, A., Hounsgaard, J., 2002. Spinal plasticity mediated by postsynaptic L-type Ca²⁺ channels. *Brain Res Brain Res Rev* 40, 223-229.

Perrier, J.F., Mejia-Gervacio, S., Hounsgaard, J., 2000. Facilitation of plateau potentials in turtle motoneurons by a pathway dependent on calcium and calmodulin. *J Physiol* 528 Pt 1, 107-113.

Pinsker, H.M., Hening, W.A., Carew, T.J., Kandel, E.R., 1973. Long-term sensitization of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science* 182, 1039-1042.

Pionchon, Y.B.Y.e.P., 2006. Douleur orofaciales : diagnostic et traitement. Collection Memento- Paris : Cdp,.

Pitcher, M.H., Ribeiro-da-Silva, A., Coderre, T.J., 2007. Effects of inflammation on the ultrastructural localization of spinal cord dorsal horn group I metabotropic glutamate receptors. *J Comp Neurol* 505, 412-423.

Pooga, M., Soomets, U., Bartfai, T., Langel, U., 2002. Synthesis of cell-penetrating peptide-PNA constructs. *Methods Mol Biol* 208, 225-236.

Price, D.D., Hu, J.W., Dubner, R., Gracely, R.H., 1977. Peripheral suppression of first pain and central summation of second pain evoked by noxious heat pulses. *Pain* 3, 57-68.

Price, D.D., Hull, C.D., Buchwald, N.A., 1971. Intracellular responses of dorsal horn cells to cutaneous and sural nerve A and C fiber stimuli. *Exp Neurol* 33, 291-309.

Radwani, H., Lopez-Gonzalez, M.J., Cattaert, D., Roca-Lapirot, O., Dobremez, E., Bouali-Benazzouz, R., Eiriksdottir, E., Langel, U., Favereaux, A., Errami, M., Landry, M., Fossat, P., 2016. Cav1.2 and Cav1.3 L-type calcium channels independently control short- and long-term sensitization to pain. *J Physiol*.

Rajendra, S., Lynch, J.W., Schofield, P.R., 1997. The glycine receptor. *Pharmacol Ther* 73, 121-146.

Reali, C., Fossat, P., Landry, M., Russo, R.E., Nagy, F., 2011. Intrinsic membrane properties of spinal dorsal horn neurones modulate nociceptive information processing in vivo. *J Physiol* 589, 2733-2743.

Reali, C., Russo, R.E., 2013. Neuronal intrinsic properties shape naturally evoked sensory inputs in the dorsal horn of the spinal cord. *Front Cell Neurosci* 7, 276.

Ren, B.X., Gu, X.P., Zheng, Y.G., Liu, C.L., Wang, D., Sun, Y.E., Ma, Z.L., 2012. Intrathecal injection of metabotropic glutamate receptor subtype 3 and 5 agonist/antagonist attenuates bone cancer pain by inhibition of spinal astrocyte activation in a mouse model. *Anesthesiology* 116, 122-132.

Ren, W., Neugebauer, V., 2010. Pain-related increase of excitatory transmission and decrease of inhibitory transmission in the central nucleus of the amygdala are mediated by mGluR1. *Mol Pain* 6, 93.

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

Richardson I.H, S.S., J.Jones, R.D.Shah, S.Cheema and A.J.Mearns, 1999. A prospective, randomized comparison of preoperative and continuous balanced epidural or paravertebral bupivacaine on post-thoracotomy pain, pulmonary function and stress responses. *British Journal of Anesthesia*, 187-192.

Rumack B.H, 1986. Acetaminophen overdose in children and adolescents. *Pediatr Clin North Am*.

Russo, R.E., Hounsgaard, J., 1994. Short-term plasticity in turtle dorsal horn neurons mediated by L-type Ca²⁺ channels. *Neuroscience* 61, 191-197.

Russo, R.E., Nagy, F., Hounsgaard, J., 1997. Modulation of plateau properties in dorsal horn neurones in a slice preparation of the turtle spinal cord. *J Physiol* 499 (Pt 2), 459-474.

Russo, R.E., Nagy, F., Hounsgaard, J., 1998. Inhibitory control of plateau properties in dorsal horn neurones in the turtle spinal cord in vitro. *J Physiol* 506 (Pt 3), 795-808.

Saegusa, H., Kurihara, T., Zong, S., Kazuno, A., Matsuda, Y., Nonaka, T., Han, W., Toriyama, H., Tanabe, T., 2001. Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca²⁺ channel. *EMBO J* 20, 2349-2356.

Santillan, R., Maestre, J.M., Hurle, M.A., Florez, J., 1994. Enhancement of opiate analgesia by nimodipine in cancer patients chronically treated with morphine: a preliminary report. *Pain* 58, 129-132.

Schaible, H.G., Nebe, J., Neugebauer, V., Ebersberger, A., Vanegas, H., 2000. The role of high-threshold calcium channels in spinal neuron hyperexcitability induced by knee inflammation. *Prog Brain Res* 129, 173-190.

Schaible, H.G., Schmelz, M., Tegeder, I., 2006. Pathophysiology and treatment of pain in joint disease. *Adv Drug Deliv Rev* 58, 323-342.

Schoffnegger, D., Ruscheweyh, R., Sandkuhler, J., 2008. Spread of excitation across modality borders in spinal dorsal horn of neuropathic rats. *Pain* 135, 300-310.

Scholz, J., Broom, D.C., Youn, D.H., Mills, C.D., Kohno, T., Suter, M.R., Moore, K.A., Decosterd, I., Coggeshall, R.E., Woolf, C.J., 2005. Blocking caspase activity prevents

transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 25, 7317-7323.

Scholz J, W.C., 2002. Can we conquer pain?. *Nat Neurosci.*, 1062-1067.

Schouenborg, J., Sjolund, B.H., 1983. Activity evoked by A- and C-afferent fibers in rat dorsal horn neurons and its relation to a flexion reflex. *J Neurophysiol* 50, 1108-1121.

Seltzer, Z., Dubner, R., Shir, Y., 1990. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43, 205-218.

Sengupta, P., 2013 Environmental and occupational exposure of metals and their role in male reproductive functions. *Drug Chem Toxicol.*, 353-368.

Shaffer A., W.P.R., Schutler J. , 1983. Use of fentanyl infusion in the intensive care unit. tolerance to its effects ? . *Anesthesiology*.

Simon, M., Perrier, J.F., Hounsgaard, J., 2003. Subcellular distribution of L-type Ca²⁺ channels responsible for plateau potentials in motoneurons from the lumbar spinal cord of the turtle. *Eur J Neurosci* 18, 258-266.

Simone, D.A., Sorkin, L.S., Oh, U., Chung, J.M., Owens, C., LaMotte, R.H., Willis, W.D., 1991. Neurogenic hyperalgesia: central neural correlates in responses of spinothalamic tract neurons. *J Neurophysiol* 66, 228-246.

Sindrup, S.H., 1991. Tricyclic antidepressants in "central pain". *Acta Neurol Scand* 84, 171-172.

Sinnesger-Brauns, M.J., Huber, I.G., Koschak, A., Wild, C., Obermair, G.J., Einzinger, U., Hoda, J.C., Sartori, S.B., Striessnig, J., 2009. Expression and 1,4-dihydropyridine-binding properties of brain L-type calcium channel isoforms. *Mol Pharmacol* 75, 407-414.

Sivilotti LG, T.S., Woolf CJ., 1993. Rate of rise of the cumulative depolarization evoked by repetitive stimulation of small-caliber afferents is a predictor of action potential windup in rat spinal neurons in vitro. *J Neurophysiol*, 1621-1631.

Sluka, K.A., 1997. Blockade of calcium channels can prevent the onset of secondary hyperalgesia and allodynia induced by intradermal injection of capsaicin in rats. *Pain* 71, 157-164.

Sluka, K.A., 1998. Blockade of N- and P/Q-type calcium channels reduces the secondary heat hyperalgesia induced by acute inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 287, 232-237.

Smith GD, W.J., Harrison SM, Elliott PJ & Birch PJ, 1994. pre treatment with MK-801, a non competitive NMDA antagonist, prevents development of mechanical hyperalgesia in a rat model of chronic neuropathy, but not in a model of chronic inflammation. *Neurosciences lett*, 79-83.

Snider WD, M.S., 1998. Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron*, 629-632.

Soomets, U., Lindgren, M., Gallet, X., Hallbrink, M., Elmquist, A., Balaspiri, L., Zorko, M., Pooga, M., Brasseur, R., Langel, U., 2000. Deletion analogues of transportan. *Biochim Biophys Acta* 1467, 165-176.

Sosnowski M., Y.T.L., 1990. Differential cross tolerance between intrathecal morphine and sufentanil in the rat. *Anesthesiology*.

Stanfa, L.C., Chapman, V., Kerr, N., Dickenson, A.H., 1996. Inhibitory action of nociceptin on spinal dorsal horn neurones of the rat, in vivo. *Br J Pharmacol* 118, 1875-1877.

Sternbach, R.A., 1968. Pain: A psychophysiological analysis. Academic press.

Stiller, C.O., Cui, J.G., O'Connor, W.T., Brodin, E., Meyerson, B.A., Linderoth, B., 1996. Release of gamma-aminobutyric acid in the dorsal horn and suppression of tactile allodynia by spinal cord stimulation in mononeuropathic rats. *Neurosurgery* 39, 367-374; discussion 374-365.

Sugimoto et al., 1990. Transsynaptic degeneration in the superficial dorsal horn after sciatic nerve injury: effects of a chronic construction injury, transection and strychnine. *Pain*, 213-305.

Suzuki, R., Stanfa, L.C., Kowaluk, E.A., Williams, M., Jarvis, M.F., Dickenson, A.H., 2001. The effect of ABT-702, a novel adenosine kinase inhibitor, on the responses of spinal neurones following carrageenan inflammation and peripheral nerve injury. *Br J Pharmacol* 132, 1615-1623.

Swayne, L.A., Bourinet, E., 2008. Voltage-gated calcium channels in chronic pain: emerging role of alternative splicing. *Pflugers Arch* 456, 459-466.

Taguchi, T., Katanosaka, K., Yasui, M., Hayashi, K., Yamashita, M., Wakatsuki, K., Kiyama, H., Yamanaka, A., Mizumura, K., 2015. Peripheral and spinal mechanisms of nociception in a rat reserpine-induced pain model. *Pain* 156, 415-427.

Tamaru, Y., Nomura, S., Mizuno, N., Shigemoto, R., 2001. Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR3 in the mouse CNS: differential location relative to pre- and postsynaptic sites. *Neuroscience* 106, 481-503.

Tanabe, T., Mikami, A., Niidome, T., Numa, S., Adams, B.A., Beam, K.G., 1993. Structure and function of voltage-dependent calcium channels from muscle. *Ann N Y Acad Sci* 707, 81-86.

Tang FR, S.M., 1999. Pre- and/or post-synaptic localisation of metabotropic glutamate receptor 1alpha (mGluR1alpha) and 2/3 (mGluR2/3) in the rat spinal cord. *Neurosci Res.*, 73-78.

Tappe-Theodor, A., Fu, Y., Kuner, R., Neugebauer, V., 2011. Homer1a signaling in the amygdala counteracts pain-related synaptic plasticity, mGluR1 function and pain behaviors. *Mol Pain* 7, 38.

Todd, A.J., 2010. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci* 11, 823-836.

Todorovic, S.M., Meyenburg, A., Jevtovic-Todorovic, V., 2002. Mechanical and thermal antinociception in rats following systemic administration of mibefradil, a T-type calcium channel blocker. *Brain Res* 951, 336-340.

Tsien, R.W., Lipscombe, D., Madison, D.V., Bley, K.R., Fox, A.P., 1988. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci* 11, 431-438.

Urban, L., Randic, M., 1984. Slow excitatory transmission in rat dorsal horn: possible mediation by peptides. *Brain Res* 290, 336-341.

Valerio, A., Paterlini, M., Boifava, M., Memo, M., Spano, P., 1997. Metabotropic glutamate receptor mRNA expression in rat spinal cord. *Neuroreport* 8, 2695-2699.

Vaupel, D.B., Lange, W.R., London, E.D., 1993. Effects of verapamil on morphine-induced euphoria, analgesia and respiratory depression in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 267, 1386-1394.

Veldhuijzen, D.S., Kenemans, J.L., de Bruin, C.M., Olivier, B., Volkerts, E.R., 2006. Pain and attention: attentional disruption or distraction? *J Pain* 7, 11-20.

Verdejo-Garcia, A., Lopez-Torrecillas, F., Calandre, E.P., Delgado-Rodriguez, A., Bechara, A., 2009. Executive function and decision-making in women with fibromyalgia. *Arch Clin Neuropsychol* 24, 113-122.

Vibert JF, S.A., Lavalalrd-Rousseau MC, Boureau F, 2005. La douleur, la nociception et l'algésie. In : *Neurophysiologie, de la physiologie à l'exploration fonctionnelle*. Elsevier-Masson, Issy-les-Moulineaux,, 46-55

Vidnyánszky Z, Hámori J, Négyessy L, Rüegg D, Knöpfel T, Kuhn R, Görcs TJ. Cellular and subcellular localization of the mGluR5a metabotropic glutamate receptor in rat spinal cord. *Neuroreport*. 1994.

Vogel, C., S. Abreu Rde, D. Ko, S.Y. Le, B.A. Shapiro, S.C. Burns, D. Sandhu, D.R. Boutz, E.M. Marcotte, and L.O. Penalva, Sequence signatures and mRNA concentration can explain twothirds of protein abundance variation in a human cell line. *Mol Syst Biol*, 2010. 6: p. 400.

Walker K, R.A., Bowes M, et al., 2001a. mGlu5 receptors and nociceptive function II. mGlu5 receptors functionally expressed on peripheral sensory neurones mediate inflammatory hyperalgesia. *Neuropharmacology.*, 10-19

Wall PD, W.C., 1984. Muscle but not cutaneous C-afferent input produces prolonged increases in the excitability of the flexion reflex in the rat. *J Physiol*, 443-458.

Walteros, C., Sanchez-Navarro, J.P., Munoz, M.A., Martinez-Selva, J.M., Chialvo, D., Montoya, P., 2011. Altered associative learning and emotional decision making in fibromyalgia. *J Psychosom Res* 70, 294-301

Wang, Y.Y., Wu, S.X., Zhou, L., Huang, J., Wang, W., Liu, X.Y., Li, Y.Q., 2006. Dose-related antiallodynic effects of cyclic AMP response element-binding protein-antisense oligonucleotide in the spared nerve injury model of neuropathic pain. *Neuroscience* 139, 1083-1093.

Watson, G.S., Sufka, K.J., Coderre, T.J., 1997. Optimal scoring strategies and weights for the formalin test in rats. *Pain* 70, 53-58

Wei, F., Qiu, C.S., Kim, S.J., Muglia, L., Maas, J.W., Pineda, V.V., Xu, H.M., Chen, Z.F., Storm, D.R., Muglia, L.J., Zhuo, M., 2002. Genetic elimination of behavioral sensitization in mice lacking calmodulin-stimulated adenylyl cyclases. *Neuron* 36, 713-726

Wemmie, J.A., Price, M.P., Welsh, M.J., 2006. Acid-sensing ion channels: advances, questions and therapeutic opportunities. *Trends Neurosci* 29, 578-586

Westenbroek, R.E., Hoskins, L., Catterall, W.A., 1998. Localization of Ca²⁺ channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *J Neurosci* 18, 6319-6330.

Whitehorn, D., Burgess, P.R., 1973. Changes in polarization of central branches of myelinated mechanoreceptor and nociceptor fibers during noxious and innocuous stimulation of the skin. *J Neurophysiol* 36, 226-237

Willis, W.D.C., R. E. , 1991. Sensory mechanisms of the spinal cord. In *Sensory mechanisms of the spinal cord* Plenum Press

Woda, A., Blanc, O., Voisin, D.L., Coste, J., Molat, J.L., Luccarini, P., 2004. Bidirectional modulation of windup by NMDA receptors in the rat spinal trigeminal nucleus. *Eur J Neurosci* 19, 2009-2016

Worbel JP, 2003. Are we ready for the Better Medication Management System?

Woolf, C.J., 1983. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature* 306, 686-688.

Woolf, C.J., Fitzgerald, M., 1983. The properties of neurones recorded in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 221, 313-328

Woolf, C.J., King, A.E., 1990. Dynamic alterations in the cutaneous mechanoreceptive fields of dorsal horn neurons in the rat spinal cord. *J Neurosci* 10, 2717-2726

Woolf, C.J., Salter, M.W., 2000. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288, 1765-1769.

Woolf, C.J., Wall, P.D., 1986. Relative effectiveness of C primary afferent fibers of different origins in evoking a prolonged facilitation of the flexor reflex in the rat. *J Neurosci* 6, 1433-1442.

Wren, A.A., Wright, M.A., Carson, J.W., Keefe, F.J., 2011. Yoga for persistent pain: new findings and directions for an ancient practice. *Pain* 152, 477-480

Xu W, L.D., 2001. L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J Neurosci*, 5944-5951

Xu, W., Lipscombe, D., 2001. Neuronal Ca(V)1.3alpha(1) L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J Neurosci* 21, 5944-5951

Yang, D., Gereau, R.W.t., 2002. Peripheral group II metabotropic glutamate receptors (mGluR2/3) regulate prostaglandin E2-mediated sensitization of capsaicin responses and thermal nociception. *J Neurosci* 22, 6388-6393

Yang, D., Gereau, R.W.t., 2003. Peripheral group II metabotropic glutamate receptors mediate endogenous anti-allodynia in inflammation. *Pain* 106, 411-417.

You, H.J., Morch, C.D., Chen, J., Arendt-Nielsen, L., 2003. Differential antinociceptive effects induced by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor (SC-236) on dorsal horn neurons and spinal withdrawal reflexes in anesthetized spinal rats. *Neuroscience* 121, 459-472.

Yunus, M.B., 2007. Fibromyalgia and overlapping disorders: the unifying concept of central sensitivity syndromes. *Semin Arthritis Rheum* 36, 339-356.

Zamponi, G.W., Striessnig, J., Koschak, A., Dolphin, A.C., 2015. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev* 67, 821-870.

Zhang, T., Zhang, J., Shi, J., Feng, Y., Sun, Z.S., Li, H., 2009. Antinociceptive synergistic effect of spinal mGluR2/3 antagonist and glial cells inhibitor on peripheral inflammation-induced mechanical hypersensitivity. *Brain Res Bull* 79, 219-223.

Zhou, H.Y., Chen, S.R., Chen, H., Pan, H.L., 2011. Functional plasticity of group II metabotropic glutamate receptors in regulating spinal excitatory and inhibitory synaptic input in neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 336, 254-264.

Zhou S, K.S., Du J, Carlton SM., 2001a. Metabotropic glutamate 1alpha receptors on peripheral primary afferent fibers: their role in nociception. *Brain Res* 18–26.

Zühlke RD, P.G., Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H. , 1999. Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature.* , 159–162.

Zühlke RD, P.G., Tsien RW, Reuter H., 2000. Ca²⁺-sensitive inactivation and facilitation of L-type Ca²⁺ channels both depend on specific amino acid residues in a consensus calmodulin-binding motif in the(alpha)1C subunit. *J Biol Chem.*, 21121-21129.

RÉFÉRENCES ÉLECTRONIQUES

https://www.licor.com/bio/applications/quantitative_western_blot/workflows.html

<http://www.bristol.ac.uk/synaptic/receptors/mglur/>

RÉSUMÉ

La douleur est une expérience désagréable qui fait partie de notre vie. Quand elle ne dure pas longtemps, elle est un signal d'alarme pour notre organisme. Cependant malheureusement, dans certaines conditions pathologiques, elle se prolonge dans le temps, elle devient alors chronique, intolérable, et nécessite un traitement qui ne suffit pas toujours à soulager le patient, un traitement qui dispose une efficacité limitée avec des effets secondaires indésirables non négligeables. Il est crucial alors d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes enclenchés dans la transmission douloureuse pour développer des nouveaux outils thérapeutiques. Dans ce contexte, des études menées ces dernières années dans notre laboratoire ont indiqués que les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière présentent des propriétés intrinsèques d'amplification des messages afférents douloureux qui reposent notamment sur des courants calciques via les canaux calciques de type L. Pour cela, le rôle de ces canaux L et plus particulièrement le rôle exact de chaque canal : Cav1.2 et Cav1.3, les deux seuls iso-formes des canaux L exprimés dans la corne dorsale de la moelle épinière, dans la sensibilisation douloureuse a été étudié dans la première partie de ce présent travail. Nous avons étudié chez le rat, *in vivo*, et en utilisant une approche computationnelle pour simuler l'activité neuronale, l'impact de ces courants Cav1.2 et Cav1.3, à la fois sur le phénomène de Wind-up, une forme de sensibilisation à court terme, et sur un modèle de neuropathie périphérie (SNL) caractérisé par une forme de sensibilisation à long terme. Nous avons pu montrés que la présence de Cav1.3 (mais pas de Cav1.2) est crucial pour l'expression du Wind-up quelque soit le contexte physiopathologique (contrôle/neuropathie), alors que la suppression de Cav1.2 (mais pas de Cav1.3) diminue significativement l'expression du comportement douloureux dans le contexte de neuropathie.

D'autre part, il a été montré également dans notre laboratoire que les récepteurs métabotropiques de groupe I (mGluRs I), récepteurs du Glutamate, principal neurotransmetteur excitateur dans la transmission nociceptive, interagissent avec ces canaux L en modulant leur activité. Dans des conditions pathologiques telles que les conditions des douleurs inflammatoires le rôle de ces canaux L est controversé, et si l'interaction entre les mGluRs I et les canaux L est toujours présente dans ces conditions inflammatoires est mal connue. Nous avons décidé alors d'étudier dans la deuxième partie de ce travail le rôle de ces canaux L, et leur interaction avec les mGluRs I dans les conditions des douleurs inflammatoires. En utilisant des approches : l'électrophysiologie extracellulaire *in vivo*, pharmacologie, comportement, les injections intrathécales, et biologie moléculaire, nous avons montré que l'activation pharmacologique des mGluRs I augmente la transmission nociceptive et que cet effet nécessite l'activation des canaux calciques de type L dans les conditions contrôles. D'une façon inattendue, dans le contexte d'inflammation, nos résultats ont montrés que l'activation des mGluRs I induit un effet totalement opposé anti-nociceptif et que cet effet est indépendant des canaux L. En plus, nous confirmons que le blocage des canaux L est sans effet dans le cas d'inflammation. D'autre part, nous avons montré que l'effet contradictoire dû à l'activation des mGluRs I passe par un renforcement de la transmission inhibitrice.

En conclusion, nos résultats montrent l'intérêt de cibler les canaux calciques de type L et plus précisément le canal Cav1.2 dans le cadre des douleurs chroniques neuropathiques. De plus, nous montrons aussi que les mGluRs I pourraient être des bons candidats thérapeutiques dans le contexte inflammatoire.

Mots clés: la douleur, la sensibilisation centrale, Wind-up, neuropathie, inflammation, les canaux calciques de type L, les mGluRs I

Abstract

Pain is an unpleasant experience which is part of our lives. When it does not last long time, it is often a warning sign for our organism. However unfortunately, in some pathological cases, it can last a long time, and become chronic, intolerable, and requires a treatment that is not always enough to relieve the patient, a treatment that has limited efficacy with significant undesirable side effects. It is important now to ameliorate our knowledge about the mechanisms implicated in pain transmission to develop new therapeutic tools. In this context, many studies conducted in recent years in our laboratory have indicated that the neurons in the dorsal horn of the spinal cord express intrinsic amplification properties of afferents input rely on calcium currents via the L type calcium channels. For that, the role of L type calcium channels and especially the role exact of each canal: Cav1.2 and Cav1.3, the two only isoforms of L channels expressed in the dorsal horn of the spinal cord, in the painful sensitization has been studied in the first part of this present work. We studied in rat, *in vivo*, and by using a computational approach to simulate neuronal activity, the impact of these currents Cav1.2 and Cav1.3, both on the phenomenon of Wind-up, a form of short term sensitization, and in the model of a peripheral neuropathy model (SNL) characterized by a form of long-term sensitization. We showed that the presence of Cav1.3 (but not the Cav1.2) is important for Wind-up's expression regardless of the physio-pathological context (control / neuropathy), whereas the removal of Cav1.2 (but not Cav1.3) decreases significantly the expression of the pain behavior in the context of neuropathy.

In another side, it has been shown in our laboratory that group I metabotropic glutamatergic receptors (mGluRs I), receptors of Glutamate, the main excitatory neurotransmitter in nociceptive transmission, interact with L channels by modulating their activity. In pathological condition such in the condition of inflammatory pain the role of these channels L is controversial,

and if the interaction between mGluRs I and L channels is always present in these inflammatory conditions is poorly known. We decided then to study in the second part of this work the role of these channels, and their interaction with mGluRs I in the condition of inflammatory pain. By using electrophysiological extracellular recording, pharmacology, behavior, intrathecal injections, and molecular biology, we showed that pharmacological activation of mGluRs I increase the nociceptive transmission and that this effect requires the activation of L type calcium channels in control conditions. Unexpectedly, in the context of the inflammation, our results show that activation of mGluRs I induce an anti-nociceptif effect and this effect is independent of L channels. Moreover, we confirmed that the blockade of L calcium channels is without effect in case of the inflammation. Furthermore, we showed that the contradictory effect due to the activation of mGluRs I pass through a strengthening of inhibitory transmission.

In conclusion, our results show the interest to target L type calcium channels and more specifically the Cav1.2 channel in case of neuropathic chronic pain. We also show that mGluRs I could be good therapeutic candidates in the inflammatory context.

Keywords: pain, central sensitization, windup, neuropathy, inflammation, L-type calcium channels, mGluRs I

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

Publications

- 1) **Radwani. H**, Cattaert. D, Favereaux. A, Dobremez. E, Lopez-gonzalez. M, Eiríksdóttir. E, Langel. Ü, Errami. M, Landry. M, Fossat. P: *“Cav1.2 and Cav1.3 L -type calcium channels independently control short- and long-term sensitization to pain”*. (Publié, J Physiol. 2016 May 27. doi: 10.1113/JP272725).
- 2) **Radwani H**, Benazzouz R, Roca-Lapirot O, Lopez-gonzalez M, Landry M, Errami M, Fossat P, *“Group I mGluRs switch control nociceptive transmission after peripheral inflammation in rat”*, (Article en préparation)
- 3) Olivier Roca-Lapirot, **Houda Radwani**, Franck Aby, Marc Landry and Pascal Fossat: *“Calcium-dependant intrinsic properties in nociceptive transmission”* (Revue soumise)

Communications Scientifiques orales

- 1) **Radwani. H**, Benazzouz. R, Roca-Lapirot .O,Errami. M, Landry. M, Fossat. P. Le 12^{ème} Symposium of National Research Network on Pain. *“Switch from excitatory to inhibitory modulation of Group I Metabotropic Glutamate Receptors dependent nociceptive transmission in a model of inflammatory pain ”*. Mars, 2016, Nice. **France**
- 2) **Radwani. H**, Benazzouz. R, Roca-Lapirot .O, Lopez-gonzalez.M, Landry. M, Errami. M, Fossat. P, Conference of Interdisciplinary Institute for Neurosciences: *“Modulation of nociceptive response by group I Metabotropic Glutamatergic Receptors and L-type calcium channels”*. Janvier, 2016, Bordeaux. **France**

3) **Radwani. H**, Benazzouz. R, Roca-Lapirot .O, Lopez-gonzalez. M, Landry. M, Errami. M, Fossat. P, Young Scientific Symposium *“Differential effects of Group I mGluRs activation on nociceptive transmission in the spinal cord”*, Mai,2016, Pessac, **France**

4) Fossat. P, **Radwani. H**, Cattaert. D, Favereaux. A, Dobremez. E, Eiríksdóttir. E, Langel. Ü, Landry. M, 11th Symposium of National Research network on pain *“Regulation of Cav1.3 expression determines the amplitude of windup in naive and neuropathic rats”*. Mars, 2015, Strasbourg. **France**

Communications Scientifiques affichées

1) **Radwani. H**, Benazzouz. R, Roca-Lapirot .O, Errami. M, Landry. M, Fossat. P. Le 10^{ème} Federation of European Neuroscience Societies (FENS) Forum of Neuroscience *“Switch from excitatory to inhibitory modulation of Group I Metabotropic Glutamate Receptors (mGluRs I) -dependent nociceptive transmission in a model of inflammatory pain”*, Juillet, 2016, Copenhagen, **Danemark**.

2) **Radwani. H**, Benazzouz. R, Roca-Lapirot .O, Errami. M, Landry. M, Fossat. P. European Neuroscience Conference for Doctoral Students *“Switch from excitatory to inhibitory modulation of Group I Metabotropic Glutamate Receptors (mGluRs I) -dependent nociceptive transmission in a model of inflammatory pain”*, Juillet, 2016, Marienlyst, **Danemark**.

3) **Radwani. H**, Benazzouz. R, Errami. M, Landry. M, Fossat. P. La 16^{ème} journée scientifique de l'école doctorale *“Science de la Vie et de la Santé”*: *“Role of mGluRs I and GABA-B receptors in nociceptive neuromodulation in the CFA model of inflammation”*, Avril, 2016, Archachon, **France**.

4) **Radwani. H.** Benazzouz. R, Landry. M, Errami. M, Fossat. P. Le 12^{ème} Congrès de la Société Française de Neurosciences: ***“Role of mGluRs I and GABA-B receptors in nociceptive neuromodulation in the CFA model of inflammation”***, Mai, 2015, Montpellier, France

5) **Radwani. H.** Landry. M, Errami. M, Fossat. P, La 15^{ème} journée scientifique de l'école doctorale "Science de la Vie et de la Santé": ***“Spinal long term potentiation of C- fiber evoked field potentials is NMDA receptor and L-type calcium channels dependant”***, Avril, 2015, Archachon, France

ARTICLE 1

Cav1.2 and Cav1.3 L-type calcium channels independently control short and long term sensitization to pain.

Houda Radwani^{1,2,6}, Maria José Lopez-Gonzalez^{1,2}, Daniel Cattaert^{1,3}, Olivier Roca-Lapirot^{1,2}, Eric Dobremez^{1,4}, Emelía Eiríksdóttir⁵, Ülo Langel⁵, Alexandre Favereaux^{1,2}, Mohammed Errami⁶, Marc Landry^{1,2*}, and Pascal Fossat^{1,2*}

¹Univ. Bordeaux, Bordeaux, France.

²CNRS, IINS, UMR5297, F-33077, Bordeaux, France.

³CNRS, INCIA, UMR 5287, F-33400 Talence, France

⁴Department of Pediatric Surgery. University Hospital of Bordeaux.

⁵Dept. Neurochemistry and Neurotoxicology, Stockholm University, S-106 91, Stockholm,

Sweden

⁶ Abdelmalek Essaâdi University, Faculty of Sciences, Tetouan, Morocco.

Abstract:

Short-term central sensitization to pain temporarily increases the responsiveness of nociceptive pathways after peripheral injury. In dorsal horn neurons (DHNs), short-term sensitization can be monitored through the study of wind-up. Wind-up, a progressive increase in DHNs response following repetitive peripheral stimulations, depends on the post-synaptic L-type calcium channels. In the dorsal horn of the spinal cord, two L-type calcium channels are present, Cav1.2 and Cav1.3, each displaying specific kinetics and spatial distribution. In the present study, we used a mathematical model of DHNs in which we integrated the specific patterns of expression of each Cav subunits. This mathematical approach reveals that Cav1.3 is necessary for the onset of wind-up, whereas Cav1.2 is not and that synaptically triggered wind-up requires NMDA receptor activation. We then switched to a biological preparation in which we knocked down Cav subunits and confirmed the prominent role of Cav1.3 in both naive and spinal nerve ligation model of neuropathy (SNL). Interestingly, although a clear mechanical allodynia dependent on Cav1.2 expression was observed after SNL, the amplitude of wind-up was decreased. These results were confirmed with our model when adapting Cav1.3 conductance to the changes observed after SNL. Finally, our

mathematical approach predicts that, although wind-up amplitude is decreased in SNL, plateau potentials are not altered, suggesting that plateau and wind-up are not fully equivalent. Wind-up and long-term hyperexcitability of DHNs are differentially controlled by Cav1.2 and Cav1.3, therefore confirming that short- and long-term sensitization are two different phenomena triggered by distinct mechanisms.

Article 2

Radwani H^{1,2}, Benazzouz R¹, Roca-Lapirot O¹, Lopez-gonzalez M¹, Landry M¹, Errami M², Fossat P¹, ‘*Group I mGluRs switch control nociceptive transmission after inflammation in rat*’, (Article en préparation)

¹ University of Bordeaux, Bordeaux, France.

² University Abdelmalek Essaâdi, Faculty of Sciences, Tetouan, Morocco.

Abstract:

Pathological pain is a major social problem; it affects quality of life of individuals. The dorsal horn neurons (DHNs) of the spinal cord express group I metabotropic Glutamate receptors (mGluRs I) that are known to modulate L -type calcium channels that promote mechanism for short term sensitization to pain. In this study we aim at analyzing the role of mGluRs I in spinal nociceptive transmission in naïve and inflamed rats. Experiments were performed in a Sprague-Dawley adult rat. The role of group I mGluR in spinal nociceptive modulation by L -type calcium channels was evaluated by using behavioural approach as well as *n vivo* extracellular recording of C-fiber-evoked field potentials. We show that activation of mGluRs I induce an increase in nociceptive response in naïve rats, and that this potentiation requires the activation of L-type calcium channels. Surprisingly, in inflamed rats, activation of mGluRs I induced inhibitory effect independent of L-type calcium channels. These results are corroborated by behavioural analysis. Inflammation does not alter the expression of mRNA neither for group I mGluR (mGluR 1 mRNA and mGluR5) or L-type calcium channels. However, the inhibitory effect in inflammatory condition is completely suppressed after blocking the inhibitory neurotransmission. These data show that the effects of mGluRs I activation depends on patho-physiological conditions. Moreover these results suggest that mGluRs I activation decrease nociceptive transmission through activation of inhibitory network in the dorsal horn of the spinal cord making mGluRs I a potential target for therapeutical approaches.

REVUE

Olivier Roca-Lapirot¹, **Houda Radwani**^{1,2}, Franck Aby¹, Marc Landry¹ and Pascal Fossat¹: *“Calcium-dependant intrinsic properties in nociceptive transmission”* (Revue soumise)

¹ University of Bordeaux, Bordeaux, France.

² University Abdelmalek Essaâdi, Faculty of Sciences, Tetouan, Morocco.

Abstract:

Voltage gated calcium channels are activated by changes in membrane potentials and lead to calcium entry into the cells. In turn calcium influx through these channels mediate many cell functions such as muscle contraction, hormone or neurotransmitter release, or cell signaling cascade that lead to gene expression. VGCCs are classified regarding their physiological and pharmacological properties. There are two main families of VGCCs, a low voltage activated family (LVA) and a high voltage activated family (HVA). LVA are commonly called T-type channels and comprise the Cav3 subunits as the pore-forming channel. Among HVA, 4 subgroups are distinguished regarding their pharmacological sensitivity, Cav1 or L-type calcium channels which are blocked by dihydropyridine, and Cav2 comprising N-type calcium channels blocked by conotoxine ω GVIA, P/Q calcium channels blocked by IVA and R-type calcium channels blocked by SNX-482. Cav1 family is expressed in a wide range of cells in mammals but in the central nervous system (CNS), only Cav1.2 and Cav1.3 subunits are present. Cav1.3 is activated at a lower voltage than Cav1.2, the latter one is more sensitive to dihydropyridine. In the CNS, Cav1.2 and Cav1.3 are exclusively postsynaptic channels expressed in the soma, shaft and dendrites. Cav1.2 and Cav1.3 subunits are key elements for the physiopathology of neurons and they are involved in many CNS functions such as learning and memory, emotions, in pathology such as Parkinson's disease, or in developmental disorders such as autism syndromes. These subunits have also been found to be important for neuronal excitability within the spinal cord where they allow expression of neuronal amplification properties and calcium dependent signaling pathway. This is particularly the case in the dorsal horn of the spinal cord where Cav1.2

and Cav1.3 are key players of pain transmission. In the present review, we will first describe the relative expression, distribution, and properties supported by Cav1.2 and Cav1.3 channels in pain transmission in the dorsal horn of the spinal cord. Then we will study the involvement of these channels in the spinal cord, in transmission, sensitization and pathology associated with pain. Finally, we will focus on the modulation of these channels and potential therapeutic avenues for chronic pain treatment.

1
2 **Cav1.2 and Cav1.3 L-type calcium channels independently control short- and long-term**
3 **sensitization to pain.**

4 Houda Radwani^{1,2,6}, Maria José Lopez-Gonzalez^{1,2}, Daniel Cattaert^{1,3}, Olivier Roca-Lapirot^{1,2},
5 Eric Dobremez^{1,4}, Emelía Eiríksdóttir⁵, Ülo Langel⁵, Alexandre Favereaux^{1,2}, Mohammed
6 Errami⁶, Marc Landry^{1,2*}, and Pascal Fossat^{1,2*}

¹Univ. Bordeaux, Bordeaux, France.

²CNRS, IINS, UMR5297, F-33077, Bordeaux, France.

³CNRS, INCIA, UMR 5287, F-33400 Talence, France

7 ⁴Department of Pediatric Surgery. University Hospital of Bordeaux.

8 ⁵Dept. Neurochemistry and Neurotoxicology, Stockholm University, S-106 91, Stockholm,
9 Sweden

10 ⁶ Abdelmalek Essaâdi University, Faculty of Sciences, Tetouan, Morocco.

11 * The two last authors share seniority.

12 This manuscript contains 33 pages and 10 figures.

13 **Acknowledgements** : This work was supported by "Conseil Général d'Aquitaine"
14 (N°11004369/11004370), Agence National pour la Recherche (ANR MirPain), Labex
15 "BRAIN", IRSES "Neuren" n°6A-2012-318997 and Erasmus Mundus Green It. We thank
16 Bordeaux Imaging Center (BIC), UMS 3420 CNRS, Université de Bordeaux, US4, INSERM,
17 Prof. D. Voisin for careful reading and Prof A. Gundlach for english language editing and
18 Sébastien Benquet for technical support.

19 **None of the authors have any conflict of interest to declare.**

20

21

22

- 23 Corresponding author :
- 24 Pascal Fossat, PhD
- 25 CNRS UMR 5297, 33400 Talence CEDEX, France.
- 26 Tél : (33)-5-57-57-40-50
- 27 E-mail : pascal.fossat@u-bordeaux.fr
- 28

29 **Abstract :**

30 **Short-term central sensitization to pain temporarily increases the responsiveness**
31 **of nociceptive pathways after peripheral injury. In dorsal horn neurons (DHNs), short**
32 **term sensitization can be monitored through the study of windup. Windup, a**
33 **progressive increase in DHNs response following repetitive peripheral stimulations,**
34 **depends on the post-synaptic L-type calcium channels (LTCs). In the dorsal horn of the**
35 **spinal cord, two LTCs are present, Cav1.2 and Cav1.3, each displaying specific kinetics**
36 **and spatial distribution. We used here a mathematical model of DHNs in which we**
37 **integrated the specific patterns of expression of each Cav subunits. This mathematical**
38 **approach reveals that Cav1.3 is necessary for the onset of windup while Cav1.2 is not**
39 **and that synaptically triggered windup requires NMDA receptor activation. We then**
40 **switched to a biological preparation in which we knocked down Cav subunits, we**
41 **confirmed the prominent role of Cav1.3 in both naive and spinal nerve ligation model of**
42 **neuropathy (SNL). Interestingly, while a clear mechanical allodynia dependant on**
43 **Cav1.2 expression was observed after SNL, the amplitude of windup was decreased.**
44 **These results were confirmed with our model when adapting Cav1.3 conductance to the**
45 **changes observed after SNL. Finally, our mathematical approach predicts that although**
46 **windup amplitude is decreased in SNL, plateau potentials are not altered, suggesting**
47 **that plateau and windup are not fully equivalent. Windup and long-term**
48 **hyperexcitability of DHNs are differentially controlled by Cav1.2 and Cav1.3, therefore,**
49 **confirming that short-term and long-term sensitization are two different phenomena**
50 **triggered by distinct mechanisms.**

51 **Keywords : pain, central sensitization, windup, neuropathy, calcium channels.**

52

53

54 **1. Introduction:**

55 Dorsal horn neurons (DHNs) integrate sensory information and express activity-dependant
56 increase in responsiveness to nociceptive inputs called central sensitization. Central
57 sensitization is a physiological response to peripheral injury that lower pain threshold during
58 tissue repair (Woolf 1991; Basbaum *et al.* 2009). However, central sensitization can be
59 maintained for days even if the primary cause of pain has disappeared, thus resulting in a
60 switch from physiology to pathology. For instance, chronic neuropathic pain induced by nerve
61 lesions as in the spinal nerve ligation model (SNL), is associated to abnormal allodynia which
62 is pathologically maintained beyond tissue repair. Physiological central sensitization can be
63 assessed by repetitive nociceptive stimulations at low frequency showing up as a windup of
64 DHNs. A crucial question in understanding the neuropathic pain mechanisms is whether the
65 windup, as a short-term sensitization process, is involved in the SNL-induced
66 hyperexcitability. However, this question has never been clearly assessed. The windup is
67 sustained by voltage-gated calcium channels (VGCC) of the L-type (LTC) (Morisset and
68 Nagy 2000 ; Fossat *et al.* 2007). LTC can also control plateau potentials, a mechanism of
69 input/output amplification allowing the development of the windup (Morisset and Nagy 1999;
70 Morisset and Nagy 2000). Of the four different LTC subunits, only Cav1.2 and Cav1.3 are
71 expressed in the dorsal horn of the spinal cord. Cav1.3 subunits have kinetics close to low
72 voltage activated calcium channels of the Cav3.x family, while Cav1.2 are high voltage
73 activated (Xu and Lipscombe 2001; Helton *et al.* 2005). Cav1.3 are localized in dendritic
74 compartments while Cav1.2 are preferentially restricted to the soma (Simon *et al.* 2003;
75 Dobremez *et al.* 2005). These differences suggest Cav1.2 and Cav1.3 play different roles in
76 DHN physiology thus in plateau potentials and windup. Moreover, Cav1.2 and Cav1.3 are
77 oppositely regulated in neuropathic rats (Fossat *et al.* 2010; Favereaux *et al.* 2011). However,

78 which of Cav1.2 or Cav1.3 controls the windup is not known. This information could answer
79 the question regarding the potential implication of the windup in SNL-induced
80 hyperexcitability of DHN. Indeed, if the windup is involved, it should be controlled by the up-
81 regulated Cav1.2 that also controlled SNL-induced hyperexcitability of DHN. In this paper,
82 we assessed this question by combining a computational model of DHNs in which we
83 manipulated Cav1.2 and Cav1.3 conductances, with *in vivo* experiments in which we down-
84 regulated the expression of Cav1.2 and Cav1.3 mRNA, in both normal and SNL-induced
85 allodynia conditions. In the mathematical model, we set DHNs parameters in accordance with
86 those recorded spinal slices (Derjean 2002) and we distinguished Cav1.3 and Cav1.2
87 conductances according to their specific kinetic and spatial distribution (Xu and Lipscombe
88 2001; Simon *et al.* 2003; Dobremez *et al.* 2005; Helton *et al.* 2005). Then, we recorded the
89 windup of a nociceptive flexion reflex in anesthetized rats together with an antisense strategy
90 to block the expression of each LTCs subunit. We found in both computational model and *in*
91 *vivo* experiments that the windup was under the exclusive control of Cav1.3, suggesting that
92 windup and long-term hyperexcitability were dissociated. As a support to these results, we
93 found that the windup was decreased in SNL conditions, consistently with the decrease of
94 Cav1.3 expression in this model. Taken together, our data indicate that Cav1.3 controls the
95 onset of windup, and that DHN hyperexcitability and subsequent pathological changes are
96 independently under the control of Cav1.2.

97

98

99

100 Material and methods:

101 **Immunohistochemistry:** Control, sham, SNL, and Antisense-injected rats were perfusion-
102 fixed through the ascending aorta with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (0.1 M, pH
103 7.4). Double immunodetection of Cav1.2 or Cav1.3, and microtubule-associated protein 2
104 (MAP2), a somatodendritic neuronal marker, was performed on spinal cord cryostat sections
105 (30 μ m thickness; Microm). Briefly, sections were incubated overnight at 4°C with mouse
106 anti-MAP2 (1:1000; Sigma) and rabbit anti-Cav1.2 or anti-Cav1.3 (1:200; Alomone)
107 antibodies. After rinsing, the sections were incubated with biotinylated goat anti-rabbit
108 antibody (1:200; Vector Laboratories) and next with Alexa 488-conjugated streptavidin
109 (1:500) and Alexa 568-conjugated goat anti-mouse (1:500) antibodies (Molecular
110 Probes/Invitrogen). The sections were then mounted and viewed with a confocal microscope
111 (Leica SP2, Leica Microsystems). Specificity of antibodies was determined as previously
112 described (Dobremez et al., 2005). Immunohistochemistry after antisense strategy was
113 performed after intrathecal injection of either anti-Cav1.2, anti-Cav1.3, or mismatch Peptide
114 Nucleic Acids (PNA, see below).

115 For immunofluorescence quantification, Cav1.2- and Cav1.3-immunolabeled sections were
116 viewed with a confocal microscope (Leica SP2, Leica Microsystems). Images to be compared
117 were collected during the same session using identical scanning settings. They were then
118 imported into “ImageJ” free software (version 1.42q) for quantitative analysis. Background
119 was subtracted by thresholding, and the mean gray level corresponding to fluorescence
120 intensity was measured.

121 **Mathematical Model of DHNs:** The model neuron (recorded at 36°C) was implemented
122 within the simulation software NEURON 7.3 according to Paulo Aguiar’s model (Aguiar et

123 al., 2010). It was composed of a cell body (diameter 20 μm), a dendrite (length 500 μm ,
 124 diameter 4 μm), an axon hillock (decreased in diameter from 2 to 1 μm along a length of 3
 125 μm), and an axon (length 1000 μm , diameter 1 μm). All compartments were equipped with
 126 ionic channels following the description given in Aguiar et al., except for the iCaL that was
 127 replaced by Cav12 and Cav13 (I/V properties in (Xu and Lipscombe 2001)).

128 For Cav12, tau_m and m_inf where:

$$129 \quad \tau_m = 1/(a+b) / \text{tadj}$$

$$130 \quad m_{\text{inf}} = 1/(1+\exp((v+39.4)/-7))$$

$$131 \quad a = 1.6 / (1 + \exp(-0.072*(v+16)))$$

$$132 \quad b = 0.02 * \text{vtrap}(- (v+39.4), 5.36)$$

133 For Cav13, tau_m and m_inf where:

$$134 \quad \tau_m = 1/(a+b) / \text{tadj}$$

$$135 \quad m_{\text{inf}} = 1/(1+\exp((v+39.4)/-7))$$

$$136 \quad a = 1.6 / (1 + \exp(-0.072*(v+16)))$$

$$137 \quad b = 0.02 * \text{vtrap}(- (v+39.4), 5.36)$$

138 Calcium dynamics in neurons was simulated as in(Aguiar *et al.* 2010). The internal calcium
 139 concentration resulted from calcium currents and a pump.

$$140 \quad \text{drive_channel} = - (10000) * \text{ica} / (2 * \text{FARADAY} * \text{depth})$$

$$141 \quad \text{with depth} = 0.1 \mu\text{m}$$

$$142 \quad \text{cai_new}' = \text{drive_channel} + (\text{cai_inf} - \text{cai_new})/\text{cai_tau}$$

143 cai = cai_new

144 with cai_tau = 2ms and cai_inf = 50e-6 mM

145 The properties of the various ion channels used in the simulations are based on Hodgkin-
146 Huxley formalism (the detailed description of these equations is given in (Aguiar *et al.*
147 2010)). The density of each channel type (table 1) was adjusted to fit experimental results.
148 The connection from C-fibers was mediated by a relay interneuron with the same
149 morphological features as the WDR neuron. Channel equipment of the relay interneuron was
150 set as in (Aguiar *et al.* 2010). Finally, the parameters used for each type of synapse, in each
151 type of connection, are summarized in (Table 2). We also add a stochastic synaptic noise with
152 excitatory and inhibitory inputs that make the model more realistic and allow statistical
153 approach. The integration time step was set to 0.0125ms and for each experimental
154 conditions, 3 repetitions were performed.

155 **Animals.** We used >P21 male wistar rats ranging from 55 g to 350 g. All rats presenting
156 locomotor deficiency or significant decrease of weight were not included. All experimental
157 procedures followed the ethical guidelines of the International Association for the Study of
158 Pain and were approved by the local ethics committee (agreement no. 330110005-A). Rats
159 were sacrificed by an overdose of anaesthetic (urethane) and dorsal lumbar tissue were kept at
160 -80°C for qRT-PCR (see below).

161 **Drug Application :** Nicardipine hydrochloride (Sigma Aldrich, US) was dissolved in
162 distillated water for a stock solution of 10mM. A solution of 100µM prepared in saline (NaCl
163 0.9%) from the stock solution, was superfused above the spinal cord during nociceptive
164 flexion reflex recordings.

165 **Peptide Nucleic Acid (PNA) design and application.**

166 PNA sequences (15mers) were designed to target regions immediately upstream to the
167 translation start site of Cav1.2 and Cav1.3 mRNA. Care was taken to minimize the stability of
168 hair-pin secondary structures in physiological conditions:

169 Anti-Cav1.2 PNA: Cys-CGTGAGATTGTAATG

170 Anti-Cav1.3 PNA: Cys-GTTACTGATAGGTAG

171 Mismatch PNA: Cys-CGTGAATTAGTTAGG

172 To improve their intracellular delivery, cysteine-extended PNA were coupled to the
173 cell-penetrating peptide transportan TP10 (AGYLLGKINLKALAALAKKIL-amide)
174 (Soomets *et al.* 2000) through a disulfide bond. After reduction of the bond in the intracellular
175 medium, transportan-PNA constructs were dissociated and PNA could either associate with
176 target Cav1.2 or Cav1.3 mRNA in the cytosol or translocate into the nucleus, thereby
177 interacting with corresponding DNA sequences.

178 PNA were synthesised automatically on an Applied Biosystems 433A peptide
179 synthesiser using the *t*-Boc strategy (Egholm *et al.* 1993; Koch *et al.* 1997). The carrier
180 peptide, transportan (TP10), was synthesised on the Applied Biosystems 431A peptide
181 synthesiser and purified before conjugation with PNA on a reverse-phase HPLC C₁₈ column.
182 The masses of the purified peptide and PNA were verified by MALDI-TOF (ABI Voyager-
183 DE STR) mass spectrometry. Conjugation was performed in DMSO/ dimethylformamide/ 0.1
184 M acetic buffer pH 5.5 1/1/3 mixture overnight and the products were separated on a C₁₈
185 HPLC column (for detailed description of the conjugation see (Pooga *et al.* 2002). The correct
186 conjugate was determined by absorbance profile in multiwavelength detector of the HPLC
187 and by MALDI-TOF mass spectrometry. Transportan-PNA constructs were injected daily for
188 four days, a time-interval consistent with calcium channel turn-over (Lambert *et al.* 1998;
189 Dobremez *et al.* 2005).

190

191 ***In vivo* electromyographic recordings (EMG)**

192 Electromyographic study was carried out on male rats both ranging from 250-350g and
193 from 55-60g. Rats were placed in a stereotaxic frame to ensure stability during
194 electrophysiological recordings. Recordings were made in the ipsilateral biceps femoris
195 muscle with two teflon-coated stainless steel electrodes (Phymep, France; diameter 200 Lm).
196 Electrical stimuli (1ms, single shocks, master 8 stimulator, AMPI, Israel) were delivered with
197 electrodes placed under the paw skin in the region of the sural nerve. A maximum response
198 was obtained for a stimulus intensity of 60 to 80 V, as determined with single shocks
199 delivered at 30 s intervals to avoid central sensitization. At this stimulus intensity, a slight
200 muscle contraction was elicited without movement of the limb.

201

202 **qRT-PCR**

203 Total RNA was purified with the QIAzol lysis Reagent (QIAGEN) according to the
204 manufacturer's instructions. cDNA was synthesized using Maxima First Strand cDNA
205 Synthesis Kit (ThermoScientific). PCR amplification was performed on a LightCycler LC480
206 (Roche) with primer pairs designed to span exon boundaries and to generate amplicons of
207 ~100 bp. Primer sets for *Sdha*, *Cacna1c* and *Cacna1d* were tested by qRT-PCR and gel
208 electrophoresis for the absence of primer-dimer artifacts and multiple products. cDNA
209 dilution curves were performed to assess primer efficiency and linearity over a large range of
210 cDNA concentrations. Triplicate qRT-PCR reactions were done twice for each sample, using
211 transcript-specific primers (600 nM) and cDNA (10 ng) in a final volume of 10 µl. The SYBR
212 Premix Ex Taq II (Takara) was used according to manufacturer's instructions. The Ct value of

213 each gene was normalized against that of Sdha. The relative level of expression was
214 calculated using the comparative ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) method (Livak and Schmittgen 2001).

215 Quantitative RT-PCR primers

216 Sdha Fw: 5' TGCGGAAGCACGGAAGGAGT 3'

217 Sdha Bw: 5' CTTCTGCTGGCCCTCGATGG 3'

218 Cacna1c Fw: 5' AAGCAAGAACAAACCACTG 3'

219 Cacna1c Bw: 5' TGACACAACCTCACAATCGT 3'

220 Cacna1d Fw: 5' CCTCAACCATCGGTCTAGCA 3'

221 Cacna1d Bw: 5' GCACAGAAACCAGGAACCAG 3'

222 Behavioural tests

223 Rats were placed in the testing cage one hour before the test for habituation. The limb
224 withdrawal threshold was measured with an electronic device (Bioseb, France). A progressive
225 pressure is applied, with pipette tip connected to a force sensor, under the paw of the hindlimb
226 until animals withdraw the limb, the pressure value (in g) is collected. This procedure is
227 repeated three times separated by a minute to have an averaged value. Mechanical response
228 thresholds were monitored before surgery, and at days 7 and 11 (24 h after the last PNA
229 injection) after surgery.

230 Surgical procedures.

231 We used the same experimental procedure as in (Fossat *et al.* 2010). A catheter (PE-10;
232 Phymep, France) was inserted into the subarachnoid space and the tip was pushed to the L5
233 region. The external portion of the catheter was placed under the skin up to the neck. The
234 incision was closed using 3-0 surgical sutures. Antisense injections: Rats were first subjected
235 to gaseous anesthesia with halothane (5 % for induction and 2 % for maintenance). antisense

236 were injected using a Hamilton syringe connected to the catheter and flushed with 10 μ l saline
237 (dead volume of the catheter). Experiments were performed 24 h after the last injection. To
238 assess if the PNA injection was performed in the area of interest (lumbar part of the spinal
239 cord), a volume of 10 μ l of xylocaine was injected. This dose elicits a reversal paralysis of the
240 animal hindlimb with a complete recuperation within few minutes. All rats with no paralysis
241 were rejected.

242 Spinal nerve ligation procedure (SNL): We used a surgical procedure derived from (Kim and
243 Chung 1992). The right L5 spinal nerve was isolated and tightly ligated with a 7.0 silk thread.
244 After complete hemostasis the incision was sutured. Surgery was performed on all rats under
245 gaseous anesthesia with a mixture of isoflurane (5% for induction and 2% for maintenance)
246 and a 1:1 flow ratio of air/O₂. The rats resumed normal activity within 30 minutes after
247 termination of the gaseous anesthesia.

248

249 ***In vivo* extracellular recordings.**

250 A laminectomy was performed on lumbar vertebrae L1-L3 and segments L4-L5 of the
251 spinal cord were exposed. Extracellular recordings of wide dynamic range (WDR) dorsal horn
252 neurons (DHNs) were made with borosilicate glass capillaries (2 M Ω , filled with NaCl
253 684mM) (Harvard apparatus). Electrodes were descended with a microdrive (Unimécanique,
254 France). The depth of the neurons from the surface of the dorsal horn of the spinal cord was
255 monitored. This depth was comparable in all tested groups (652 ± 83 to 762 ± 43 μ m). The
256 criterion for the selection of a neuron was the presence of a A β -fiber-evoked response
257 followed by a C fiber-evoked response to electrical stimulation of the ipsilateral paw.

258 **Windup protocol :**

259 EMG recordings: We recorded myographic responses following transcutaneous electrical
260 stimulation of the centre of the receptive field. A sequence of 15 stimuli was delivered at 1

261 Hz. Each stimulus was a single shock at ~80% of the intensity eliciting a maximal response.
262 Each sequence of 15 stimuli was separated by at least 5 min to avoid cumulative effects. We
263 used spike 2 software to detect myographic units and we calculate the number of spikes
264 following each electric shock with a delay of 80ms. Extracellular recordings: Responses were
265 elicited by a train of 15 transcutaneous stimuli (1 Hz frequency) over the threshold for C
266 fibers. The A β , A δ , and C fibre evoked responses were taken as the action potentials within a
267 time frame of 0-20ms, 20-90ms, 90-300ms respectively (Suzuki *et al.* 2001). The remaining
268 neuronal response (300ms-1s post stimulus), was taken as the post-discharge (PD) of the
269 neuron. In this study, we focused on the C+PD part of the response. We calculated a windup
270 coefficient by measuring the difference between the sum of C+PD responses in all 15 stimuli
271 and the baseline response (i.e., fifteen time the number of action potentials of the first
272 response). Electrophysiological data were acquired by a CED 1401 interface, and analyzed
273 with Spike 2 software (CED, UK). The data were plotted with the Prism software (GraphPad
274 inc.). All values are mean \pm SEM, and n indicates the number of tested animals in EMG
275 recordings or number of WDR in extracellular recordings. Windup plots were normalized to
276 the first response of the series. Statistical analysis was made with Prism software. For
277 electrophysiological recordings, we compared all experimental conditions by the statistical
278 comparison of the windup coefficient. The criterion for significant difference of windup
279 coefficient was $P < 0.05$.

280

281 **3. Results**

282 **Cav1.3 is essential for windup in a computational model of DHNs.** We used a
283 mathematical model of DHNs to simulate the respective role of each LTCs in plateau
284 potential and windup. In this mathematical model, we used published Cav1.2 and Cav1.3
285 kinetics (Xu and Lipscombe 2001; Helton *et al.* 2005). We placed Cav1.3 in the soma and
286 dendrites (see table 1) and restricted Cav1.2 to the somatic compartment in line with
287 immunohistochemical data (Figure 1A and Dobremez et al, 2005). Indeed, Cav1.2 is
288 restricted to the soma while Cav1.3 is localised in soma and dendrites. We performed a qRT-
289 PCR of Cav1.2/Cav1.3 mRNA in the dorsal part of the lumbar spinal cord to have an
290 approximation of the proportion of each Cav subunit and to set the corresponding current in
291 the computational model. Cav1.2 expression level is 2-fold higher than Cav1.3 (Cav1.3 was
292 $44 \pm 1.6\%$ of Cav1.2, $p < 0,001$, Wilcoxon Signed Rank Test, $n=17$ rats). We analysed the
293 capacity of DHNs to generate plateau potentials in the presence or absence of each LTC
294 currents. In the absence of LTCs, a large square current pulse (2s) did not generate plateau but
295 a tonic discharge (Figure 1B1). Repetitive short square current pulses induced a constant
296 discharge frequency (Figure 1B2). When both LTCs were added, the same large current pulse
297 induced a plateau potential followed by a post discharge (Figure 1C1). Repetitive short
298 current pulses triggered a windup of DHNs discharge (see Figure 1C2). The windup
299 coefficient was significantly different between both conditions (-7 ± 4 Cav1.3-/Cav1.2- vs
300 98 ± 2 Cav1.3+/Cav1.2+, $n=6$, $p < 0.01$, Mann Whitney, Figure 1D and E). We next analysed
301 the role of each subunit in the expression of plateau potentials and windup. When Cav1.3 was
302 expressed alone, plateau potentials and windup were expressed (Figure 2A1 and A2). The
303 lower Cav1.3 conductance necessary for appearance of plateau was 10^{-6} S/cm² and the
304 maximum amplitude was reached for 10^{-5} S/cm² at 40pA (intensity of stimulation) (Figure
305 2A3). By contrast, when Cav1.2 was expressed alone, DHNs exhibited a constant discharge

306 frequency with no post discharge and no windup was expressed (Figure 2B1 and B2). Plateau
307 was not elicited regardless the intensity of stimulation (Figure 2B3). We calculated a windup
308 coefficient for Cav1.3 or Cav1.2 alone and we observed a significant difference between both
309 conditions (94 ± 1 Cav1.3+/Cav1.2- versus -3 ± 8 Cav1.3-/Cav1.2+, $n=6$, $p<0.01$, Mann
310 Whitney, Figure 2C and D). Therefore, simulations predict that Cav1.3 but not Cav1.2 is
311 essential for the expression of plateau and windup.

312 Next, we added a synaptic component to the DHN model and evaluated the role of Cav1.2
313 and Cav1.3 in the windup of DHNs following stimulation of afferent C-fibers. C-fibers are
314 connected to the DHNs through interneurons containing AMPA, NMDA and NK1 excitatory
315 receptors. When both LTCs subunits are present, repetitive stimulations of C-fibers at 1 Hz
316 induced a windup of DHNs (Cav1.2(+)/Cav1.3(+); windup coefficient 137 ± 1 , $n=6$, Figure 3A,
317 D1 and D2). Windup is still expressed when Cav1.2 is removed (Cav1.2(-)/Cav1.3(+);
318 windup coefficient 71 ± 12 , $n=6$, Figure 3B, E1 and E2). By contrast, with no Cav1.3, only a
319 very slight windup is observed (Cav1.2(+)/Cav1.3(-); windup coefficient 14 ± 1 , $n=6$, Figure
320 3C, D), mainly due to NMDA receptor activation during C-fibers stimulations (Figure 4).
321 This result confirms the role of Cav1.3 in setting the amplitude of windup, and the need for a
322 synaptic component (e.g NMDA receptor) for the onset of windup. By contrast, Cav1.2 has
323 no role in windup in this model. To test the physiological relevance of these results, we used a
324 biological preparation to analyse the impact on windup of the blockade of Cav1.2 and Cav1.3.

325 **LTCs control the onset of windup in young and adult rats.**

326 Classically, *in vitro* studies on the windup of DHNs are performed on spinal slices from 3
327 weeks old rats while *in vivo* studies are generally made on 2 to 3 months old rats (Kim and
328 Chung 1992), (Thompson *et al.* 1990; Morisset and Nagy 1998; Derjean *et al.* 2003). We first
329 compare the windup of the nociceptive flexion reflex in these two age groups to assess for a
330 possible difference in amplitude or molecular mechanisms (Figure 5). A stable nociceptive

331 reflex was obtained by electrical stimulations of high threshold afferents in the sural nerve
332 region of the paw. When the stimulus was repeated at low frequency (1 Hz), the reflex
333 magnitude gradually increased during the sequence of stimulation, featuring the windup of the
334 flexion reflex (Gozariu *et al.* 1997). The number of muscular units activated increases across
335 the 15 shocks (Figure 5A, B). Windup is similar in amplitude between the two age groups
336 (Windup coefficient was 517 ± 148.7 , in 250-300g rats and 511 ± 104.7 in 55-60g rats, $n=15$,
337 $p=0.67$, Mann Whitney, Figure 5 E1, E2), and is sensitive to the LTC blocker nicardipine in
338 the two group of rats (for 250-300g rats, windup coefficient was decreased from 397 ± 126 in
339 control to 48 ± 15.2 , $n=7$, $p<0.05$, Wilcoxon matched-pair ranked; For 55-60g rats, windup
340 coefficient was decreased from 534 ± 126.6 in control to 54 ± 34.8 , $n=7$, $p<0.05$, Wilcoxon
341 matched-pair ranked, Figure 5 F, G). As windup is similar in two age groups, subsequent
342 experiments were conducted in the two age groups. Experiments in naive rats were performed
343 in young rats (55-60g) and SNL experiments were done in older rats (250-350g).

344 **Knock-down of LTCs channels.**

345 We then tested LTCs subunit involvement in windup both in naive rats and in rats with
346 spinal nerve ligation. In order to suppress the expression of LTCs, we used an antisense
347 strategy. We injected intrathecally anti-Cav1.2, anti-Cav 1.3 or mismatch peptide nucleic
348 acids (PNA) daily for four days based on reported turn-over of LTCs (Dobremez *et al.* 2005).
349 We evaluated the efficiency of these antisense molecules both at the transcript as well as at
350 the protein level (Figure 6). Injection of the antisense daily for four days significantly reduced
351 the corresponding mRNA (Figure 6A, ANOVA ($p<0.001$) followed by Bonferroni's multiple
352 comparison test, Cav1.2 expression was $19 \pm 5\%$ of control with anti-Cav1.2 PNA injection,
353 $p<0.01$, $102 \pm 18\%$ of control with Mismatch PNA, $p>0.05$, $n=6$ in each group (control, Anti-
354 Cav1.2 and mismatch); ANOVA ($p<0.01$) followed by Bonferroni's multiple comparison test,
355 Cav1.3 expression was $22.5 \pm 7.4\%$ of control with anti-Cav1.3 PNA injection, $p<0.05$, and

356 112±25% of control with Mismatch PNA, $p>0.05$, $n=7$ for control, $n=4$ for Anti-Cav1.3 and
357 $n=5$ for mismatch). We next assessed for knock down at the protein level by immunostaining
358 for Cav after PNA treatment (Figure 6B-D). We observed that Cav immunoreactivity is
359 decreased by the corresponding antisense molecule but not the irrelevant PNA (Figure 6B).
360 The intensity of the immunolabelling for Cav1.2 was significantly reduced when Anti-Cav1.2
361 was injected but not with the mismatch molecule (Figure 6C, ANOVA ($p<0.001$) followed by
362 Bonferroni's multiple comparison test, $57.4 \pm 9.4\%$ of Sham, $p<0.01$). Again the intensity of
363 immunolabelling was significantly reduced when Anti-Cav1.3 was injected but not with the
364 mismatch molecule (Figure 6D, ANOVA ($p<0.001$) followed by Bonferroni's multiple
365 comparison test, $53 \pm 13.7\%$ of Sham, $p<0.001$). The knockdown induces a 50% decrease in
366 the protein level that is enough to induce a biological effect (Fossat *et al.* 2010) maybe due to
367 a threshold effect whereby the level of protein reached is too low to be efficient.

368 **Cav1.3 mediates the onset of windup *in vivo*.**

369 We first analysed the consequence of LTCs knock down on the windup of a nociceptive
370 flexion reflex (Figure 7). Windup amplitude was similar between "mismatch" PNA and sham
371 animals (Figure 7A1, A2, windup coefficient was 723 ± 142 , $n=8$, for mismatch and 510 ± 90 ,
372 $n=13$, for Sham, $p=0.14$, Mann-Whitney test, Figure 4B1,B2). The amplitude of windup was
373 not different between sham and animals treated with anti-Cav1.2 PNA (Figure 7A3, windup
374 coefficient was 510 ± 90 , $n=13$ for Sham and 377 ± 110 , $n=8$ for anti-Cav1.2, $p=0.49$, Mann-
375 Whitney test, Figure 7C1, C2). By contrast, blocking Cav1.3 expression completely
376 suppressed the windup of the nociceptive flexion reflex (Figure 7A4, windup coefficient was
377 510 ± 90 , $n=13$ for Sham and 39 ± 13 , $n=7$ for anti-Cav1.3 $p=0.0004$, Mann-Whitney test,
378 Figure 7D1, D2). These results confirm *in vivo* the prominent role of Cav1.3 in windup in
379 spinal cord circuits.

380 **Decrease of Cav1.3 expression is coupled to a decrease in windup amplitude in Spinal**
381 **Nerve Ligation (SNL) rats.**

382 In neuropathic conditions, DHNs become hyperexcitable (Chapman *et al.* 1998; Chu *et al.*
383 2004; Fossat *et al.* 2010) and changes in windup are considered as an indicator of excitability
384 states (Sandkuhler 2009). Thus, we focused on windup amplitude in the SNL model of
385 neuropathy. We first confirmed the neuropathic state by measuring the mechanical threshold
386 of the limb withdrawal reflex in response to mechanical stimulation of the paw to confirm the
387 SNL-induced mechanical allodynia. One week after the surgical procedure, SNL rats
388 presented a strong mechanical allodynia as reflected by the decrease of the mechanical
389 threshold (from 74 ± 5 g in control (Day 0) to 30 ± 1.5 g in SNL (Day 7), $n=14$ rats, $p < 0.0001$,
390 Paired t-test). We then analysed the response of DHNs with *in vivo* extracellular recordings in
391 2 to 3 months old rats. We focused on wide dynamic range (WDR) neurons responding to
392 both low and high intensity electrical stimulation. Unexpectedly, windup amplitude of WDR
393 neurons in SNL rats was significantly decreased compared to naive rats whereas windup
394 amplitude was not modified in sham rats (Figure 8A1-A2, Windup coefficient was 66 ± 14 ,
395 $n=41$ DHNs for SNL rats, 118 ± 4 , $n=119$ DHNs, for naive rats and 112 ± 16.5 , $n=6$ DHNs, for
396 shams, $p < 0.01$ for SNL versus Naive, Dunn's multiple comparison test.). In order to see if a
397 modification of LTCs expression could explain this result after the SNL procedure, we
398 performed qRT-PCR to determine changes in LTCs mRNA expression, and we observed an
399 increase in Cav1.2 mRNA and a decrease in Cav1.3 mRNA (Figure 8B, Cav1.2 expression in
400 SNL rats was 215 ± 22.9 % of sham expression, $p < 0.01$, Mann Whitney; Cav1.3 expression in
401 SNL rats was 60 ± 4.6 % of sham expression, $p < 0.05$, Mann Whitney). We also measured the
402 immunofluorescence intensity and confirm the decrease in Cav1.3 and the increase of Cav1.2
403 expression (Figure 8C1-3, 56.2 ± 11.6 % of Sham for Cav1.3; 132 ± 7.3 % of Sham for Cav1.2,

404 $p < 0.01$, Mann Whitney;). However, no change in spatial distribution of Cav1.2 or Cav1.3
405 was observed after the SNL procedure (Figure 1A).

406 Because Cav1.3 is involved in the onset of windup in naive rats, we propose that the
407 decrease expression of Cav1.3 in SNL is responsible for the decrease windup amplitude in
408 SNL rats. To test for this hypothesis, we used the mathematical DHN model to modify LTCs
409 in a similar fashion to the changes observed in mRNA after SNL procedure (Figure 8D).
410 Repetitive C-fiber stimulations in the model induced a windup of DHNs but the amplitude of
411 the windup was clearly decreased (Figure 8D1, D2, the windup coefficient was 104 ± 3 in
412 Naive/sham LTCs proportion and 50 ± 4 in SNL LTCs proportion, $n=6$, $p < 0.01$, Mann
413 Whitney). These results indicate that windup amplitude is decreased in SNL model of
414 neuropathy and this effect can be reproduced by decreasing Cav1.3 conductances. In order to
415 confirm the prominent role of the decrease of Cav1.3 expression in the decrease in windup
416 amplitude, we used the antisense strategy to see if the windup in SNL is still dependent on
417 Cav1.3 channels. As it has already been demonstrated (Fossat *et al.* 2010), we first confirmed
418 that SNL-induced mechanical allodynia can be abolished by Cav1.2 expression blockade but
419 not Cav1.3 (Figure 9; day 11 after AntiCav1.2, 71 ± 4.1 g, $p(\text{vs Day0}) = 0.057$; day 11 after
420 AntiCav1.3, 29 ± 1.7 g, $p(\text{vs Day0}) < 0.01$, paired t-test). We then assessed the consequences of
421 LTCs blockade in the onset of windup. Cav1.3 expression blockade significantly decreased
422 the amplitude of windup while Cav1.2 expression blockade or mismatch had no significant
423 effect on windup amplitude (Figure 10, Windup coefficient was 66 ± 14 , $n=41$ for SNL, 26 ± 10 ,
424 $n=19$ for SNL+anti-Cav1.3, 47 ± 13 , $n=20$ for SNL+anti-Cav1.2 and 66 ± 26 , $n=10$ for
425 SNL+mismatch, $p=0.045$ for SNL vs SNL+anti-Cav1.3, $p=0.40$ for SNL vs SNL+anti-Cav1.2
426 and $p=0.9$ for SNL vs SNL+mismatch, Mann Whitney test). All together, these results suggest
427 that Cav1.3 is the main channel involved in the onset of windup regardless the physio-
428 pathological conditions while Cav1.2 is involved in SNL-induced DHNs hyperexcitability.

429 **Role of plateau and windup in neuropathic pain.**

430 The decrease in windup amplitude after the SNL procedure is surprising because it has
431 already been shown that plateau potentials are more frequent in SNL rats (Reali *et al.* 2011).
432 Thus, we compared the evolution of plateau potentials and windup with our mathematical
433 approach in condition of decreased Cav1.3 expression. We first assessed for the consequence
434 of changes in Cav1.3 and Cav1.2 expression in plateau potentials. As shown in figure 11A,
435 plateau potentials are still expressed in neurones with decreased expression of Cav1.3 and
436 increased expression of Cav1.2 (Figure 11A1 (naive LTC proportion) and A2 (SNL LTC
437 proportion)). Moreover, amplitude of plateau depends on stimulation intensity and the
438 maximum amplitude is reached with lower stimulation intensity in SNL LTC proportion than
439 in naive LTC proportion (Figure 11A3). By contrast, the amplitude of windup, induced by
440 repetitive short square current pulses, is significantly reduced in SNL LTC proportions
441 (Figure 11B). These results show that Windup and Plateau potentials are not equivalent in
442 chronic pain conditions. Moreover, Plateau expression is more robust than Windup. These
443 results suggest that plateaus are not only involved in short-term sensitization in SNL rats but
444 also in long term sensitization where they support prolonged calcium influx.

445 .

446 4. Discussion

447 In this study, we demonstrated that short-term and long-term sensitization to pain are
448 controlled by distinct molecular mechanisms. More specifically, our results point to a
449 differential role of Cav1.2 and Cav1.3 in DHN excitability. Cav1.3 controls the onset of
450 windup in the absence of synaptic influences and significantly increases the amplitude of
451 windup when NMDA receptors are present. By contrast, Cav1.2 already shown to have a role
452 on DHN hyperexcitability, through gene activation in pathological conditions had no effect on
453 windup. Moreover, we demonstrated in a model of neuropathy, that windup amplitude is
454 decreased in accordance with a decrease in Cav1.3 mRNA expression. Together, these results
455 reveal that mechanisms for short and long-term sensitization are distinct phenomena, and that
456 L-type calcium channel subunits independently regulate nociceptive pathway in short and
457 long-term sensitization to pain.

458 VGCCs in pain pathway.

459 Voltage gated calcium channels (VGCCs) are a wide family of calcium channels that allow
460 Ca²⁺ influx into the cell. In the central and peripheral nervous system, the high neuronal
461 compartmentalization between cell body, axon and dendrites give different cell functions to
462 VGCC depending on their subcellular distribution. Calcium influx through VGCCs is
463 responsible for transmitter release, increase in neuronal excitability and gene expression. In
464 nociceptive pathways, VGCCs are mainly expressed in the A δ and C nociceptive fibres and
465 participate to pain transmission. Interestingly, the Cav2.2 subunit constitutes an important
466 calcium influx in A δ and C nociceptive fibers (Gribkoff 2006). Moreover, μ opioid receptor-
467 induced inhibition of Cav2.2 sustains opioid-induced analgesia (Seward *et al.* 1991; Bourinet
468 *et al.* 1996). Cav3.2 subunit is also of major importance in the presynaptic control of pain.
469 Indeed, knock down of Cav3.2 in nociceptive fibres decreases pain sensitivity in a model of
470 neuropathic pain (Bourinet *et al.* 2005). By contrast, while LTCs do not participate in the

471 acute nociceptive transmission (Diaz and Dickenson 1997; Fossat *et al.* 2007), they have a
472 role at postsynaptic sites and control excitability and intrinsic properties of DHNs (Morisset
473 and Nagy 1999; Heinke *et al.* 2004; Fossat *et al.* 2007). Moreover, LTCs control plateau
474 potentials, a mechanism of input/output amplification that underlies the onset of windup in
475 DHNs. Here, we show that Cav1.3 is the main conductance responsible for the expression of
476 plateau and windup of DHNs. Cav1.2 is also expressed in DHNs but has a minor role in the
477 onset of windup; it would rather participate in calcium influx regulating gene expression and
478 mediating long term changes in DHNs excitability associated with neuropathic pain. Indeed,
479 we confirmed here that Cav1.2 expression blockade suppresses the mechanical allodynia and
480 DHNs hyperexcitability induced by spinal nerve ligation (Fossat *et al.* 2010). Taken together,
481 these results suggest that the post synaptic LTCs participate in the large role of VGCCs in
482 amplifying nociceptive responses. Moreover, Cav1.2 is involved in long term changes while
483 the Cav1.3 participates in short term central sensitization to pain.

484 **Synaptic versus cellular component of windup**

485 Windup is a form of activity-dependent plasticity of spinal circuits participating in pain
486 processing. Here we showed that windup is mainly controlled by the Cav1.3 subunit of LTCs
487 but not by the Cav1.2 subunit. Thus, Cav1.3 provides DHNs with an intrinsic mechanism for
488 input/output amplification, allowing for prolonged and intense after-discharges in response to
489 a brief stimulus. However, windup relies also on synaptic plasticity involving NMDA and
490 NK1 receptors (Baranauskas and Nistri 1998; Herrero *et al.* 2000). Consistently, results
491 obtained here with our mathematical model together with previous results reveal that
492 excitatory synaptic component such as NMDA or NK1, is also required in a physiological
493 context to trigger windup in DHNs (Thompson *et al.* 1990; Fossat *et al.* 2007; Aguiar *et al.*
494 2010). Moreover, nociceptive fiber activation elicits a complex barrage of excitatory and
495 inhibitory postsynaptic currents in DHNs (Moore *et al.* 2000). Thus, DHNs are influenced by

496 this dynamic balance between excitatory and inhibitory synaptic inputs where inhibition
497 should be dominated by the excitations in order to trigger plateau potentials and windup in
498 DHNs following primary afferent stimulation (Fossat *et al.* 2007). Finally, we cannot exclude
499 that other VGCCs could participate in the onset of windup in DHNs. Indeed, a specific Cav3
500 subunit blocker, ethosuximide is also able to significantly decrease the amplitude of windup
501 in DHNs *in vivo* (Matthews and Dickenson 2001). However, ethosuximide also decreases the
502 acute nociceptive response suggesting a presynaptic role of Cav3 channels that would
503 decrease the excitatory synaptic inputs necessary for the onset of windup.

504 **Plateau potentials and windup in neuropathic pain**

505 Plateau potentials and plateau-dependent windup are intrinsic mechanisms for input/output
506 amplification that increase the gain in pain in normal conditions (Morisset and Nagy 1998;
507 Derjean *et al.* 2003). In other words, they reveal the capacity of DHNs to modify their
508 response to sustained nociceptive inputs (Baranauskas and Nistri 1998; Li *et al.* 1999), and
509 thus underline a mechanism to protect a healing zone in damaged area (Sandkuhler 2009).
510 Windup is also used to characterize central sensitization in pain patients (Staud *et al.* 2007). In
511 fibromyalgia, the amplitude of the temporal summation of the delayed response (i.e windup
512 measurement in humans) is increased which causes an improvement of input/output
513 amplification leading to an amplified pain sensation (Price and Staud 2005). However, the
514 origin of fibromyalgia is difficult to determine and is not always related to neuropathic pain.
515 Moreover, windup and long-term central sensitization as a consequence of nerve lesion are
516 not equivalent (Woolf 1996). In line with these findings, we demonstrated here that windup
517 amplitude is decreased in the SNL model of neuropathy while plateau amplification remains
518 unaffected. The latter result is in line with previous results showing an increased proportion of
519 plateau expressing neurons in neuropathic conditions (Reali *et al.* 2011). This apparent
520 discrepancy is intriguing since both phenomena share the same molecular partners. Indeed,

521 LTCs are responsible for the active depolarisation during a plateau protocol and sustained
522 after discharge occurring after the plateau protocol is controlled by cationic non-specific
523 calcium-activated channels (ICAN) (Morisset and Nagy 1999). This after discharge is a major
524 contributor of windup coefficient. In naive rats, calcium influx through Cav1.3 allows the
525 activation of ICAN and thus sustained afterdischarge. In SNL rats, Cav1.3 activation during a
526 plateau protocol allows an active depolarisation and a discharge acceleration but since Cav1.3
527 expression is decreased leading to a decrease in calcium influx, ICAN should be less
528 activated. Thus, plateau amplification is still expressed while the windup coefficient is
529 decreased. This discrepancy between windup and plateau reveals that both phenomena are not
530 equivalent. Taken together, these results suggest that in SNL rats, the physiological role of
531 windup is decreased. Consequently the ability to trigger reversible central sensitization as a
532 physiological, protective mechanism is impaired in chronic pain conditions.

533 **LTCs and long term changes associated with neuropathic pain.**

534 Based on their different kinetics and spatial distribution, our mathematical model
535 suggests that Cav1.3 is the intrinsic conductance responsible for the onset of plateau and
536 windup. This is further suggested by the antisense approach combined with *in vivo*
537 electromyographic recordings. As already proposed above, the dendritic expression of Cav1.3
538 coupled to its low activation threshold may allow an active depolarization of the DHN that
539 can be prolonged by other conductances such as ICAN (Morisset and Nagy 1999; Fossat *et al.*
540 2007). By contrast, the somatic localization of Cav1.2 and its relative high activation
541 threshold is likely to make it unavailable for fast electrical functions. Beside their capacity to
542 modulate membrane potential, LTCs are also involved in long-term changes that mediate
543 cellular mechanisms such as postsynaptic changes and gene expression regulation (Grover
544 and Teyler 1990; Morgan and Teyler 1999; Fossat *et al.* 2010; Ma *et al.* 2013; Naka *et al.*
545 2013). Indeed, in the SNL model of neuropathy, Cav1.2 subunits are known to mediate DHN

546 hyperexcitability through CREB activation and subsequent alteration of gene expression
547 (Fossat *et al.* 2010). These results clearly establish a differential role of LTCs in short and
548 long-term plasticity in the dorsal horn of the spinal cord. Therefore, modulation of LTCs
549 subunits would be a crucial phenomenon for both DHN capacity to integrate afferent inputs
550 (i.e role of Cav1.3) and DHN hyperexcitability in chronic pain states (i.e role of Cav1.2).

551 In conclusion, we demonstrated that short-term and long-term sensitization to pain in
552 the spinal cord rely on distinct mechanisms with a differential role of LTCs subunits. These
553 results suggest that plateau potentials and windup are physiological mechanisms that
554 contribute to an efficient nociceptive transmission but are impaired in neuropathic pain
555 conditions. Finally, therapeutic approaches that target regulators of Cav1.2 -mediated changes
556 in gene expression may be more relevant than those that target plateau potentials and windup.

557

558

559 **5- References**

- 560 Aguiar, P., M. Sousa, et al. (2010). "NMDA channels together with L-type calcium currents
561 and calcium-activated nonspecific cationic currents are sufficient to generate windup
562 in WDR neurons." *J Neurophysiol* **104**(2): 1155-1166.
- 563 Baranauskas, G. and A. Nistri (1998). "Sensitization of pain pathways in the spinal cord:
564 cellular mechanisms." *Prog Neurobiol* **54**(3): 349-365.
- 565 Basbaum, A. I., D. M. Bautista, et al. (2009). "Cellular and molecular mechanisms of pain."
566 *Cell* **139**(2): 267-284.
- 567 Bourinet, E., A. Alloui, et al. (2005). "Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in
568 sensory neurons demonstrates its major role in nociception." *Embo J* **24**(2): 315-324.
- 569 Bourinet, E., T. W. Soong, et al. (1996). "Determinants of the G protein-dependent opioid
570 modulation of neuronal calcium channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(4): 1486-
571 1491.
- 572 Chapman, V., R. Suzuki, et al. (1998). "Electrophysiological characterization of spinal
573 neuronal response properties in anaesthetized rats after ligation of spinal nerves L5-
574 L6." *J Physiol* **507 (Pt 3)**: 881-894.
- 575 Chu, K. L., C. R. Faltynek, et al. (2004). "Increased WDR spontaneous activity and receptive
576 field size in rats following a neuropathic or inflammatory injury: implications for
577 mechanical sensitivity." *Neurosci Lett* **372**(1-2): 123-126.
- 578 Derjean, D. (2002). "Propriétés membranaires et contrôle neuromodulateur inhibiteur des
579 neurones nociceptifs profonds de la moelle épinière: Approche électrophysiologique *in*
580 *vitro* chez le rat." PhD thesis.
- 581 Derjean, D., S. Bertrand, et al. (2003). "Dynamic balance of metabotropic inputs causes dorsal
582 horn neurons to switch functional states." *Nat Neurosci* **6**(3): 274-281.
- 583 Diaz, A. and A. H. Dickenson (1997). "Blockade of spinal N- and P-type, but not L-type,
584 calcium channels inhibits the excitability of rat dorsal horn neurones produced by
585 subcutaneous formalin inflammation." *Pain* **69**(1-2): 93-100.
- 586 Dobremez, E., R. Bouali-Benazzouz, et al. (2005). "Distribution and regulation of L-type
587 calcium channels in deep dorsal horn neurons after sciatic nerve injury in rats." *Eur J*
588 *Neurosci* **21**(12): 3321-3333.
- 589 Egholm, M., O. Buchardt, et al. (1993). "PNA hybridizes to complementary oligonucleotides
590 obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules." *Nature* **365**(6446): 566-568.
- 591 Favereaux, A., O. Thoumine, et al. (2011). "Bidirectional integrative regulation of Cav1.2
592 calcium channel by microRNA miR-103: role in pain." *Embo J* **30**(18): 3830-3841.
- 593 Fossat, P., E. Dobremez, et al. (2010). "Knockdown of L calcium channel subtypes:
594 differential effects in neuropathic pain." *J Neurosci* **30**(3): 1073-1085.
- 595 Fossat, P., I. Sibon, et al. (2007). "L-type calcium channels and NMDA receptors: a
596 determinant duo for short-term nociceptive plasticity." *Eur J Neurosci* **25**(1): 127-135.

- 597 Gozariu, M., D. Bragard, et al. (1997). "Temporal summation of C-fiber afferent inputs:
598 competition between facilitatory and inhibitory effects on C-fiber reflex in the rat." *J*
599 *Neurophysiol* **78**(6): 3165-3179.
- 600 Gribkoff, V. K. (2006). "The role of voltage-gated calcium channels in pain and nociception."
601 *Semin Cell Dev Biol* **17**(5): 555-564.
- 602 Grover, L. M. and T. J. Teyler (1990). "Two components of long-term potentiation induced
603 by different patterns of afferent activation." *Nature* **347**(6292): 477-479.
- 604 Heinke, B., E. Balzer, et al. (2004). "Pre- and postsynaptic contributions of voltage-dependent
605 Ca²⁺ channels to nociceptive transmission in rat spinal lamina I neurons." *Eur J*
606 *Neurosci* **19**(1): 103-111.
- 607 Helton, T. D., W. Xu, et al. (2005). "Neuronal L-type calcium channels open quickly and are
608 inhibited slowly." *J Neurosci* **25**(44): 10247-10251.
- 609 Herrero, J. F., J. M. Laird, et al. (2000). "Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation:
610 much ado about something?" *Prog Neurobiol* **61**(2): 169-203.
- 611 Kim, S. H. and J. M. Chung (1992). "An experimental model for peripheral neuropathy
612 produced by segmental spinal nerve ligation in the rat." *Pain* **50**(3): 355-363.
- 613 Koch, T., H. F. Hansen, et al. (1997). "Improvements in automated PNA synthesis using
614 Boc/Z monomers." *J Pept Res* **49**(1): 80-88.
- 615 Lambert, R. C., F. McKenna, et al. (1998). "Low-voltage-activated Ca²⁺ currents are
616 generated by members of the CavT subunit family (alpha1G/H) in rat primary sensory
617 neurons." *J Neurosci* **18**(21): 8605-8613.
- 618 Li, J., D. A. Simone, et al. (1999). "Windup leads to characteristics of central sensitization."
619 *Pain* **79**(1): 75-82.
- 620 Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using
621 real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method." *Methods* **25**(4):
622 402-408.
- 623 Ma, H., S. Cohen, et al. (2013). "Exploring the dominant role of Cav1 channels in signalling
624 to the nucleus." *Biosci Rep* **33**(1): 97-101.
- 625 Matthews, E. A. and A. H. Dickenson (2001). "Effects of ethosuximide, a T-type Ca(2+)
626 channel blocker, on dorsal horn neuronal responses in rats." *Eur J Pharmacol* **415**(2-3):
627 141-149.
- 628 Moore, K. A., H. Baba, et al. (2000). "Synaptic transmission and plasticity in the superficial
629 dorsal horn." *Prog Brain Res* **129**: 63-80.
- 630 Morgan, S. L. and T. J. Teyler (1999). "VDCCs and NMDARs underlie two forms of LTP in
631 CA1 hippocampus in vivo." *J Neurophysiol* **82**(2): 736-740.
- 632 Morisset, V. and F. Nagy (1998). "Nociceptive integration in the rat spinal cord: role of non-
633 linear membrane properties of deep dorsal horn neurons." *Eur J Neurosci* **10**(12):
634 3642-3652.
- 635 Morisset, V. and F. Nagy (1999). "Ionic basis for plateau potentials in deep dorsal horn
636 neurons of the rat spinal cord." *J Neurosci* **19**(17): 7309-7316.
- 637 Morisset, V. and F. Nagy (2000). "Plateau potential-dependent windup of the response to
638 primary afferent stimuli in rat dorsal horn neurons." *Eur J Neurosci* **12**(9): 3087-3095.

- 639 Naka, A., D. Gruber-Schoffnegger, et al. (2013). "Non-Hebbian plasticity at C-fiber synapses
640 in rat spinal cord lamina I neurons." *Pain* **154**(8): 1333-1342.
- 641 Pooga, M., U. Soomets, et al. (2002). "Synthesis of cell-penetrating peptide-PNA constructs."
642 *Methods Mol Biol* **208**: 225-236.
- 643 Price, D. D. and R. Staud (2005). "Neurobiology of fibromyalgia syndrome." *J Rheumatol*
644 *Suppl* **75**: 22-28.
- 645 Reali, C., P. Fossat, et al. (2011). "Intrinsic membrane properties of spinal dorsal horn
646 neurones modulate nociceptive information processing in vivo." *J Physiol* **589**(Pt 11):
647 2733-2743.
- 648 Sandkuhler, J. (2009). "Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia." *Physiol Rev*
649 **89**(2): 707-758.
- 650 Seward, E., C. Hammond, et al. (1991). "Mu-opioid-receptor-mediated inhibition of the N-
651 type calcium-channel current." *Proc Biol Sci* **244**(1310): 129-135.
- 652 Simon, M., J. F. Perrier, et al. (2003). "Subcellular distribution of L-type Ca²⁺ channels
653 responsible for plateau potentials in motoneurons from the lumbar spinal cord of the
654 turtle." *Eur J Neurosci* **18**(2): 258-266.
- 655 Soomets, U., M. Lindgren, et al. (2000). "Deletion analogues of transportan." *Biochim*
656 *Biophys Acta* **1467**(1): 165-176.
- 657 Staud, R., M. E. Robinson, et al. (2007). "Temporal summation of second pain and its
658 maintenance are useful for characterizing widespread central sensitization of
659 fibromyalgia patients." *J Pain* **8**(11): 893-901.
- 660 Suzuki, R., E. A. Matthews, et al. (2001). "Comparison of the effects of MK-801, ketamine
661 and memantine on responses of spinal dorsal horn neurones in a rat model of
662 mononeuropathy." *Pain* **91**(1-2): 101-109.
- 663 Thompson, S. W., A. E. King, et al. (1990). "Activity-Dependent Changes in Rat Ventral
664 Horn Neurons in vitro; Summation of Prolonged Afferent Evoked Postsynaptic
665 Depolarizations Produce a d-2-Amino-5-Phosphonovaleric Acid Sensitive Windup."
666 *Eur J Neurosci* **2**(7): 638-649.
- 667 Woolf, C. J. (1991). "Generation of acute pain: central mechanisms." *Br Med Bull* **47**(3): 523-
668 533.
- 669 Woolf, C. J. (1996). "Windup and central sensitization are not equivalent." *Pain* **66**(2-3): 105-
670 108.
- 671 Xu, W. and D. Lipscombe (2001). "Neuronal Ca(V)_{1.3}α(1) L-type channels activate at
672 relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by
673 dihydropyridines." *J Neurosci* **21**(16): 5944-5951.
- 674
- 675
- 676

677 **Figure legends:**678 **Table 1 :**

	Soma	axon	dendrite
gNaHH	0.04	0.04	0
gKHH	0.05	0.05	0
gCAV13	3.5 e-06	0	3.5 e-06
gCAV12	1.4 e-05	0	0
gCAN	0	0	0.00007
gKCa	0.0001	0	0.001
gNaP	0.0001	0	0
giA	0	0	0
gPas	0.000042	0.000042	0.000042

679 Conductance distribution in WDR neurons. g en S/cm²680 **Table 2**

Synaptic inputs	Conductance
gAMPA Cfiber to Interneuron	0.008
gNMDA C fiber to interneuron	0.004
gNK1 C fiber to interneuron	0.00002
gAMPA interneuron to WDR	0.0002
gNMDA interneuron to WDR	0.0002
gNK1 interneuron to WDR	0.000015
gGABA interneuron to WDR	0.0002
gExcitatory synaptic noise	0.001
gInhibitory synaptic noise	0.001

681 **Table 2 : Synaptic inputs. g en S/cm²**

682

683 **Figure 1 : Computational model of DHNs discharge pattern with or without ILs.** A)
684 Cav1.2 (a, c) and Cav1.3 (e, i,) are expressed in different subcellular compartments of deep
685 dorsal horn neurons (white stars) as shown with Map2 co-detection (b, d, g, k). Cav1.2
686 labeling is restricted to the soma (double arrows in a and c). Cav1.3 is found in the cell body
687 but also in proximal (double arrowheads in e and i), and more distal dendrites (double
688 arrowheads in e and i inset panels (labelled f and j). No changes in localization are observed
689 after nerve injury (SNL, c, i and inset labelled j) as compared to control conditions (Sham, a, e
690 and inset labelled f). Bar: 10 μm . B1 and B2) DHN discharge pattern without ILs. (B1) DHNs
691 response to application of a square current pulse (2s). Note that DHN presents a tonic
692 response with a constant discharge frequency. (B2) DHN response to a series of 8 short
693 (500ms) square current pulses. Response of DHN was the same for all current pulses. C1 and
694 C2) DHN discharge pattern with ILs. In response to a square current pulses (2s), DHN
695 discharge frequency progressively increased showing a plateau potential, followed by a post
696 discharge (C1). Repetitive square current pulses (500ms*8) induced a progressive increase in
697 DHNs response followed by post discharge revealing a windup of DHN discharge (C2). D)
698 Normalized response. E) Windup Coefficient.

699 **Figure 2: Role of Cav1.2 and Cav1.3 on plateau potentials and windup in a**
700 **computational model of DHNs.** A1 and A2) DHN discharge pattern after Cav1.2 removal.
701 With Cav1.3, DHNs exhibit plateau potential (A1) and windup (A2). A3) Diagram displaying
702 the amplitude of plateau potentials according to the amplitude of the Cav1.3 conductance and
703 to the amplitude of the stimulation (amplitude of plateau is measured as the difference in
704 discharge frequency at the end of the stimulus versus discharge frequency at the beginning of
705 the stimulus). Plateau appears at low stimulus intensity (40pA) and low conductance
706 ($0.5\mu\text{S}/\text{cm}^2$). A peak of plateau amplitude is reached for a stimulation intensity of 40pA and a
707 conductance of $10\mu\text{S}/\text{cm}^2$. A post discharge appeared at $5\mu\text{S}/\text{cm}^2$ for a stimulation intensity

708 of 30pA. B1 and B2) DHNs discharge pattern after Cav1.3 removal. Cav1.3 removal converts
709 a plateau DHN into a tonic DHN (B1). No windup is observed (B2). (B3) In absence of
710 Cav1.3 in dendrites, neither plateau potentials nor windup was observed regardless the
711 intensity of stimulation. C) Normalized response. Windup is still present when Cav 1.3
712 subunit is present alone but is suppressed when Cav 1.2 is removed. D) Windup Coefficient.

713 **Figure 3: Computational model of DHNs response to repetitive C-fibers stimulations.**

714 A1) DHNs with LTCs (Cav1.2(+)/Cav1.3(+)) respond to repetitive C-fibers stimulations by a
715 progressive increase in the number of spikes followed by a post discharge revealing windup
716 (Arrows indicate C-fiber stimulations). B) Cav1.2 (Cav1.2(-)/Cav1.3(+)) removal does not
717 suppress the windup induced by repetitive C-fiber stimulations. C) Cav1.3 removal
718 (Cav1.2(+)/Cav1.3(-)) strongly reduces windup and no post discharge is observed. D1 and
719 E1) Normalized responses plotted against the stimulation number in each condition. D2 and
720 E2) Windup coefficient.

721 **Figure 4: Windup has also a synaptic component.** A) Response of the simulated DHN to
722 repetitive stimulation of C-fibers when Cav1.2 and Cav1.3 are absent. B) Same protocol but
723 NMDA receptors are also removed. C1) Normalized response showing that NMDA receptors
724 mediate a slight windup (filled circle) that is completely suppressed when NMDA receptors
725 are suppressed (open circles). C2) Windup Coefficient.

726 **Figure 5: The onset of windup depends on LTCs both in young and adult rats.**

727 A-D) Electromyographic recordings of the biceps femoris response to electrical stimulation of
728 the ipsilateral paw in the region of the sural nerve. A, C) In adult rats, before and after
729 intrathecal injection of nicardipine. B, D) in young rats, before and after intrathecal injection
730 of nicardipine. E1) Normalized responses plotted against the stimulation number in young and
731 adult rats. E2) Windup coefficient in adult and young rats. F1) Normalized responses plotted
732 against the stimulation number in adult rats before and after injection of Nicardipine. F2)

733 Windup coefficient. G1) Normalized responses plotted against the stimulation number in
734 young rats before and after injection of Nicardipine. G2) Windup coefficient.

735 **Figure 6 : *In vivo* knock-down of Cav subunits.**

736 A) qRT PCR of Cav1.2 and Cav1.3 expression following injection of antisense PNA
737 molecules. PNA injection elicits a specific blockade upon the antisense injected. B to D)
738 Cav1.2 and Cav1.3 immunostaining after intrathecal injection of antisense molecules
739 targeting Cav1.2 or Cav1.3 mRNA. Note that Cav1.2 labelling is largely decreased after
740 injection of anti-Cav1.2 PNA whereas Cav1.3 labelling is not affected (B1, B2 and C).
741 Reciprocally, Cav1.3 labelling is decreased after injection of AntiCav1.3 PNA whereas
742 Cav1.2 remained unmodified (B3, B4 and D). (In B, arrows indicate cell bodies in the dorsal
743 horn of the spinal cord).

744 **Figure 7 : Cav1.3 is responsible for the onset of the windup of a nociceptive flexion**

745 **reflex.** A1-A4) Electromyographic recordings of the nociceptive flexion reflex in shams,
746 mismatch-, anti-Cav1.2- or anti-Cav1.3-injected rats (55-60g). B1) Normalized responses
747 plotted against the stimulation number in shams and mismatch. B2) Windup Coefficient. C1)
748 Normalized responses plotted against the stimulation number in shams and Anti-Cav1.2 PNA
749 injection. C2) Windup Coefficient. D1) Normalized responses plotted against the stimulation
750 number in shams and Anti-Cav1.3 PNA. D2) Windup Coefficient.

751 **Figure 8 : Decrease in Cav1.3 expression and windup amplitude in SNL rats.** A1)

752 Normalized responses of WDR neurons plotted against the stimulation number in naive (black
753 dots, sham (grey dots) and SNL rats (white dots). A2) Windup Coefficient. B) qRT-PCR
754 reveals a 2-fold increase of Cav1.2 expression and a decrease by about 40% of Cav1.3
755 expression. C1) Regulation of Cav1.2 (a, b) and Cav1.3 (c, d) expression in deep dorsal horn
756 neurons (white stars). C2) Cav 1.2 staining is regulated in more intense in neuropathic
757 conditions (SNL, double arrows in C1b) than in control rats (Sham, double arrows in C1a).

758 C3) Conversely, Cav1.3 labelling is weaker after nerve injury (SNL, double arrows in C1d)
759 than in control rats (Sham, double arrows in C1c). Bar: 10 μ m. D1) Normalized responses of
760 modelised DHN plotted against the stimulation number in naive LTCs proportion (black dots)
761 and in SNL LTCs proportions (white dots). D2) Windup Coefficient.

762 **Figure 9 : SNL-induced mechanical allodynia is suppressed following Anti-Cav1.2**
763 **injection.** A) SNL procedure (see methods) induced a significant decrease in the mechanical
764 threshold response 7 days after the nerve ligation (day7, $p(vsDay0)<0.001$, Repeated-
765 measures ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test.). SNL-induced
766 allodynia is suppressed by repetitive injection of Anti-Cav1.2 PNA (day11, $p(vsDay0)>0.05$,
767 Repeated-measures ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test). B) Injection
768 of Anti-Cav1.3 PNA has no effect on SNL-induced allodynia that persist after repetitive
769 injections at day 11 (day 11, $p(vsDay0)<0.001$, Repeated-measures ANOVA followed by
770 Bonferroni's multiple comparison test) C) Injection of Mismatch PNA does not modify the
771 SNL-induced allodynia (day 11, $p(vsDay0)<0.05$, Repeated-measures ANOVA followed by
772 Bonferroni's multiple comparison test).

773 **Figure 10 : In SNL rats the onset of windup also depends on Cav1.3.** A1) Normalized
774 responses of WDR neurons plotted against the stimulation number in SNL rats and in SNL
775 rats injected with anti-Cav1.3 PNA. A2) Windup Coefficient. B1) Normalized responses of
776 WDR neurons plotted against the stimulation number in SNL rats and in SNL rats injected
777 with anti-Cav1.2 PNA. B2) Windup Coefficient. C1) Normalized responses of WDR neurons
778 plotted against the stimulation number in SNL rats and in SNL rats injected with mismatch
779 PNA. C2) Windup Coefficient.

780

781 **Figure 11 : The mathematical approach suggest that plateau potentials and windup are**
782 **not equally affected by changes in LTCs expression.** A) A large square current pulse (2s)
783 elicits a plateau potential in naive LTC proportions (A1) but also in case of decreased Cav1.3
784 and increased in Cav1.2 expression (SNL LTC Proportion) (A2). Note that neurons were
785 more responsive to the same stimulus intensity but the difference in instantaneous frequency
786 between the beginning of the square pulse and the end of the square pulse remains similar.
787 The amplitude of plateau is not changed. A3) In naive LTC proportions as well as in SNL-
788 LTC conditions, Plateaus are dependent on stimulus intensity. The maximal plateau amplitude
789 is reached for lower stimulus intensity in SNL LTCs proportion than in naive LTC
790 proportions. B1) Windup elicited by repetitive square current pulses with naive LTCs
791 proportions. B2) Windup elicited by repetitive square current pulses with SNL LTCs
792 proportions. B3) Windup coefficient plotted against the pulse intensity. note that with higher
793 pulse intensity, windup coefficient is decreased in SNL LTCs proportion.

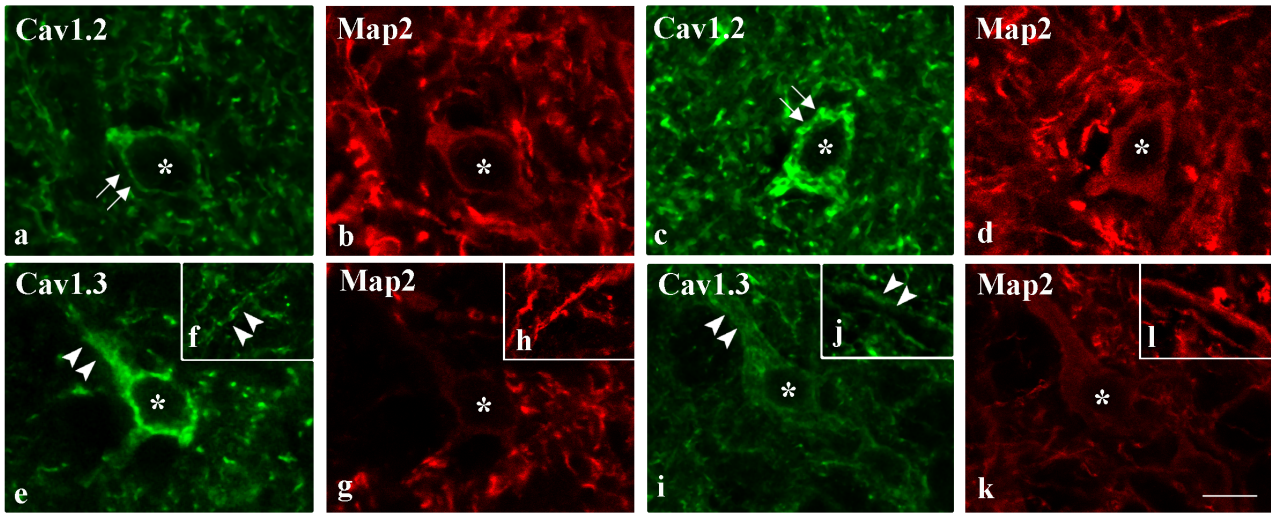
794

795

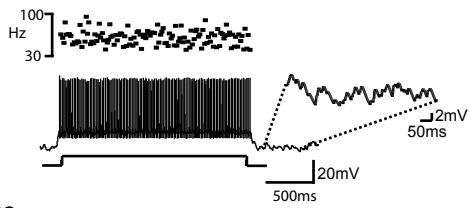
796

797

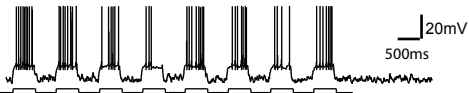
A



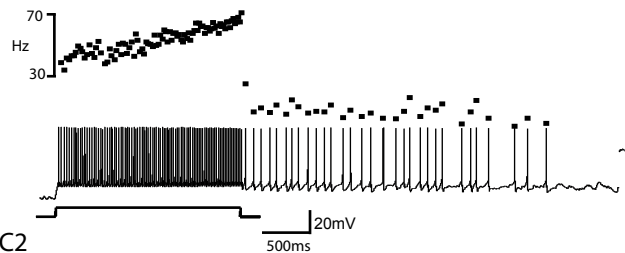
B1 Cav1.2(-)/Cav1.3(-)



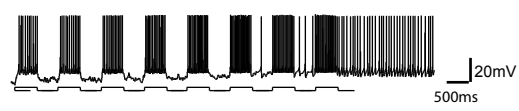
B2



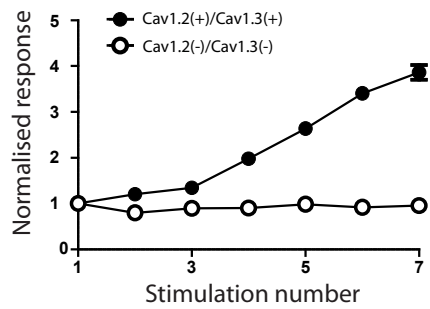
C1 Cav1.2(+)/Cav1.3(+)



C2



D



E

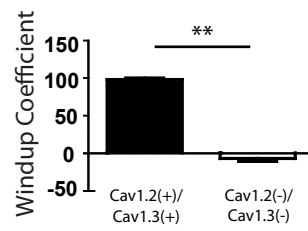


Figure 1 : Radwani et al.

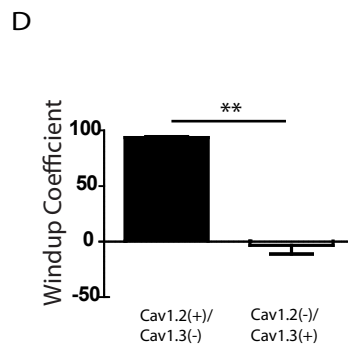
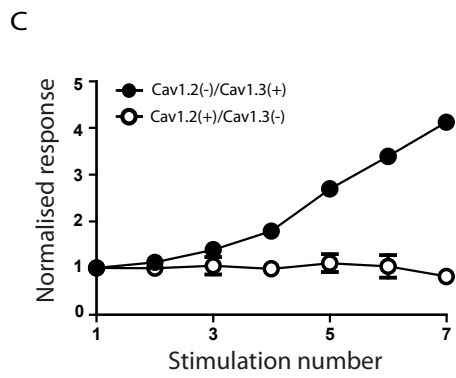
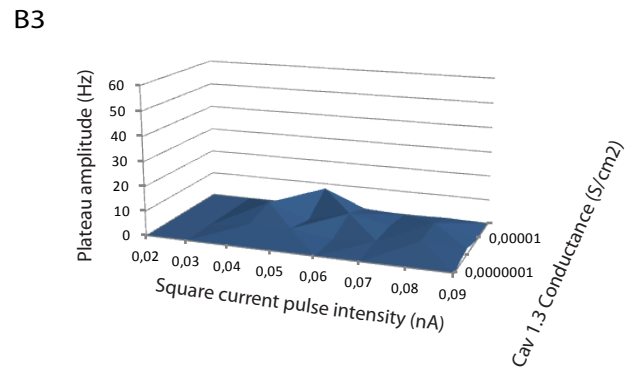
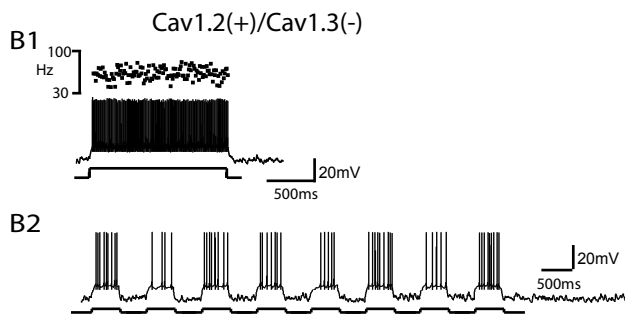
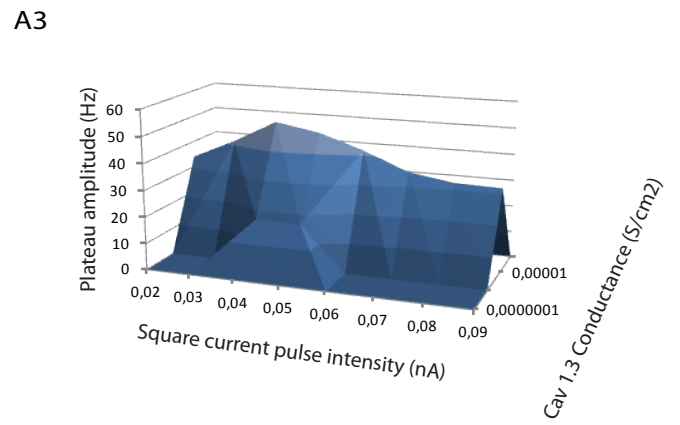
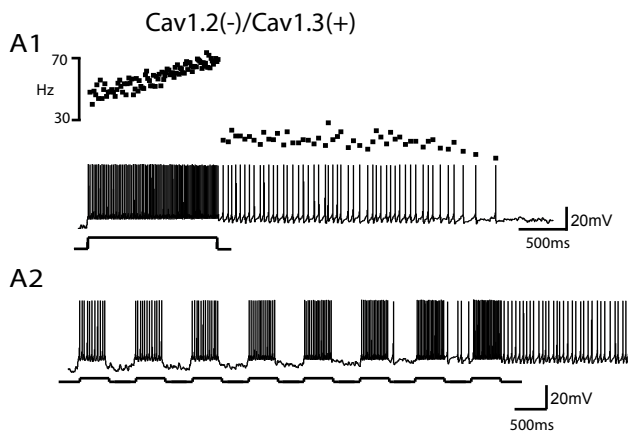


Figure 2: Radwani et al

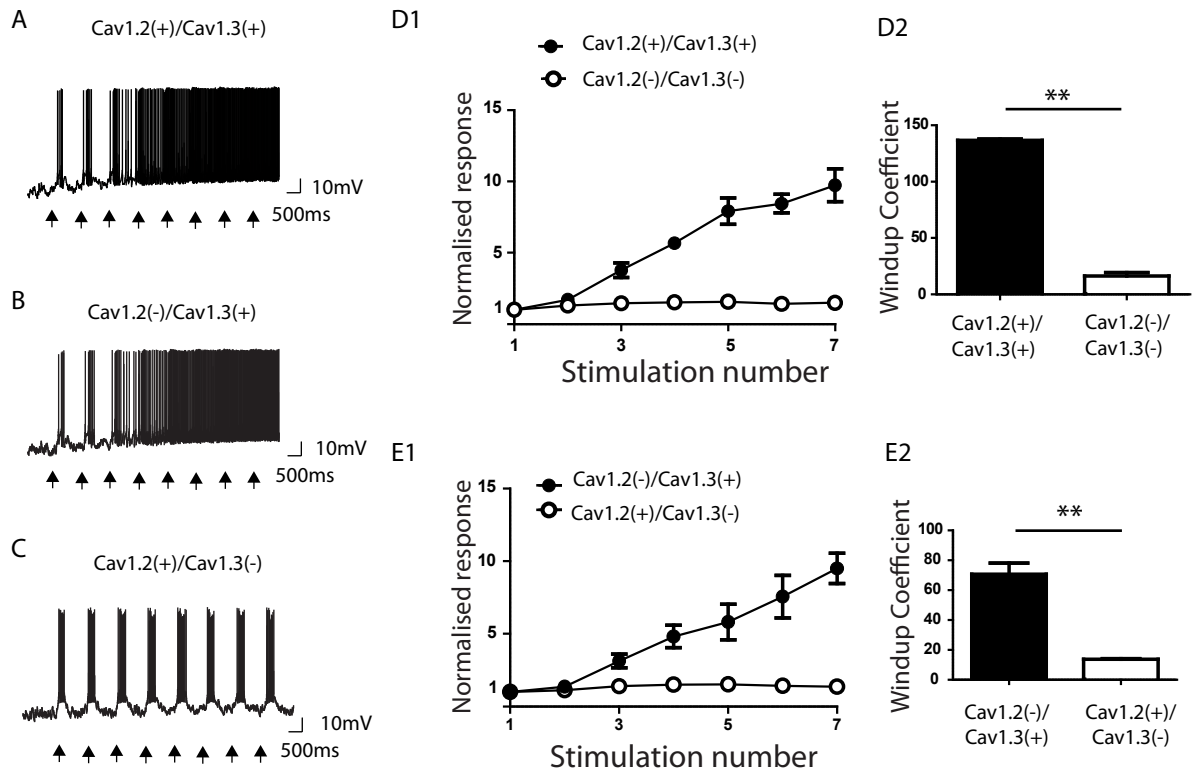


Figure 3: Radwani et al.

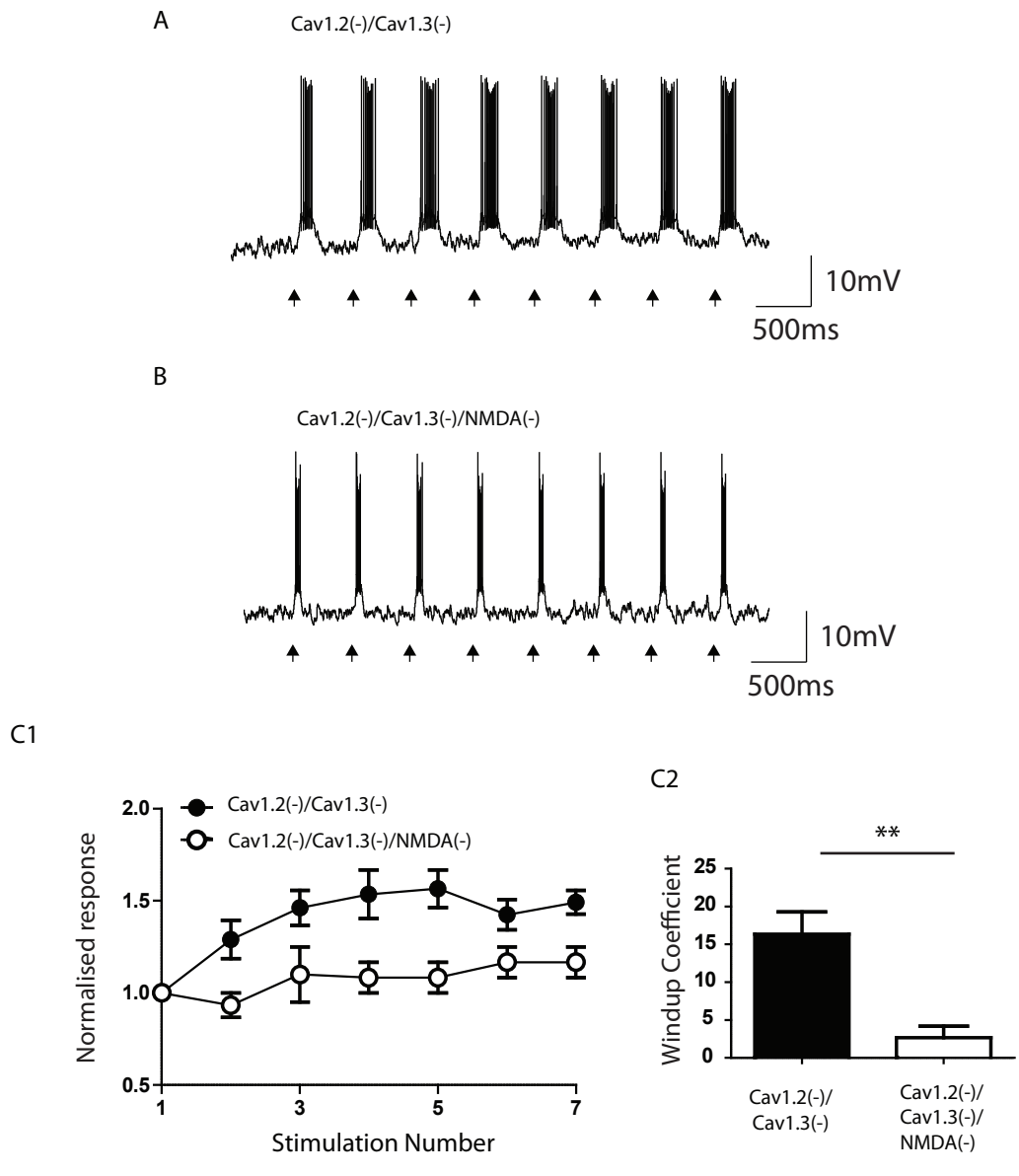


Figure 4: Radwani et al.

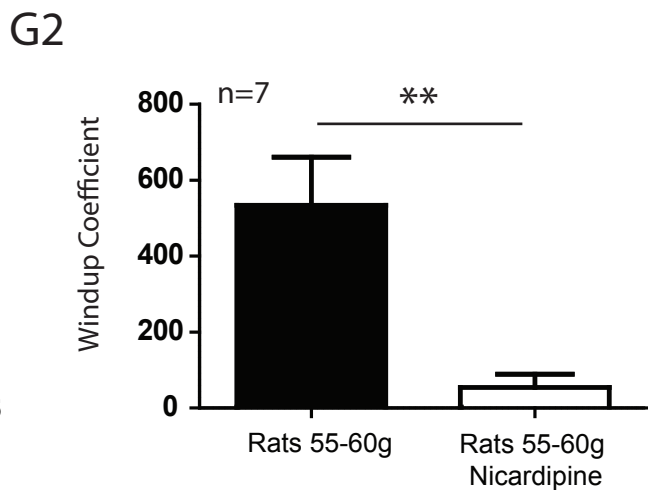
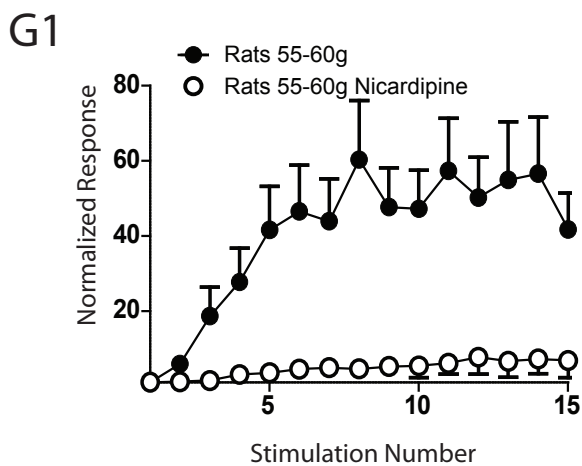
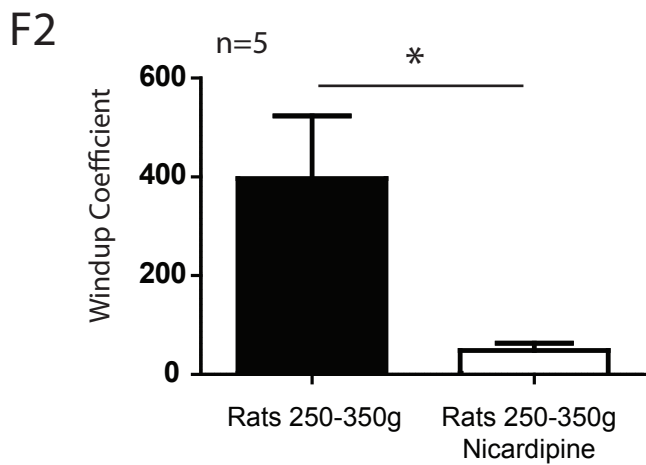
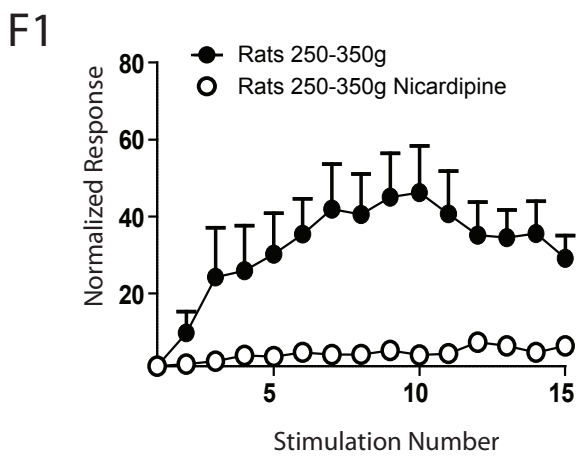
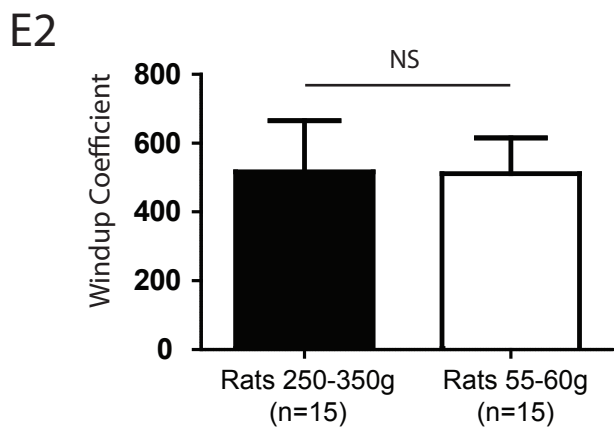
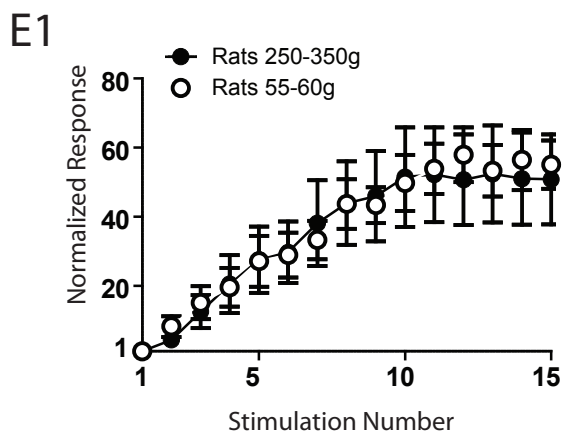
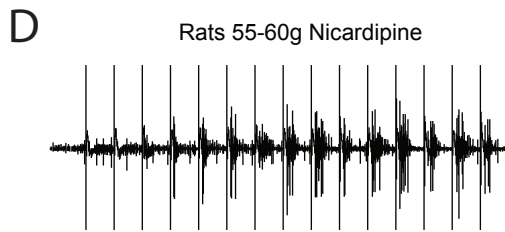
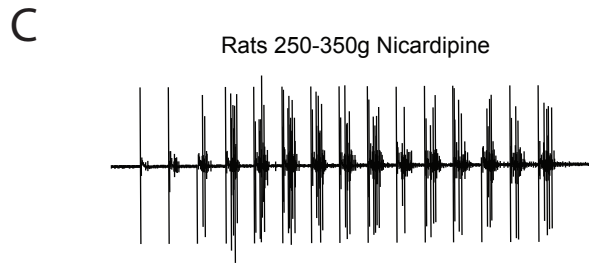
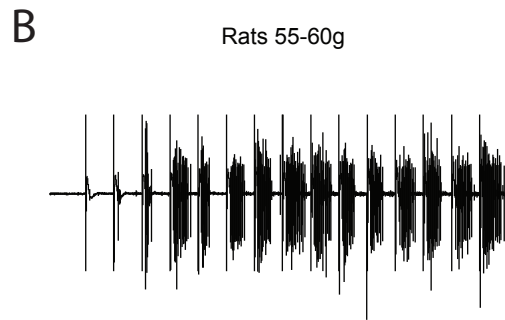
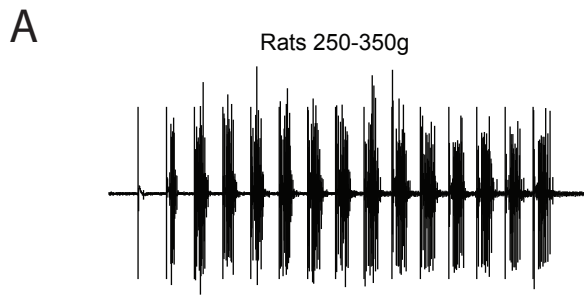


Figure 5 : Radwani et al.

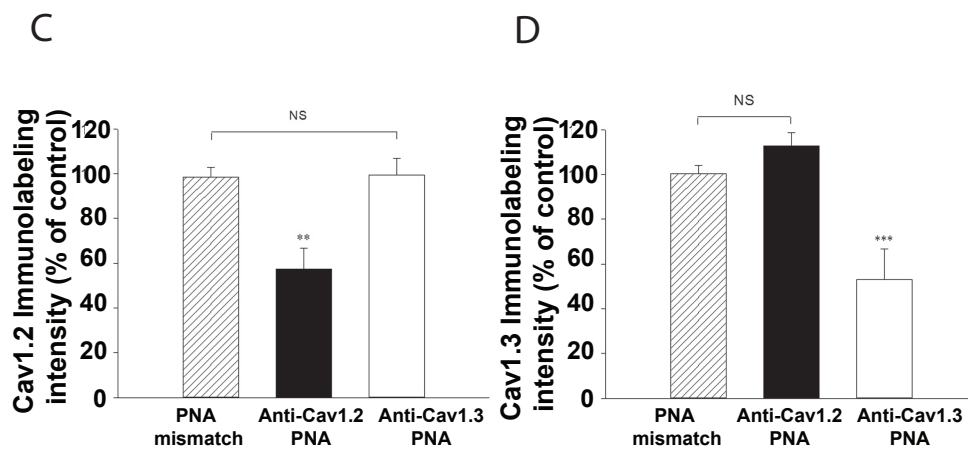
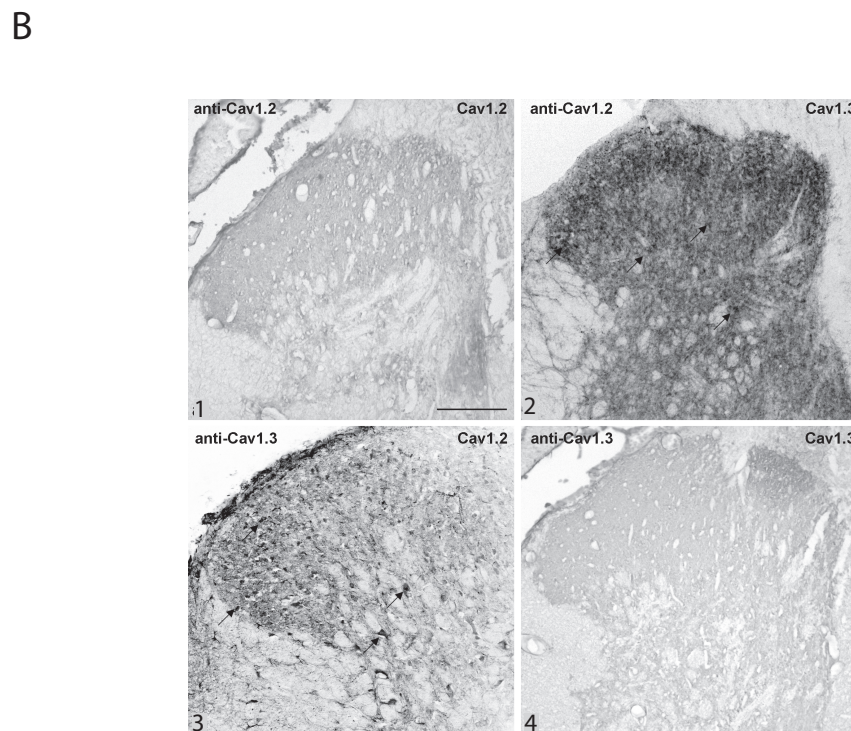
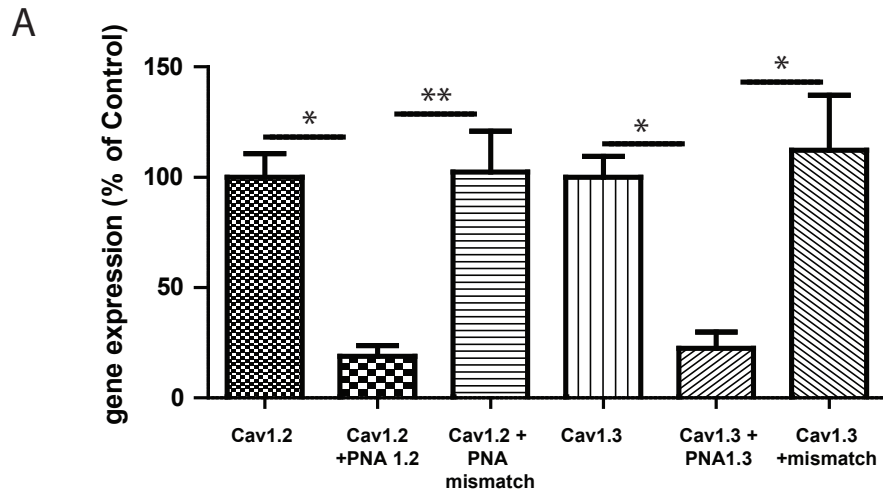


Figure 6; Radwani et al.

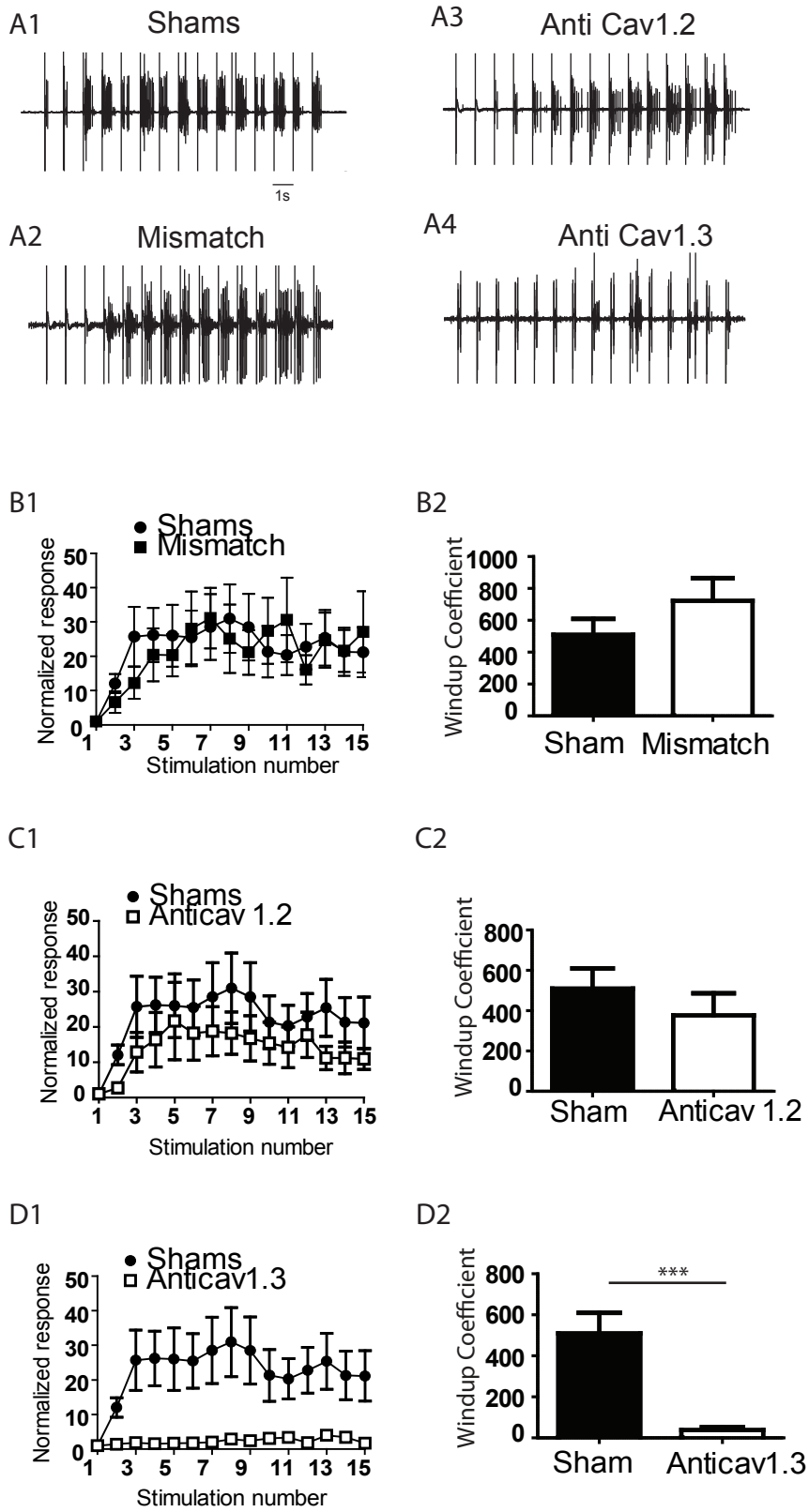
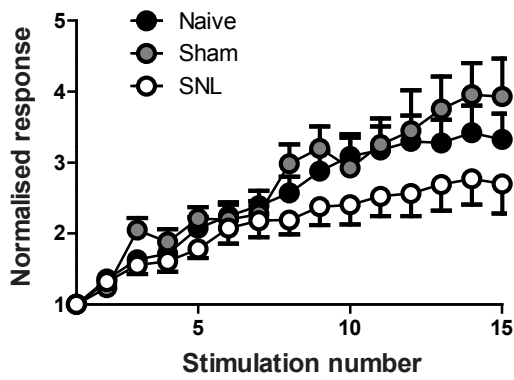
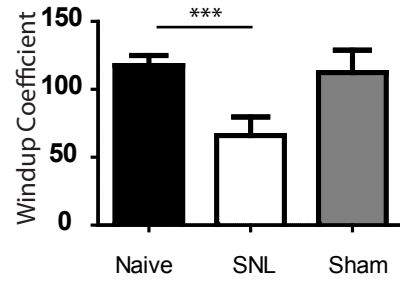


Figure 7: Radwani et al.

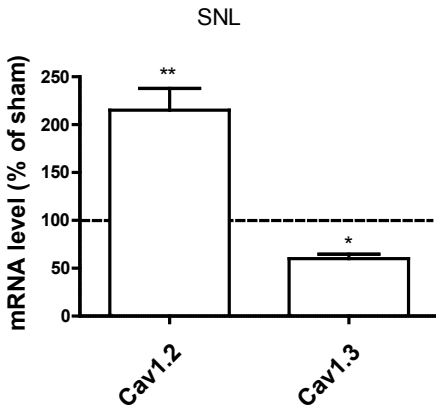
A1



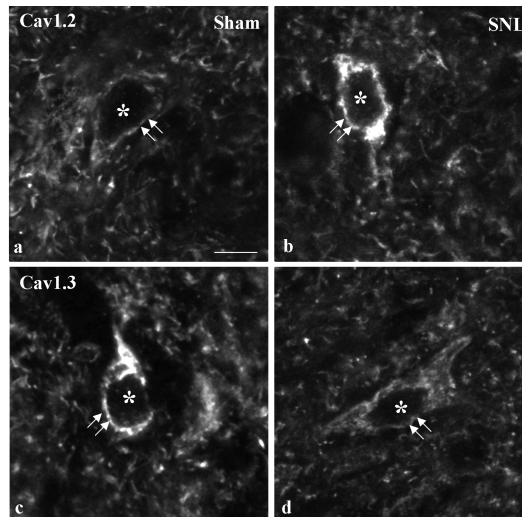
A2



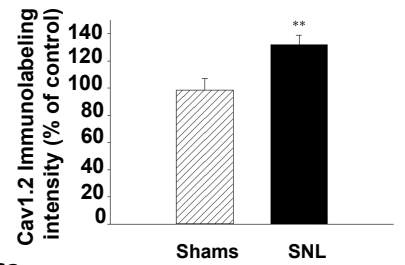
B



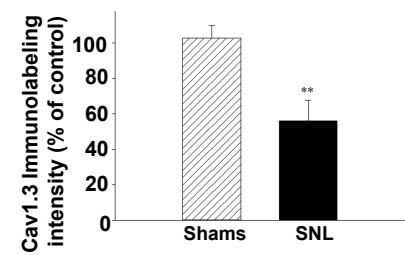
C1



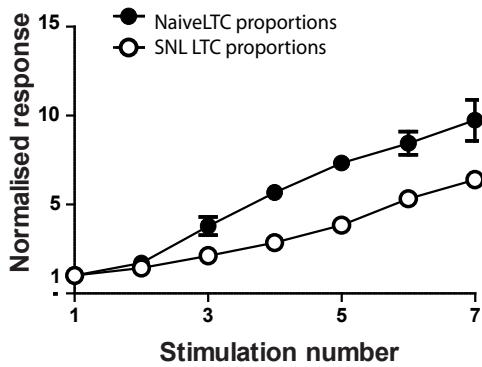
C2



C3



D1



D2

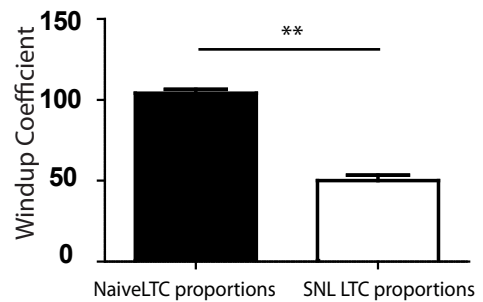


Figure 8: Radwani et al.

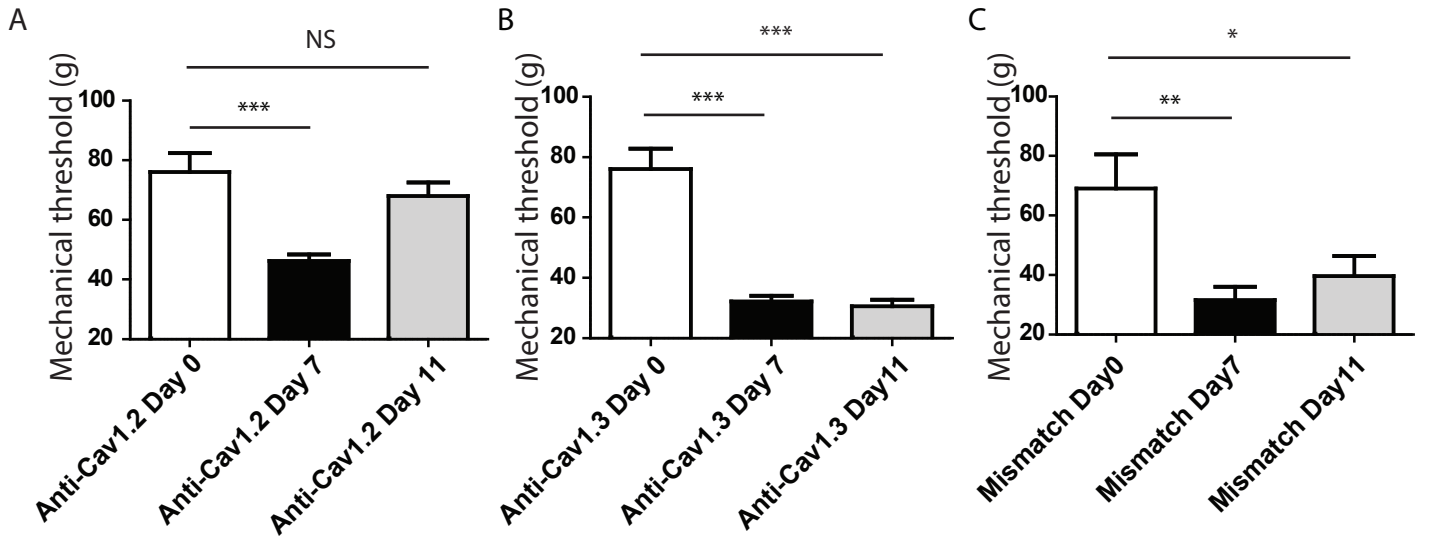
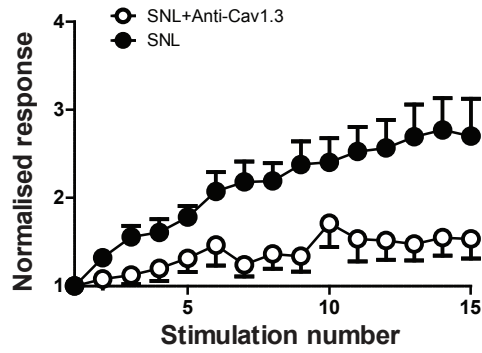
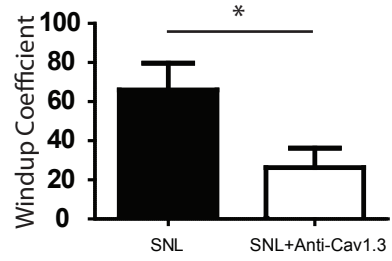


Figure 9: Radwani et al.

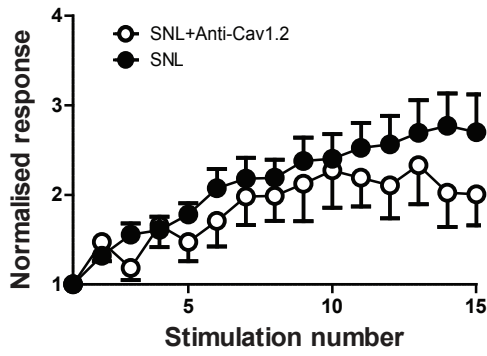
A1



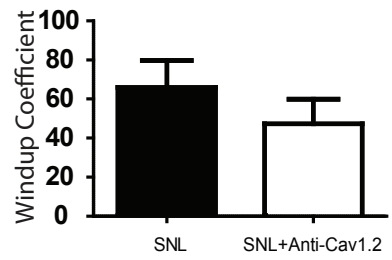
A2



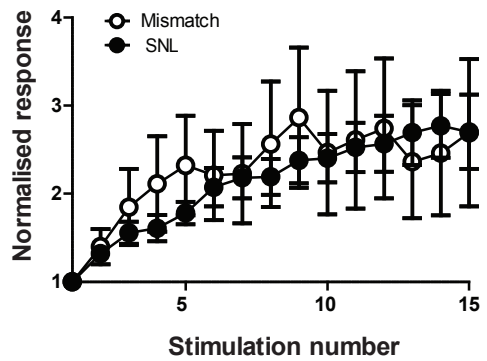
B1



B2



C1



C2

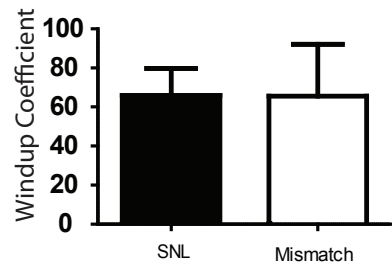


Figure 10 : Radwani et al.

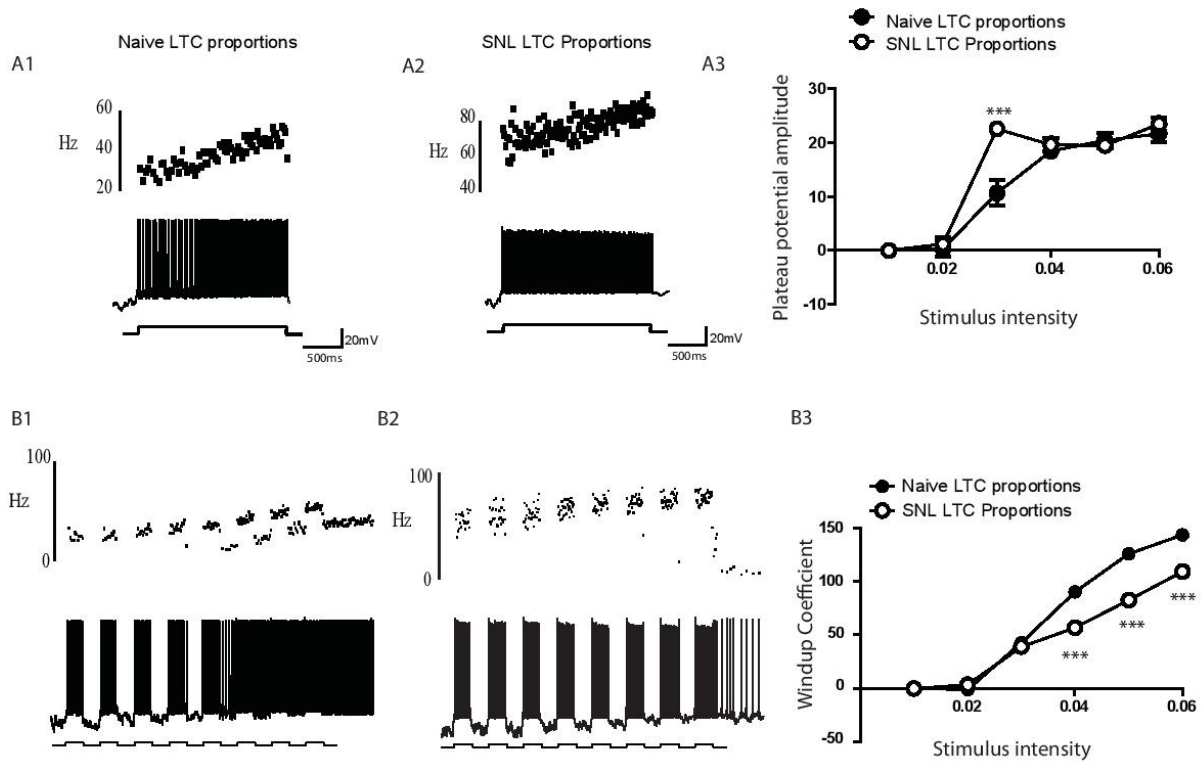


Figure 11 : Radwani et al.

