



**HAL**  
open science

# Protéine kinase C $\gamma$ et hypersensibilité mécanique trigéminale chez le rat

Nathalie Pham Dang

► **To cite this version:**

Nathalie Pham Dang. Protéine kinase C  $\gamma$  et hypersensibilité mécanique trigéminale chez le rat. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2014. Français. NNT : 2014CLF1MM27 . tel-02062594

**HAL Id: tel-02062594**

**<https://theses.hal.science/tel-02062594v1>**

Submitted on 9 Mar 2019

**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.

**UNIVERSITE D'AUVERGNE**

**ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE,  
ENVIRONNEMENT**

Année 2014

THESE n°

**THESE**

pour le

**DOCTORAT D'UNIVERSITÉ**

**Option : Neurosciences**

Soutenue le 19 Décembre 2014 par

**Nathalie PHAM DANG**

Née le 02/01/1979 à Beaumont (63)

**Protéine kinase C  $\gamma$  et hypersensibilité  
mécanique trigéminal chez le rat**

**Membres du Jury**

Mr Patrick GOUDOT	PU-PH, Université de Paris 6	Rapporteur
Mr Daniel VOISIN	PU, Université de Bordeaux II	Rapporteur
Mr Jean-Michel MONDIE	PU-PH, Université D'Auvergne	Examineur
Mr Alain ARTOLA	PU, Université D'Auvergne	Directeur

**REMERCIEMENTS**

*Chers Maîtres et chers membres du jury de thèse, je tiens à vous remercier pour avoir accepté de juger ce travail : Monsieur le Professeur Daniel Voisin et Monsieur le Professeur Patrick Goudot qui avez accepté d'en être les rapporteurs, Monsieur le Professeur Jean-Michel Mondié qui avez accepté de le relire et Monsieur le Professeur Alain Artola pour avoir su encadrer ce travail au cours des quatre dernières années.*

*Monsieur le Professeur Radhouane Dallel, c'est avec grand respect et reconnaissance que je tiens à vous remercier pour m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire et m'avoir formé à la recherche, en espérant que ceci pourra perdurer encore de nombreuses années. Vous avez su m'accorder du temps et faire cohabiter la recherche fondamentale avec le clinicien que je suis.*

*Monsieur le Professeur Alain Artola, votre aide fut inestimable dans l'explication et la rédaction du travail. Ce fut un plaisir de travailler à vos côtés pendant ces années, votre esprit de critique et de synthèse est un pilier pour la recherche. Vos connaissances des voies de la douleur semblent sans limites.*

*Monsieur le Professeur Daniel Voisin, votre connaissance dans le domaine de la neurosciences et plus particulièrement dans la douleur chronique ont permis de produire de multiples travaux permettant d'augmenter grandement les connaissances dans ce domaine.*

*Monsieur le Professeur Patrick Goudot, vous avez accepté de revenir sur les terres clermontoises pour juger un travail très éloigné de la clinique. Votre prestance et votre passion dans la défense de la chirurgie Maxillo-Faciale et Stomatologie sur la scène française et internationale sont un exemple pour nous jeunes médecins. Notre spécialité ne*

*peux exister qu'en s'associant aux technologies innovantes afin de rendre nos gestes plus précis et offrir à nos patients l'excellence.*

*Monsieur le Professeur Jean-Michel Mondié, voilà plus d'une décennie que j'apprends à vos côtés la chirurgie Maxillo-faciale et la Stomatologie mais également le respect et l'écoute des patients. Vous avez su m'enseigner que le patient ne se résume pas à un corps malade mais est un Homme à part entière et qu'il mérite une grande attention malgré le peu de temps qu'on arrive à lui accorder. Je vous adresse toute ma gratitude pour le temps que vous avez su m'accorder.*

*Monsieur le Professeur Philippe Luccarini, vos points de vue bien tranchés sur tout, votre bonne humeur ainsi que votre connaissance quasi illimitée sur les méandres du cerveau me rappellent chaque jour qu'on peut allier recherche fondamentale et réalité du quotidien avec beaucoup d'humour.*

*Chère Amélie, merci pour le temps et la patience que tu as consacrés. Tu as su m'apprendre l'étude comportementale, l'injection intra-cisternale et l'immuno-histochimie. Tes contrôles réguliers concernant la qualité des protocoles et leur mise en application ainsi que les coups de pouces pour accélérer les manips m'ont permis de rendre un travail de qualité en limitant au maximum les biais.*

*Chère Anne-Marie, tu excelles aussi bien dans la gestion administrative du labo que dans le désamorçage des petites contrariétés en magnant avec tact, humour et gentillesse. Ton énergie et ta rigueur sont un véritable atout.*

*Cher Jean-Louis, merci pour ton calme, ta bonne humeur et ton côté « Géo trouve tout » pour remplacer une pièce cassée ou réparer un engrenage grippé.*

*Chère Lénaïc, ton pragmatisme, ta connaissance, ton humour et ton intérêt pour les contrées lointaines tout en gérant une vie de famille bien remplie sont un exemple pour moi.*

*Un grand merci à tous les étudiants chercheurs devenus entre temps Docteurs en Science, Nelly, Florian, Céline et Khaled ainsi qu'à Sudi pour leur bonne humeur. Merci à tous les autres membres du labo, Karine, Myriam... que j'ai moins eu le temps de côtoyer mais qui ont toujours su être disponibles et aimables. Merci à Nadwa pour nos longues discussions sur le monde, les différences culturelles et les stéréotypes, cela m'a été très enrichissant, j'espère que cette amitié pourra se prolonger malgré les distances géographiques. Un clin d'œil à Laurent et Christophe, rares esprits encore cliniciens dans ce monde de fondamentalistes.*

*Un grand merci au service de chirurgie Maxillo-Faciale, avec à sa tête le Professeur Isabelle Barthélémy qui a su dégager très tôt du temps dans mon programme pour que je puisse « faire de la recherche », à mes collègues Aurore, Maxime, Candice, Myriam, Sophie et Mme Beaujard qui se demandent toujours pourquoi je vais opérer des rats alors que j'opère déjà les Hommes. Aux internes et externes dont la jeunesse et la curiosité permanente me donnent envie de chercher toujours plus pour ne pas sombrer dans la routine d'un quotidien sans rêve.*

*Un grand merci à mes parents, mon frère et à toute ma famille pour leur soutien dans cette grande aventure, mais avec tous ces docteurs en médecine et d'université presque que ce nouveau diplôme passerait inaperçu!! Un grand merci pour me montrer chaque jour la beauté de la vie, la chance de vivre dans une famille soudée et aimante.*

*Un grand merci à mon Loïc qui me soutient tous les jours, qui partage avec moi les joies et les frustrations d'un parcours universitaire long et sinueux, et qui surtout est le seul à comprendre tout le temps et l'énergie investie dans ce long processus. Un gros bisou à celui ou celle qui est en cours de préparation.*

**LISTE DES ABREVIATIONS**

AMPA :	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ASICs:	Acid-Sensing Ion Channels, canaux sensibles à l'acidité extracellulaire
ATM :	articulation temporo-mandibulaire
ATP :	Adenosine-5-triphosphate
BDNF :	brain-derived neurotrophic factor
Cav :	canaux calciques voltage dépendants
CFA :	Complete Freund's Adjuvant
CGRP :	calcitonin gene-related peptide
CIDN :	contrôles inhibiteurs diffus nociceptifs
CNQX :	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione, antagoniste spécifique des récepteurs AMPA/kainate
Couche IIe:	couche II externe
Couche Ili :	couche II interne
Couche IIIe:	couche III externe
Couche IIIi:	couche III interne
CTb :	Cholera Toxin B subunit, sous-unité B de la toxine du choléra
DAG :	diacylglycérol
DAMGO :	D-Ala, N-MePhe, Gly-ol-enkephalin / enképhaline agoniste spécifique des récepteurs opioïdes $\mu$
D-AP5 :	D(-)-2-Amino-5-phosphonovaleric acid, antagoniste spécifique des récepteurs NMDA
DEG/ENaC:	degenerin/epithelial sodium channels, dégénélerine/canal sodium épithéliale
ERK :	extracellular signal-regulated signal
GAD :	glutamic acid decarboxylase
GDNF :	Glial-cell Derived Neurotrophic Factor
GFAP :	glial fibrillary acid protein
GFP :	green fluorescent protein / protéine fluorescente verte
GTP :	Guanosine Triphosphate
IASP :	International Association for the Study of Pain
Il-1 $\beta$ :	interleukine

IP3 :	inositol-1,4,5-triphosphate
KCC2 :	co-transporteur membranaire K <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup>
KD :	kilodalton
LTD :	long-term depression / dépression à long-terme
LTMR :	low threshold mechanoreceptive , mécano-récepteurs de bas seuil
LTP :	long-term potentiation / potentialisation à long-terme
MAPK :	mitogen-activated protein kinase
MesV :	noyau mésencéphalique du trijumeau
mGluR :	G-protein coupled metabotropic
mRNA :	Messenger Ribonucleic acid
MSCs :	mechanosensitive ion channels, canaux ioniques mécanosensibles
Na <sub>v</sub> :	voltage-dependent sodium channel, canaux sodiques voltages dépendants
Neurone NS:	neurone nociceptif spécifique
NF :	neurofilament
NGF :	Nerve Growth Factor
NK1 :	neurokinine 1
NMDA :	N-methyl-D-aspartate
nNOS :	neuronal Nitric Oxyde Synthase
NO:	oxyde nitric
NPY :	Neuropeptide Y
NS :	neurones nociceptifs spécifiques
P2X3 R :	récepteurs P2X3
PAG :	Substance grise périaqueducule, Periaqueductal gray
PC :	phosphatidyl choline
pERK :	ERK phosphorylé
PI :	phosphatidylinositol
PI3K :	phosphoinositide 3-kinase
PIP :	phosphatidylinositol-4-phosphate
PIP2 :	phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PKA :	protéine kinase A
PKC :	protéine kinase C
PKC $\gamma$ :	protéine kinase C $\gamma$
PLA2 :	phospholipase A2

PLC :	phospholipas C
PLD :	phospholipase D
PO :	noyau postérieur du thalamus
Pr5 :	noyau principal
RAM :	rapidly adapting mechanorecepteurs
RVM :	région bulbaire ventre-médiane, rostral ventro-médiale médulle
SAM :	slow adapting mechanoreceptor
SLP :	stomatin-like protein, protéines stomatin-like
SNC :	système nerveux central
SNP :	système nerveux périphérique
SP :	Substance P
Sp5 :	noyau spinal
Sp5C :	sous-noyau caudal ou caudalis
Sp5I :	sous-noyau interpolaire ou interpolaris
Sp5O :	sous-noyau oral ou oralis
TENS :	transcutaneous electrical nerve stimulation ou neurostimulation transcutanée nerveuse
TPA :	12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate
TrkA :	Receptor tyrosine kinase A, récepteur tyrosine kinase à haute affinité
TRP :	Transient Receptor Potential
TRP :	temperature-activated transient receptor potential ion channel ou Transient Receptor Potential
TRPA1 :	Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1
TRPM8:	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8
TRPV1 :	transient receptor potential vanilloïd1, receptor potential vanilloïd 1
TTXr :	tetrodotoxine-resistant
TTXs :	tetrodotoxine-sensible
VEGF :	vascular endothelial growth factor
VGAT :	vesicular GABA transporter
VGLUT2 :	vesicular glutamate transporter
VIP :	Vasoactive Intestinal Peptid
VPL :	ventro-postérieur-latéral
VPM :	noyau ventro-postérieur-médian du thalamus



WDR neurons wide dynamic range neuron, neurones à convergence

**TABLE DES MATIERES**

CHAPITRE I : INTRODUCTION GENERALE	13
1. LA DOULEUR	14
1.1. DEFINITION DE LA DOULEUR	14
1.2. LA DOULEUR OU PLUTOT LES DOULEURS	15
1.2.1. CLASSIFICATION DES DOULEURS EN FONCTION LEURS ORIGINES	16
1.2.1.1. La douleur « adaptée »	16
1.2.1.2. Les douleurs « adaptatives » et les douleurs « inadaptées »	16
1.2.1.2.1. La douleur inflammatoire	17
1.2.1.2.2. La douleur neuropathique	17
1.2.1.2.3. La douleur dysfonctionnelle ou idiopathique	18
1.2.2. DOULEUR AIGUE ET DOULEUR CHRONIQUE	18
1.2.2.1. La douleur aiguë	18
1.2.2.2. La douleur chronique	18
2. SOMESTHESIE ORO-FACIALE	19
2.1. RECEPTEURS ET MODALITES SOMESTHESIQUES DU NERF TRIJUMEAU	20
2.1.1. L'INNERVATION SENSITIVE ORO-CRANIO-FACIALE ASSUREE MAJORITAIREMMENT PAR UN NERF	20
2.1.2. UNE GRANDE VARIETE DE RECEPTEURS POUR UN SEUL NERF	21
2.1.3. LES MECANORECEPTEURS CUTANES ET LA SENSIBILITE MECANIQUE CUTANEE	22
2.1.4. LA SENSIBILITE THERMIQUE	23
2.1.5. LES NOCICEPTEURS	26
2.1.5.1. Caractéristiques électrophysiologiques	26
2.1.5.2. Caractéristiques moléculaires et neuroanatomiques	27
2.2. LES AFFERENCES PRIMAIRES ET LEURS MODALITES SENSORIELLES	28
2.2.1. LES NEURONES PSEUDO-UNIPOLAIRES	28
2.2.2. LES DIFFERENTES FIBRES	29
2.3. LE COMPLEXE SENSITIF DU TRIJUMEAU	30
2.4. LES VOIES ASCENDANTES	33
3. PARTICULARITES DE LA SENSIBILITE ORO-CRANIO-FACIALE	36
3.1. L'ORIGINE EMBRYOLOGIQUE	36
3.2. UNE PROPORTION DE FIBRES AFFERENTES DIFFERENTES	36
3.3. LES TISSUS MUQUEUX	37
3.4. LA CORNEE ET LA CONJONCTIVE	37
3.5. L'INNERVATION DES STRUCTURES INTRACRANIENNES	38
3.6. LA DENT	38
3.7. LES OS DE LA FACE	39
3.8. LE NOYAU MESENCEPHALIQUE DU TRIJUMEAU	40
3.9. L'ARTICULATION TEMPORO-MANDIBULAIRE	41
3.10. LA SOMATOTOPIE DANS LES TROIS PLANS DE L'ESPACE	41

4. LE SOUS-NOYAU CAUDAL	42
4.1. UNE STRUCTURE LAMINAIRE	42
4.1.1. LES COUCHES DU SOUS-NOYAU CAUDAL	42
4.1.2. LES INTERNEURONES	43
4.1.3. CARACTERISTIQUES FONCTIONNELLES DES NEURONES	44
4.2. PROJECTIONS DES AFFERENCES PRIMAIRES	45
4.3. LES NEURONES DE PROJECTION	46
5. CONTROLE DE LA DOULEUR	47
5.1. CONTROLE SEGMENTAIRE : LA THEORIE DU « PORTILLON » ET L'ANALGESIE MORPHINIQUE	47
5.2. LES CONTROLES INHIBITEURS DIFFUS INDUITS PAR STIMULATION NOCICEPTIVE (CIDN)	48
5.3. LES VOIES DESCENDANTES	48
6. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DOULEUR	49
6.1. LA SENSIBILISATION PERIPHERIQUE	49
6.2. LA SENSIBILISATION CENTRALE	51
6.2.1. LA SENSIBILISATION GLUTAMATERGIQUE	51
6.2.1.1. La potentialisation à long-terme	51
6.2.1.2. La plasticité intrinsèque	52
6.2.1.3. Le rôle des interactions entre la glie et les neurones	53
6.2.2. LA DESINHIBITION GABAERGIQUE ET GLYCINERGIQUE	54
6.2.3. ALTERATION DES VOIES DESCENDANTES DE MODULATION DE LA DOULEUR	55
7. MECANISMES DE LA DOULEUR TRIGEMINALE	56
7.1. LES MECANISMES DE LA DOULEUR NEUROPATHIQUE	57
7.1.1. LES MECANISMES PERIPHERIQUES	57
7.1.1.1. Présence d'activités électriques ectopiques	57
7.1.1.2. La sensibilisation des récepteurs nociceptifs	58
7.1.1.3. Rôle de la glie	59
7.1.1.4. Présence de connections anormales entre les fibres	60
7.1.2. LES MECANISMES CENTRAUX DE LA DOULEUR NEUROPATHIQUE ORO-FACIALE	60
7.1.2.1. La sensibilisation centrale	60
7.1.2.2. Les modifications histologiques	61
7.1.2.3. L'altération des systèmes de modulation	62
7.1.2.4. Le rôle de la glie dans les mécanismes de la nociception centrale	62
7.2. LES MECANISMES DE LA DOULEUR CHRONIQUE INFLAMMATOIRE	65
7.2.1. MECANISMES PERIPHERIQUES	65
7.2.2. LES MECANISMES CENTRAUX DE LA DOULEUR INFLAMMATOIRE	69
7.2.2.1. Au niveau du sous-noyau caudal	69
7.2.2.2. Extension de la sensibilisation du sous-noyau caudal au sous-noyau	

oral et au thalamus	70
7.2.2.3. Altération des voies de modulation	70
7.2.2.4. Implication de la glie, la neuroinflammation	71
8. L'ALLODYNIE	74
8.1. DEFINITION	74
8.2. DIFFERENCES DE MECANISMES ENTRE L'ALLODYNIE STATIQUE ET MECANIQUE	74
8.3. ROLE DES FIBRES A $\beta$	76
8.3.1. CHANGEMENT DE PHENOTYPE DES FIBRES A $\beta$	76
8.3.2. CROISSANCE DES FIBRES A $\beta$	77
8.3.3. L'ACTIVATION DE VOIES POLYSYNAPTIQUES HABITUELLEMENT SILENCIEUSES	78
8.3.3.1. Désinhibition des voies GABA- et glycinergiques	78
8.3.3.2. Inhibition d'une voie glutamatergique, implication des récepteurs NMDA et des récepteurs AMPA/kainate	79
8.3.3.3. Implication des astrocytes et de la D-sérine dans le circuit de l'allodynie mécanique	79
8.3.3.4. Implication des neurones NK1- de la couche I	80
8.3.3.5. Implication des interneurons PKC $\gamma$ dans les couches II et IIIo	80
9. LA PROTEINE KINASE C $\gamma$	81
9.1. CLASSIFICATION DES PKCs	81
9.2. LES VOIES D'ACTIVATION DES PKCs	84
9.2.1. LA VOIE DES PHOSPHOLIPASES C	84
9.2.2. LA VOIE DES PHOSPHOLIPASES D	84
9.2.3. LA VOIE DES PHOSPHOLIPASES A2	84
9.2.4. PHOSPHORYLATION DES PKCs ET ROLE DE LA PROTEINE D'ANCRAGE	85
9.3. LA PKC $\gamma$	85
9.3.1. DONNEES GENERALES	85
9.3.2. ROLE REGULATEUR DANS LA PLASTICITE NEURONALE	86
9.3.3. AUCUN ROLE DANS LA DOULEUR AIGUE	87
9.3.4. ROLE DANS LA SENSIBILISATION SECONDAIRE ET LA DOULEUR CHRONIQUE	87
9.3.5. LA TRANSLOCATION DE PKC $\gamma$ S'ACCOMPAGNE UNE HYPERACTIVITE DES COURANTS NMDA	88
9.3.6. IMPLICATION DE PKC $\gamma$ DANS LA DOULEUR INFLAMMATOIRE	89
9.3.7. IMPLICATION DE PKC $\gamma$ DANS LA DOULEUR NEUROPATHIQUE	89
9.3.8. PKC $\gamma$ ET ALLODYNIE MECANIQUE NEUROPATHIQUE	90
9.3.9. PKC $\gamma$ ET ALLODYNIE MECANIQUE PROVOQUEE PAR UNE DESINHIBITION GLYCINERGIQUE	90
OBJECTIF DU TRAVAIL	92
CHAPITRE II :	94
L'ALLODYNIE MECANIQUE STATIQUE ET L'ALLODYNIE DYNAMIQUE	

DANS LE TERRITOIRE DU NERF TRIJUMEAU INDUITES PAR  
L'ACTIVATION DIRECTE DES INTERNEURONES PKC $\gamma$  DU CAUDALIS

CHAPITRE III :	123
LES INTERNEURONES PKC $\gamma$ SONT IMPLIQUES DANS L'INITIATION MAIS PAS LE MAINTIEN DE L'ALLODYNIE MECANIQUE STATIQUE DANS UN MODELE DE RAT PRESENTANT UNE DOULEUR INFLAMMATOIRE ORO- FACIALE PERSISTANTE	
CHAPITRE IV :	155
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION	
1. DISCUSSION	156
2. IMPLICATION CLINIQUE	163
3. CONCLUSION	164
REFERENCES	165
RESUME	179

## CHAPITRE I : INTRODUCTION GENERALE

« - *Qu'est-ce que vous faites, en ce moment ?*

- *Je souffre.* »

Alphonse Daudet, La Doulou

## 1. LA DOULEUR

Compagne de l'Homme depuis son origine, la douleur participe à la construction de l'histoire de la médecine. Dans les manuscrits les plus anciens, chez la femme la douleur est liée à l'accouchement et chez l'homme, elle est due aux blessures de guerre. Par ses différentes interprétations culturelles, philosophiques et religieuses, la prise en charge de la douleur est marquée par des avancées brutales, des ruptures ou des dénis, suscitant, au fil des époques et des cultures, des réactions émotionnelles et médicales contrastées. Étonnamment, alors que Dieu fût le premier à prendre en charge la douleur en endormant généreusement Adam avant de lui prélever la fameuse côte, le droit à l'anesthésie n'est accepté que très tardivement pour l'Homme.

### 1.1. DEFINITION DE LA DOULEUR

La douleur est définie par l'Association Internationale pour l'Etude de la Douleur (International Association for Study of Pain, IASP) comme une «expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à un dommage corporel réel ou potentiel ou bien décrite en de tels termes ». L'expérience sensorielle dite sensori-discriminative, consiste en la détection du stimulus et à l'analyse de son intensité. L'expérience émotionnelle entre dans le cadre de l'affectif et exprime le caractère pénible de la douleur. La douleur en devient subjective : elle n'est pas un stimulus mais un ressenti. Qu'un stimulus donné soit perçu comme douloureux ou non, dépend de sa nature, de l'état physiologique, émotionnel, cognitif et de l'expérience du sujet qui reçoit ce stimulus (Merskey et Bogduk, 1994). Il n'existe pas de « voies spécifiques de la douleur ». De ce fait, Douleur et Nociception sont deux termes différents souvent considérés à tort comme synonymes.

Il apparaît alors intéressant de rappeler la définition de certains termes tels que nociception, perception, sensation et réponse qui constituent les différentes composantes de la douleur.

- la nociception :

Sherrington a développé le concept de stimulus nociceptif en 1906 (Sherrington, 1906). Ces stimuli ont en commun de menacer l'intégrité du corps et d'activer un ensemble d'organes sensoriels spécifiques : les nocicepteurs. Le terme nociception, employé par Sherrington au début du XXème siècle, caractérise un stimulus dont l'intensité entraîne des réactions de défense visant à sauvegarder l'intégrité de l'organisme. Ceci ne fait pas intervenir la nature consciente de la douleur.

- la perception :

Elle est définie dans le Larousse comme un « événement cognitif dans lequel un stimulus ou un objet, présent dans l'environnement immédiat d'un individu, lui est représenté dans son activité psychologique interne, en principe de façon consciente ». La perception douloureuse fait intervenir la cognition. Elle met en jeu des systèmes tels qu'attention, anticipation ou mémoire. Le stimulus nociceptif peut cependant être dissocié d'une perception douloureuse ; on peut, par exemple, s'entailler un doigt mais être trop concentré sur une autre activité pour le percevoir.

- la sensation :

Elle est définie par le Larousse comme un « état psychologique découlant des impressions reçues et à prédominance affective ou physiologique ». La sensation de la douleur là encore est subjective. De plus elle peut être déclenchée par une émotion forte en l'absence de toute stimulation nociceptive.

- la réaction :

Elle fait intervenir la composante comportementale qui met en jeu de multiples réactions motrices (frottement de la zone douloureuse), verbales (cris), végétatives (malaise, nausées, tachycardies), sociales (auto-médication, refus de travailler, évitement). Chez l'animal seule l'observation des réactions est possible. On suppose qu'elles expriment la perception de sensations désagréables en réponse à l'activation des nocicepteurs.

## 1.2. LA DOULEUR OU PLUTOT LES DOULEURS

La douleur est essentielle à la survie car elle joue un rôle d'alerte. A tort, elle a pu être considérée comme une entité sensorielle homogène. Actuellement, elle est décrite en fonction de ses caractéristiques temporelles (prolongée, continue, intermittente), de sa durée (douleur aiguë, douleur chronique), de sa qualité (pulsatile, brûlure, pique, décharge électrique, crampe), de son intensité, de sa localisation (localisée, généralisée, projetée) ou de son caractère spontané ou provoqué.

La douleur peut être classée en fonction de son origine ou en fonction de son caractère aiguë ou chronique.

### 1.2.1. CLASSIFICATION DES DOULEURS EN FONCTION DE LEURS ORIGINES

#### 1.2.1.1. La douleur « adaptée »



Elle est également appelée douleur « nociceptive ». Elle est déclenchée par la stimulation des fibres nociceptives telles que certaines fibres C amyélinisées et certaines fibres A $\delta$  peu myélinisées. Ces afférences primaires sont activées par des stimuli mécaniques, thermiques et chimiques de haute intensité (Woolf et al., 2007).

La douleur nociceptive contribue à la survie par le signal d'alarme qu'elle déclenche. Sa finalité est d'induire des réactions pour diminuer la cause de la douleur et par la suite ses conséquences. La douleur nociceptive apparaît donc en réponse à un stimulus nocif et cesse si ce stimulus s'arrête. C'est une douleur informative.

#### 1.2.1.2. Les douleurs « adaptatives » et les douleurs « inadaptées »

Elles sont l'expression d'une modification du système nerveux. Elles concernent trois types de douleurs : inflammatoire, neuropathique et fonctionnelle avec des mécanismes et des symptômes qui peuvent être communs. Elles se caractérisent par une modification de la sensibilité aux stimuli avec une réduction des seuils douloureux, une diffusion spatiale et une sommation temporelle. Contrairement à la douleur « adaptée » qui n'apparaît que pour des douleurs intenses au-dessus du seuil nociceptif, ces douleurs peuvent être déclenchées par des stimuli de faible intensité qui, dans les conditions physiologiques, sont peu ou pas perçus comme douloureux. Ceci définit l'hyperalgésie (sensation douloureuse ressentie de manière accrue pour un stimulus au-dessus du seuil nociceptif) et l'allodynie (douleur produite par un stimulus normalement non nociceptif). Lorsque la réponse excessive apparaît au niveau de la zone lésée, on parle d'allodynie et d'hyperalgésie primaire. Du fait d'un accroissement du champ de réception neuronal à la périphérie de la zone lésée, des tissus non lésés participent à la génération d'une sensation douloureuse, on parle alors d'allodynie et d'hyperalgésie secondaire. Ces symptômes sont la conséquence de phénomènes de sensibilisations et s'accroissent avec le temps, d'où l'importance de traiter efficacement la douleur le plus tôt possible afin d'éviter sa prolongation puis sa chronicisation (Juhl et al., 2008). De plus, dans certaines situations cliniques (cancer, lésions nerveuses, neuropathie, lombosciatique...), les douleurs neuropathiques et inflammatoires coexistent, on parle de douleur « mixte » (Attal et al., 2011). Par exemple, une fracture de l'angle mandibulaire, entraîne aussi bien une réaction inflammatoire locale qu'une lésion nerveuse.

##### 1.2.1.2.1. La douleur inflammatoire

Elle apparaît en réponse à une lésion tissulaire et aux médiateurs de l'inflammation qui sont libérés localement. C'est une douleur par excès de nociception. Elle est non plus

informative mais adaptative ; son rôle n'est plus d'informer l'organisme d'une potentielle lésion mais de modifier le comportement pour protéger la région lésée. Pour faciliter la cicatrisation, l'organisme doit limiter de nouveaux traumatismes. Ainsi le système nerveux sensitif se modifie et initie une hyperexcitabilité (sensibilisation), périphérique et/ou centrale, responsable de l'allodynie et de l'hyperalgésie (Juhl et al., 2008, Vardeh et al., 2009). La finalité est d'éviter de stimuler la zone lésée et son pourtour, même à minima, pour permettre la cicatrisation. La douleur inflammatoire régresse avec la disparition du processus inflammatoire sauf dans les cas de maladies inflammatoires chroniques, telle la polyarthrite rhumatoïde, où elle devient une douleur « inadaptée » (Michaud et al., 2007). La douleur inflammatoire est habituellement bien contrôlée par les antalgiques de pallier 1 à 3 ou les anti-inflammatoires non stéroïdiens ou une corticothérapie (Bouhassira et Attal, 2007).

#### 1.2.1.2.2. La douleur neuropathique

La douleur neuropathique est secondaire à des lésions du système nerveux périphérique ou central. Ces douleurs apparaissent dans la zone de désafférentation c'est-à-dire dans le territoire d'innervation de la lésion. Le paradoxe de ce type de lésion est d'associer des symptômes déficitaires (diminution ou perte de la sensibilité) à des symptômes positifs spontanés ou évoqués (allodynie, hyperalgésie, paresthésies, dysesthésies). La douleur neuropathique liée à une lésion du système nerveux périphérique peut être secondaire à une lésion mécanique (compression ou étirement nerveux lors d'une fracture, section de fibres nerveuses lors d'une chirurgie), à une maladie métabolique (diabète), à des substances neurotoxiques (chimiothérapies : vincristine, taxotère...), à des pathologies infectieuses (zona) ou tumorales. Elle implique de multiples modifications physiopathologiques du système nerveux central et périphérique (Dworkin et al., 2003). La douleur neuropathique liée à une lésion du système nerveux central se rencontre lors de lésions de la moelle épinière (para- ou tétraplégiques), après un accident vasculaire cérébral, lors d'une sclérose en plaque ou de la maladie de Parkinson (Dworkin et al., 2003). Actuellement, les traitements utilisés contre ce type de douleur allient des antidépresseurs tricycliques, des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine, des anti-épileptiques (gabapentine et gabaline) et des antalgiques de paliers 2 et 3 (tramadol et opiacés) ainsi que des patchs à la lidocaïne (Dworkin et al., 2003, Baron et al., 2010) mais avec des résultats insatisfaisants. L'efficacité de ce traitement est limité par des effets indésirables majeurs (sommolence, troubles mnésiques, nausées, constipations...) et la nécessité d'une surveillance rapprochée pour les patients avec une

insuffisance rénale ou hépatique, des antécédents cardiaques ou des troubles de l'humeur (Baron et al., 2010).

#### 1.2.1.2.3. La douleur dysfonctionnelle ou idiopathique.

La douleur idiopathique est une douleur inadaptée dans le sens qu'elle n'a aucun rôle d'information ou de protection. Elle résulte d'un dysfonctionnement du système somato-sensoriel qui peut être considéré comme une pathologie à part entière. La douleur idiopathique survient alors qu'aucun stimulus nociceptif, aucune réaction inflammatoire, aucune lésion nerveuse n'a été constatée. A ce jour, elle est présente dans la fibromyalgie, le syndrome de l'intestin irritable et les céphalées. Dans les cas de l'intestin irritable et de la fibromyalgie, la douleur semble liée à une amplification autonome des signaux nociceptifs au niveau du système nerveux central avec un déséquilibre entre les contrôles descendants excitateurs et inhibiteurs mais sans en connaître le déclencheur initial (*Feng et al., 2009*). Pour traiter ce type de douleur, les antidépresseurs, antiépileptiques et antalgiques de paliers 2 et 3 sont proposés (Bouhassira et Attal, 2007) mais avec peu d'efficacité.

### 1.2.2. DOULEUR AIGUE ET DOULEUR CHRONIQUE

#### 1.2.2.1. La douleur aigue

La douleur aigue, est un phénomène transitoire. Elle est considérée comme un signal d'alarme qui protège l'organisme contre une lésion potentielle. Elle entraîne une modification comportementale avec une réaction de retrait pour éviter la lésion puis une réaction d'évitement pour ne pas se retrouver dans la même situation (*Woolf et Ma, 2007*). La douleur aigue peut être considérée comme un symptôme qui régresse une fois que le stimulus nociceptif a disparu ou que la lésion a cicatrisé.

#### 1.2.2.2. La douleur chronique

La douleur chronique a été définie en 1994 par l'IASP comme « une douleur qui persiste au-delà du délai normal de cicatrisation. En dehors d'une douleur cancéreuse, 3 mois est considéré comme le point de bascule entre douleur aigue et douleur chronique, mais dans le cadre de la recherche un délai supérieur à 6 mois est préféré » (*Merskey et Bogduk, 1994*). Cette définition conceptuelle n'a pas pour autant permis de mettre au point des méthodes fiables et valables pour distinguer la douleur aigue et chronique dans les études épidémiologiques et la recherche clinique (*Von Korff et al., 2008*).

La douleur perdure alors que le stimulus nociceptif a disparu, que la cicatrisation est terminée et que le traitement symptomatologique et étiologique a été bien mené. Dans ce contexte, la douleur a perdu toute valeur protectrice. On parle alors plutôt de « syndrome » douloureux, mettant en avant le caractère multifactoriel de la douleur chronique avec ses manifestations physiques, psychologiques, comportementales et sociales. La douleur chronique est une « maladie en soi » : ce syndrome peut s'observer dans des situations extrêmement variées : migraines, lombalgies, affections neurologiques et douleurs psychogènes.

Douleurs aiguës, douleurs persistantes et douleurs chroniques réalisent un continuum tant sur le plan physiopathologique que clinique ou thérapeutique : la transition entre ces différents états ne doit pas être négligée : dans bien des circonstances, un traitement correct de la douleur aiguë permet d'éviter l'évolution vers un syndrome douloureux chronique (Juhl et al., 2008).

## 2. SOMESTHESIE ORO-FACIALE

(Voir Tale et Devor, 2008)

Le terme somesthésie désigne les sensations conscientes éveillées par la stimulation des tissus du corps, sensations qui ne sont ni visuelles, ni auditives, ni gustatives, ni olfactives. Elles sont provoquées par l'excitation de terminaisons nerveuses réceptrices de types variés, localisées dans le revêtement cutané et divers tissus plus profondément situés. Ces récepteurs sont sensibles à un certain nombre de stimuli spécifiques : proprioceptif, mécanique, thermique, douloureux.

Du fait de ses particularités anatomiques, la région oro-faciale fait l'objet d'un certain nombre de syndromes douloureux sans équivalence au niveau du reste du corps tels que la migraine, les douleurs dentaires, la stomatodynie, la névralgie trigéminalle essentielle, les algies vasculaires de la face, l'algie orofaciale idiopathique et les douleurs musculo-squelettiques de l'articulation temporo-mandibulaire (ATM) (Dallel et al., 2003). Ces particularités font que le système trigéminal doit être étudié de façon indépendante du reste du corps.

Nous allons présenter ci-dessous les récepteurs et modalités somesthésiques du nerf trijumeau, les particularités anatomiques oro-faciales et les voies de la douleur. Puis, nous verrons qu'en réalité la frontière entre la moelle et le complexe sensitif du trijumeau ne sont pas si franches.

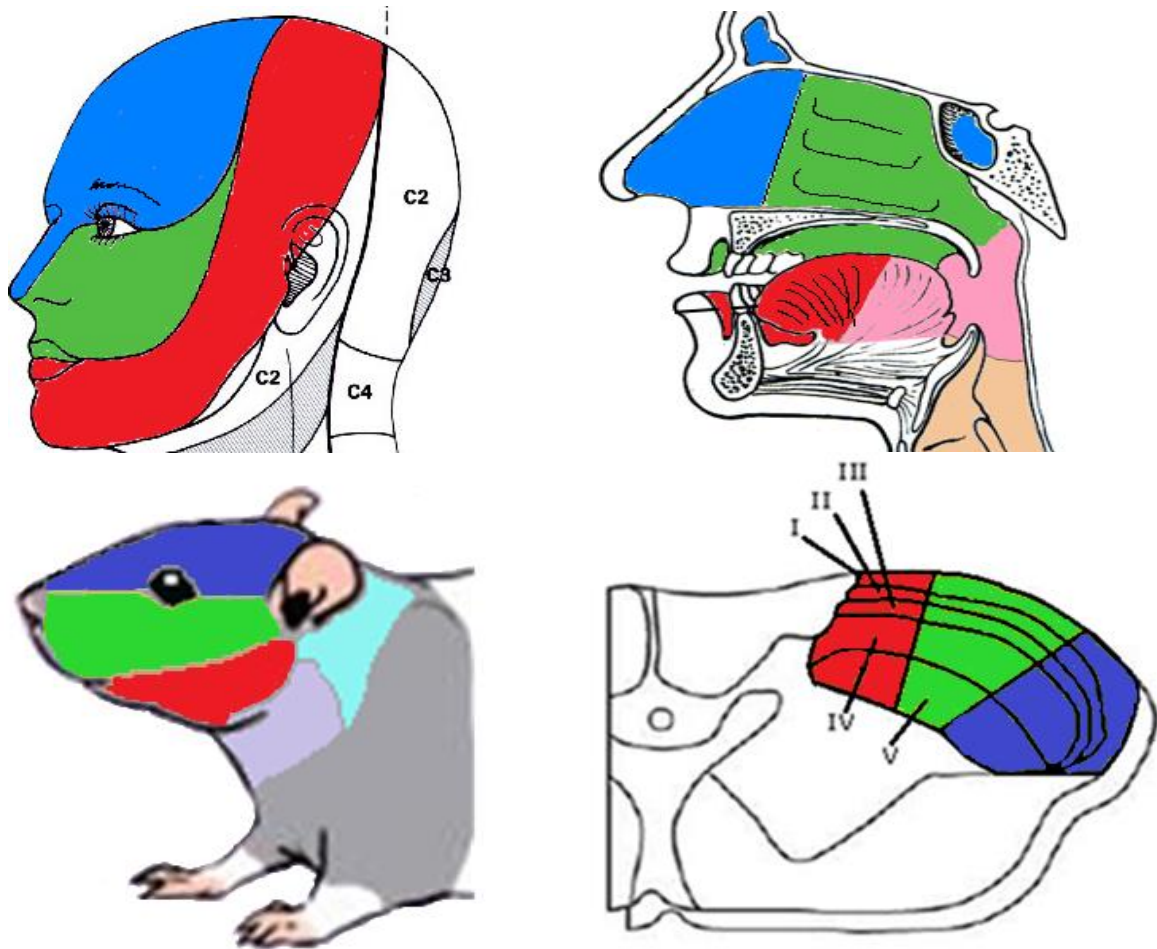
## 2.1. RECEPTEURS ET MODALITES SOMESTHESIQUES DU NERF TRIJUMEAU

### 2.1.1. L'INNERVATION SENSITIVE ORO-CRANIO-FACIALE ASSUREE MAJORITAIREMENT PAR UN NERF

L'innervation sensitive oro-cranio-faciale est assurée par différents nerfs crâniens. Le nerf facial VII avec sa composante VII bis, sert à la sensibilité gustative des 2/3 antérieurs de la langue. Le nerf glosso-pharyngien IX, sert entre autre à la sensibilité du pharynx et du 1/3 postérieur de la langue. Les racines sensibles de C1 et C2 innervent la partie postérieure et basse du scalp. Mais l'essentiel de l'innervation de l'extrémité céphalique se fait par le nerf trijumeau (**Figure 1**).

Le nerf trijumeau (V) est la cinquième paire crânienne. Il est mixte, principalement sensitif. Il est composé de 3 branches majeures qui se partagent l'ensemble du visage :

- La branche V1 ou nerf ophtalmique, qui chemine dans le toit de l'orbite pour aller innerver la conjonctive et la cornée, la région cutanée de la paupière supérieure et du front, le nez à l'exception des ailes nasaires, la muqueuse nasale et les méninges.
- La branche V2 ou nerf maxillaire supérieur, dont la terminaison chemine dans le canal infra-orbitaire puis sort par le foramen infra-orbitaire pour innerver la paupière inférieure, la joue, les narines, la lèvre supérieure, les dents et la gencive maxillaires, les muqueuses nasale et palatine et l'os maxillaire.
- La branche V3 ou nerf mandibulaire, qui donne deux branches sensibles : le nerf alvéolaire inférieur et le nerf lingual. Le premier chemine dans la mandibule dans le canal du nerf alvéolaire inférieur et sort au niveau du foramen mentonnier. Le second chemine dans le plancher buccal. La branche V3, par sa composante sensitive, innerve la peau de la région temporale postérieure, la partie antérieure du pavillon de l'oreille, le conduit auditif externe, la lèvre inférieure et le menton, ainsi que les 2/3 antérieurs de la langue, la muqueuse de la région mandibulaire et les dents mandibulaires. Par sa composante motrice, elle innerve les muscles élévateurs de la mandibule (masséter, temporal et ptérygoidien médial), le muscle mylo-hyoïdien, le ventre antérieur du muscle digastrique ainsi que les muscles tenseurs du voile et du tympan (Leston, 2009).



**Figure 1 : schéma de l'innervation céphalique et de la somatotopie du sous noyau caudal chez l'homme et le rat.** Représentation des territoires innervés par la branche mandibulaire (V3 ; rouge), maxillaire (V2, vert) et ophtalmique (V1, bleu) du nerf trijumeau. A : au niveau cutané chez l'homme, B : au niveau muqueux chez l'homme, C : au niveau cutané chez le rat, C : somatotopie retrouvée au niveau du sous-noyau caudal (Sp5C). Le Sp5C présente également une organisation laminaire, similaire à celle retrouvée dans la corne dorsale de la moelle épinière, avec des couches notées de I à la superficie à V en profondeur.

### 2.1.2. UNE GRANDE VARIETE DE RECEPTEURS POUR UN SEUL NERF

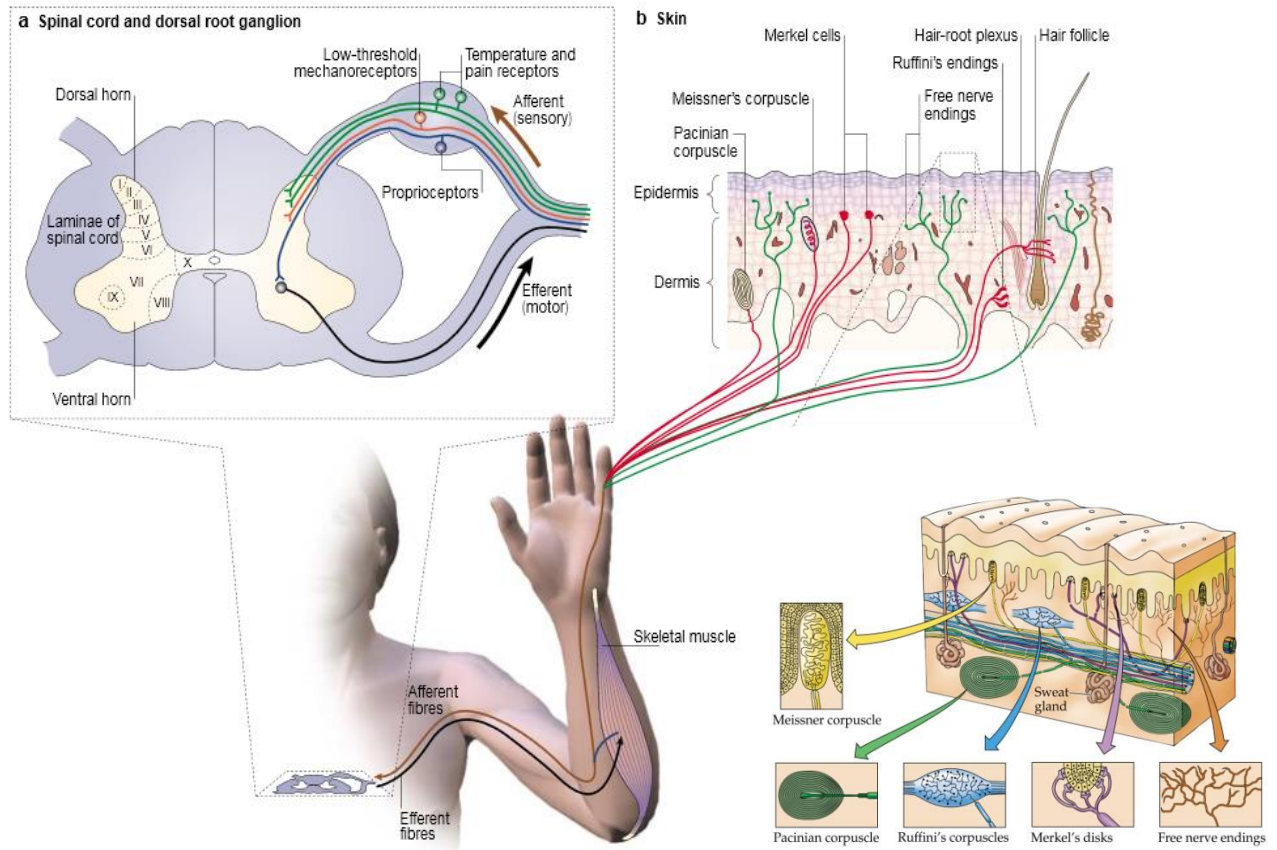
A la différence des nerfs sensitifs du reste du corps, le nerf trijumeau est amené à innerver des tissus très variés (pulpe dentaire, cornée, méninges, muqueuses, peau, articulation temporo-mandibulaire...), chacun ayant une sensibilité et une spécificité particulière. En effet, par exemple, les afférences sensorielles des muqueuses orales, nasales et de la cornée sont sensibles à des stimuli chimiques aéroportés, mécaniques et thermiques qui sont à l'origine même du développement et de la survie des espèces.

Alors que l'odorat est assuré par le nerf olfactif (I), les sensations de brûlures provoquées par l'inhalation de certains irritants tels que l'ammoniac ou le raifort sont liées à l'activation des chémo-nocicepteurs C du nerf trijumeau. La même distinction doit se faire entre le goût et la sensibilité au niveau de la cavité buccale. Le goût au niveau des 2/3 antérieurs de la langue est assuré par le nerf VII bis alors que le tact, le chaud, le froid et la douleur sont véhiculés par le nerf trijumeau. La sensation de brûlure associée au piment (capsaïcine), est médiée par les terminaisons nerveuses C du trijumeau.

### 2.1.3. LES MECANORECEPTEURS CUTANES ET LA SENSIBILITE MECANIQUE CUTANEE

Le tact est un sens complexe. Les stimulations qui s'y rapportent sont de nature très diverses (pression, frottement, piqure, vibration, coup, mobilisation des poils...) et activent des mécano-récepteurs de bas seuil: les récepteurs encapsulés. Ils se composent des corpuscules de Meissner, corpuscules de Pacini, disques de Merckel et corpuscules de Ruffini. Ils sont tous associés à des fibres A $\beta$  et se distinguent, entre autre, par leur vitesse de réponse à la stimulation. Ceux qui possèdent une vitesse de réponse rapide sont exclusivement sensibles aux mouvements ; ils sont appelés « rapidly adapting mechanorecepteurs » (RAM). A l'inverse, ceux qui ont une vitesse de réponse lente, réagissent aux stimuli statiques ; ils sont appelés « slow adapting mechanoreceptor » (SAM) (Lewin et Moshourab, 2004) **(Figure 2)**.

- les corpuscules de Meissner sont situés au niveau des papilles dermo-épidermiques au niveau de la peau glabre et préférentiellement au niveau de la pulpe des doigts. Ils sont sensibles à la vitesse d'établissement du stimulus tactile, à la pression dynamique et aux vibrations de basse fréquence (50 Hz). Ils sont de type RAM.
- les corpuscules de Pacini sont situés au niveau du tissu sous-cutané, des membranes inter-osseuses et des viscères. Ils sont sensibles à la pression profonde et aux vibrations de haute fréquence (environ 250 Hz) ; ce sont des récepteurs dynamiques de type RAM.
- les disques de Merckel se rencontrent au niveau cutané, plus spécifiquement au niveau des follicules pileux. Ils sont sensibles à la pression superficielle et localisée. Ce sont des récepteurs statiques de type SAM.
- les corpuscules de Ruffini se localisent également au niveau cutané et sont sensibles à l'étirement. Ils sont de type SAM.



**Figure 2 : les afférences primaires cutanées véhiculent les messages nociceptifs et non nociceptifs vers la corne dorsale de la moelle épinière.** a. les corps cellulaires des afférences primaires sont localisés dans les ganglions rachidiens. b. dans les ganglions rachidiens, on trouve un groupe de neurones sensitifs proprioceptifs (bleu), un groupe de neurones appelés mécanorécepteurs de bas seuil (rouge) et un groupe de neurones sensibles à la température et à la douleur (vert). Ces neurones projettent au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière entre les couches I à VI. b. Les afférences primaires cutanées se divisent en 5 groupes (corpuscules de Pacini, corpuscules de Meissener, disques de Merckel, corpuscules de Ruffini et terminaisons libres) (*d'après Patapoutian, 2003*).

#### 2.1.4. LA SENSIBILITE THERMIQUE

La sensibilité thermique correspond à la sensibilité au froid et au chaud. La sensation qui accompagne les changements de température dépend de la température cutanée initiale, de la vitesse de changement de température et de la surface stimulée. La zone de neutralité thermique chez l'homme se situe entre 33 et 35 °C, mais pour une surface inférieure à 15 cm<sup>2</sup>,

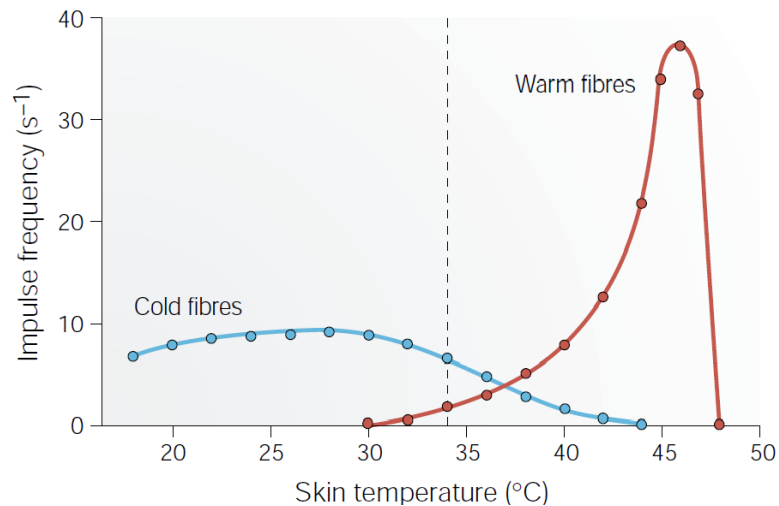


elle s'étend entre 30 et 36 °C. La sensation thermique devient véritablement douloureuse si la température cutanée est inférieure à 17 °C ou supérieure à 44 °C.

Au niveau de la peau, il existe des terminaisons nerveuses libres, proches des capillaires sanguins, sensibles au froid ou au chaud et portés par différents types de fibres. Par exemple, les récepteurs au froid sont superficiels, localisés dans l'épiderme et sont liés à des fibres myéliniques fines de type A $\delta$ . Les récepteurs au chaud sont plus profondément enfouis dans l'épiderme et sont liés à des fibres amyéliniques de type C. Les fibres afférentes provenant des thermorécepteurs présentent les caractéristiques suivantes :

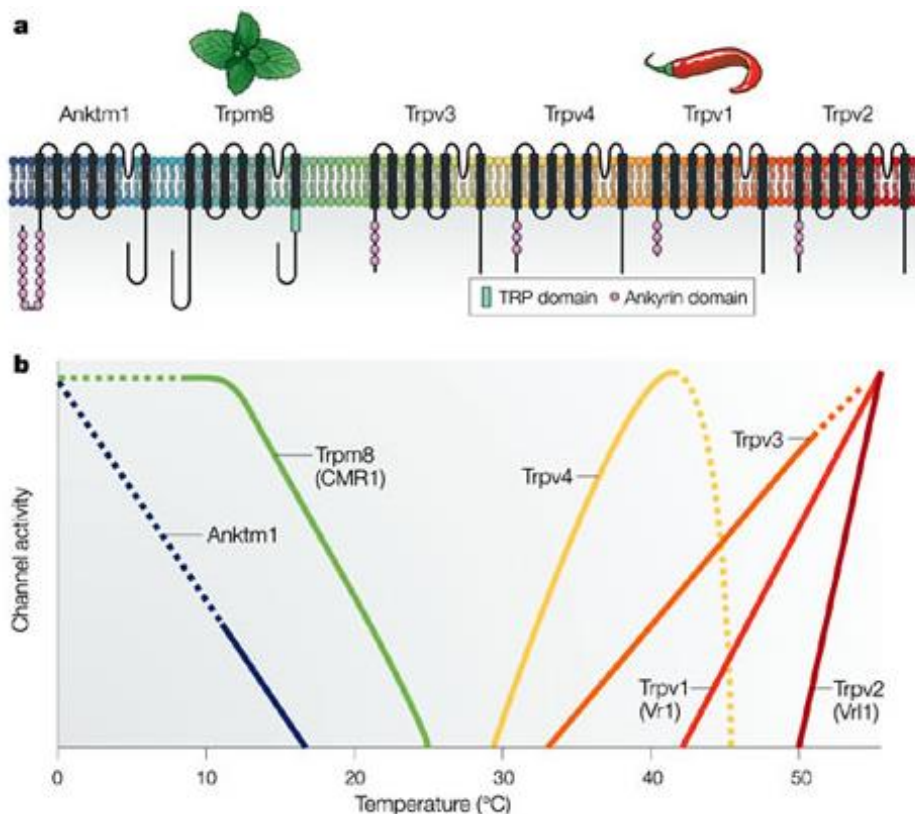
- leurs seuils de stimulation sont voisins des seuils de sensibilité thermique cutanée
- elles présentent une variation d'activité proportionnelle à la variation de la température cutanée (réponse phasique ou dynamique)
- elles montrent une activité tonique, proportionnelle à la température cutanée.

Les terminaisons libres portent des récepteurs du groupe « Transient Receptor Potential » (TRP). Ils sont divisés en 6 sous-groupes. Parmi eux, les récepteurs Vanilloïde (TRPV), Mélastatine (TRPM) et Ankrin (TRPA1) sont des capteurs sensoriels qui détectent des variations de température. Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires qui sont aussi des canaux ioniques. Un changement local de température provoque l'ouverture et l'entrée d'ions Ca<sup>++</sup> et Na<sup>+</sup>. Ceci dépolarise la terminaison libre et engendre un potentiel d'action. Chaque récepteur reconnaît une certaine gamme de température. L'ensemble des récepteurs permet de couvrir l'ensemble des températures détectées par les mammifères (Patapoutian et al., 2003) (**Figure 3A et 3B**).



**Figure 3A : fréquence de décharge moyenne des fibres sensibles thermiques en réponse au changement de température de la peau.**

La ligne pointillée indique la température normale de la peau (33 °C). Les fibres sensibles au froid ne sont sensibles qu'au refroidissement et les fibres sensibles au chaud qu'au réchauffement. Aucune de ces fibres ne répond à la stimulation mécanique (*d'après Patapoutian et al., 2003*).



**Figure 3B : organisation des domaines et seuils de température des canaux TRP.** Les températures chaudes et froides extrêmes nociceptives activent plusieurs membres de la famille TRP. Le menthol est associé au froid et la capsaïcine à la brûlure du piment, ils agissent comme des activateurs non thermiques des récepteurs TRPM8 et TRPV1 (*d'après Patapoutian et al., 2003*).

### 2.1.5. LES NOCICEPTEURS

Les stimuli nociceptifs activent les terminaisons libres des fibres nerveuses A $\delta$  et C, constituant des arborisations plexiformes dans les tissus cutanés, musculaires, articulaires ainsi que dans les parois des viscères. Les nocicepteurs constituent une population diversifiée avec des propriétés chimiques et physiques dynamiques se modifiant au gré des changements environnementaux et de l'organisme. Ils sont classés en fonction de leurs caractéristiques électrophysiologiques ou moléculaires.

#### 2.1.5.1. Caractéristiques électrophysiologiques

Grâce aux études électrophysiologiques, les nocicepteurs cutanés ont été les mieux décrits chez l'homme. On en distingue 2 types présents au niveau de la peau : les mécano-nocicepteurs unimodaux A $\delta$  et les nocicepteurs C polymodaux. Ils ont comme caractéristiques communes, un seuil d'activation élevé, une capacité à coder l'intensité du stimulus et une capacité de sensibilisation (une répétition des stimulations nociceptives diminue le seuil de déclenchement du potentiel d'action et augmente l'activité des nocicepteurs).

Les mécano-nocicepteurs unimodaux A $\delta$  répondent à des stimulations de forte intensité, essentiellement mécaniques mais aussi thermiques. Ils ont des champs récepteurs larges (Lewin et Moshourab, 2004) et sont divisés en deux sous-groupes. Le type I est sensible aux stimulations mécaniques avec un seuil de réponse bas et aux stimulations thermiques chaudes avec un seuil de réponse élevé. Le type II a un seuil de réponse inversé, haut pour les stimulations mécaniques et bas pour les stimulations thermiques. Ils signalent la première sensation douloureuse (Djouhri et al., 2004). Ces mécano-nocicepteurs A $\delta$  contribuent aussi à la sensation de douleur au froid, puisqu'ils s'activent pour des températures inférieures à 0 °C (Simone et al., 1997).

Les nocicepteurs C sont une population sensible à la fois aux stimuli nociceptifs mécaniques et thermiques chauds. (Pearl, 2007). Ils sont divisés en plusieurs sous-populations et sont pour la plupart polymodaux. Ils répondent à des stimulations nociceptives intenses (seuil de réponse élevé) et variées (mécaniques, thermiques et chimiques) (Lewin et Moshourab 2004). Les fibres C, néanmoins, ne sont pas toutes des nocicepteurs : des thermo-récepteurs C répondent au froid non douloureux, des mécano-récepteurs C répondent à des stimulations non douloureuses (Iggo et al., 1960, Seal et al., 2009, Li et al., 2011). Ces mécano-récepteurs C sont sensibles au frottement léger et véhiculent un tact non douloureux, non discriminatif ou tact du plaisir (Olausson et al., 2008). Schmidt et al. (1995) décrivent une autre sous-population intermédiaire de fibres C : les « nocicepteurs silencieux ». Ils sont

insensibles aux stimuli mécaniques ou thermiques dans des conditions physiologiques. Leur seuil d'activation mécanique est plus élevé que pour les autres mécano-récepteurs C mais leur vitesse de conduction est comparable. Par contre, en cas de lésion tissulaire, la libération de substances pro-inflammatoires algogènes (bradykinine, histamine, sérotonine, prostaglandine...) sensibilise ces « nocicepteurs silencieux » aux stimuli mécaniques et thermiques.

#### 2.1.5.2. Caractéristiques moléculaires et neuroanatomiques

Les nocicepteurs peuvent être distingués en fonction de leurs caractéristiques moléculaires :

- les fibres A myélinisées expriment un neurofilament phosphorylé d'un poids moléculaire de 200KD (NF 200) (Chen et al., 2010).
- les fibres amyéliniques de type C sont classées 2 sous-catégories en fonction de leurs caractéristiques neurochimiques :
  - les fibres C peptidergiques qui synthétisent des neuropeptides tels que la substance P et la Calcitonin Gene Related Peptid (CGRP). Elles sont sensibles au facteur de croissance Nerve Growth Factor (NGF) et expriment leurs récepteurs Trk-A. Elles innervent plusieurs types de tissus dont l'hypoderme et sont sensibles à l'inflammation neurogène.
  - les fibres C non-peptidergiques qui expriment des marqueurs spécifiques : la Fluoride Resistant Acid Phosphatase, le proto-oncogène tyrosine kinase (Trk) récepteur c-RET du Glial-cell Derived Neurotrophic Factor (GDNF), une sous-classe des récepteurs purinergiques (P2X3) canal récepteur de l'ATP et un site de liaison pour l'isolectine IB4. Elles se caractérisent également par la présence d'une forte densité de canaux sodiques insensibles à la tétródotoxine, de sous-type Na<sub>v</sub> 1.8. Elles innervent essentiellement la peau (Todd, 2010).

Les nocicepteurs sont aussi distingués en fonction des canaux qu'ils expriment et qui leur confèrent des propriétés distinctes : TRPV1, sensible à la chaleur (>43 °C), TRPM8, sensible au froid (< 25°C), ASICs, sensibles à l'acidification des tissus et TRPA1, sensible aux agents chimiques irritants (Julius et Basbaum, 2001).

## 2.2. LES AFFERENCES PRIMAIRES ET LEURS MODALITES SENSORIELLES

### 2.2.1. LES NEURONES PSEUDO-UNIPOLAIRES

Du fait de leur morphologie particulière, les neurones de premier ordre, sont appelés neurones pseudo-unipolaires ou en T. Ils présentent un prolongement unique qui bifurque, à courte distance du corps cellulaire, en prolongements afférent et efférent. La majorité des protéines synthétisées au niveau du corps cellulaire est distribuée vers les terminaisons centrale et périphérique du neurone. Seule la terminaison périphérique répond aux stimuli mécaniques et thermiques. Par contre, les deux terminaisons centrale et périphérique répondent aux molécules endogènes ou exogènes (Basbaum et Jessel 2000). Ainsi, pour un geste opératoire, les patients reçoivent par voie générale des dérivés morphiniques, tel le fentanyl, qui agit au niveau de la terminaison centrale des nocicepteurs. En parallèle, la zone cutanée à opérer est infiltrée avec un anesthésiant local, telle la lidocaïne, qui agit sur la terminaison périphérique.

Les corps cellulaires des afférences primaires des trois branches du nerf trijumeau se trouvent dans le ganglion de Gasser (ou ganglion trigéminal ou ganglion semi-lunaire) sans pour autant se mélanger. Le ganglion de Gasser se trouve dans une fossette appelée cavum de Meckel, située sur la face endocrânienne du rocher au niveau de la base du crâne. Le ganglion de Gasser est l'équivalent des ganglions spinaux pour les nerfs sensitifs extra-céphaliques.

Les axones des neurones pseudo-unipolaires quittent le ganglion de Gasser et constituent la racine sensitive du trijumeau. Ils contactent les synapses des neurones de second ordre ou deuto-neurones au niveau du complexe sensitif du trijumeau qui constitue le premier relai central des informations somesthésiques oro-faciales. Avant d'atteindre le complexe sensitif du trijumeau, la racine sensitive du trijumeau se sépare précocement en une racine ascendante qui se rend au noyau principal et une racine descendante plus longue : le tractus spinal ou racine descendante du V, qui se poursuit jusqu'au pôle caudal du bulbe.

Notons que les motoneurones naissent au niveau du noyau moteur du trijumeau localisé au niveau du pont, ils quittent le système nerveux central par la racine du trijumeau, contournent le ganglion de Gasser et suivent la branche V3 du trijumeau pour se distribuer aux muscles.

### 2.2.2. LES DIFFERENTES FIBRES

Les fibres sont séparées usuellement en fonction de leur diamètre et en fonction de l'information non-nociceptive (fibres A $\beta$ ) ou nociceptive (fibres A $\delta$  et C) qu'elles véhiculent (**Tableau1**) :

- les fibres A $\beta$  sont des fibres de large diamètre (5 à 15  $\mu$ m) entourées d'une épaisse couche de myéline avec une vitesse de conduction rapide de 40 à 100 m/s (Lewin et Moshourab, 2004). Elles véhiculent essentiellement l'information tactile non-nociceptive.
- les fibres A $\delta$  sont faiblement myélinisées, de 1 à 5  $\mu$ m de diamètre, avec une vitesse de conduction : 5 à 40 m/s. Leur activation est responsable d'une perception douloureuse aiguë, localisée, à type de piqure brève.
- les fibres C sont amyéliniques, de 0,3 à 1,5  $\mu$ m de diamètre, avec une vitesse de conduction lente de 1 à 2 m/s. Elles représentent 80 % des afférences cutanées et l'intégralité des afférences viscérales. Leur activation donne une perception douloureuse retardée, diffuse, à tendance extensive et à type de brûlure.

Cette séparation tend à être revue. La combinaison d'un marquage génétique et d'un traçage rétrograde a permis de visualiser l'organisation des terminaisons périphériques et centrales des axones des mécano-récepteurs de bas seuil ou low-threshold mechanoreceptors (LTMR) qui véhiculent le tact non douloureux. Ils sont classés en trois populations distinctes : A $\beta$ -, A $\delta$ - et C-LTMR. Chaque type de poil du tronc est un mécanorécepteur. L'application d'un stimulus d'intensité donnée sur une zone poilue recrute les 3 sous-types de fibres A $\beta$ -, A $\delta$ - et C-LTMR, l'information converge au niveau de la corne dorsale et progresse le long de la moelle épinière jusqu'aux structures supra-segmentaires pour y être intégrée. La caractéristique de ce modèle est d'offrir un grand nombre de combinaisons possibles pour percevoir les nuances du tact (Li et al., 2011).

**Tableau 1** : caractéristiques et signification fonctionnelle des trois catégories de fibres sensitives contenues dans un nerf d'origine cutanée.

Types de fibres	Fibres A $\beta$	Fibres A $\delta$	Fibres C
Diamètre (microns)	5-15 $\mu\text{m}$	1-5 $\mu\text{m}$	0,3-1,5 $\mu\text{m}$
Gaine de myéline	+++	+	-
Vitesse de conduction (mètre/seconde)	40-100 m/s	5-40 m/s	1-2 m/s
Récepteurs périphériques	Spécialisés, encapsulés	Mécano-nocicepteurs Terminaisons libres	Nocicepteurs polymodaux Terminaisons libres
Stimulus spécifique	Pression légère	Pression forte	Pression forte T° > 45°C Chimique
Sensation produite	Tact, proprioception	Douleur rapide Vive, à type de pique, Bien localisée, Instantanée Durée brève, Pas de tonalité affective	Douleur lente Sourde, à type de brûlure Diffuse Installation lente Durée prolongée, Réaction affective et végétative

### 2.3. LE COMPLEXE SENSITIF DU TRIJUMEAU

Le complexe sensitif du trijumeau est une longue colonne de substance grise étendue sur toute la hauteur du tronc cérébral, près de son bord latéral, de la limite inférieure du mésencéphale aux premiers segments de la moelle cervicale. Elle est faite du noyau principal (Pr5) situé à mi-hauteur du pont et en dessous, du noyau spinal (Sp5) dont l'extrémité la plus caudale se confond avec la substance gélatineuse de la moelle cervicale. En dedans du noyau principal on retrouve le noyau moteur du trijumeau et au-dessus, le noyau mésencéphalique, mais qui ne font pas partie du complexe sensitif du trijumeau. **(Figure 4)**.

Le prolongement spinal est décomposable, histologiquement, en trois segments, dans le sens rostro-caudal : le sous-noyau oral ou oralis (Sp5O), le sous-noyau interpolaire ou interpolaris (Sp5I) et le sous-noyau caudal ou caudalis (Sp5C). Les fibres afférentes primaires de petit diamètre composent une grande partie du prolongement spinal. Les fibres de gros diamètre finissent préférentiellement dans la substance grise au niveau du sous-noyau oral, du sous-noyau interpolaire et du noyau principal.

Le noyau principal et le sous-noyau interpolaire sont considérés comme le relai des informations tactiles et proprioceptives. Le sous-noyau caudal joue plutôt un rôle dans la

transmission de l'information thermo-algique. Des patients avec une occlusion de l'artère cérébelleuse postérieure peuvent présenter, en cas d'ischémie élective du noyau spinal, une perte de la sensation thermique ou algique mais avec conservation du tact (Gerard, 1923). De plus, chez l'homme comme chez l'animal, la section chirurgicale de la racine descendante du trijumeau entraîne la désafférentation du seul Sp5C (tractotomie à l'obex) et produit une anesthésie thermo-algique du côté lésé sans modification notable de la sensation tactile. Le Sp5O, quant' à lui, joue un rôle important dans la douleur orale et péri-orale (Young, 1982). En effet, la lésion du Sp5C supprime la réponse nociceptive de ces deux sous-noyaux mais pour les douleurs orales et dentaires elle est incomplète (Sessel, 2000).

Les fibres A $\beta$  se terminent préférentiellement au niveau de la partie rostrale du complexe sensitif du trijumeau et au niveau des couches III-VI du caudalis. Par contraste, les fibres de petit diamètre A $\delta$  et C se terminent préférentiellement au niveau des couches I, II, V et VI du caudalis (Sessel, 2000).

Le sous-noyau caudal fait l'objet d'un paragraphe spécifique ci-dessous.





## 2.4. LES VOIES ASCENDANTES

Les informations nociceptives véhiculées par le système trigéminal sont transmises vers le cortex cérébral, l'amygdale et l'hypothalamus en passant par le thalamus, la formation réticulée bulbaire, le noyau parabrachial ou le noyau du faisceau solitaire (Villanueva et al., 2000). Ces différentes structures participent à l'intégration de la douleur. Pour ce faire, la plupart des neurones de projection du complexe sensitif du trijumeau croisent la ligne médiane et constituent la voie trigémino-thalamique qui rejoint la voie ascendante spinothalamique le long de la medulla et du pont. Comme pour la voie spino-bulbo-thalamique, les projections trigémino-bulbo-thalamiques contiennent des axones de tous les types : des neurones nociceptifs spécifiques, des neurones de bas seuil et des neurones à convergence.

La voie trigémino-thalamique est divisée en deux : une voie latérale appelée néo-trigémino-thalamique et une voie médiale appelée paléo-trigémino-thalamique.

- la voie trigémino-thalamique latérale ou voie sensori-discriminative va du Sp5C au noyau thalamique ventro-postérieur latéral (VPL) controlatéral et se termine au niveau du complexe somato-sensoriel primaire. C'est une voie rapide chargée de l'analyse qualitative et sensori-discriminative de la douleur, à savoir l'intensité, la topographie précise et la sensibilité épicritique.
- la voie trigémino-thalamique médiale ou voie émotionnelle va du Sp5C, chemine dans le tronc cérébral au niveau de la substance réticulée jusqu'au noyau thalamique ventral postérieur médian ipsilatéral pour se terminer au niveau des structures limbiques (cortex somatosensoriel, cortex cingulaire antérieur et insula). Les projections du complexe sensitif du trijumeau vers le noyau ventro-postérieur médian proviennent essentiellement de neurones nociceptifs spécifiques et des neurones à convergence dues sous-noyaux caudaux droit et gauche avec des champs récepteurs larges (Craig et al., 2004 ; Krout et al. 2000). Ce système médian lent et mal systématisé est responsable de la douleur sourde. Il est impliqué dans l'intégration de la douleur sur le plan émotionnel et comportemental. Les neurones ne sont pas capables d'effectuer un codage sensori-discriminatif mais semblent impliqués dans les réactions d'éveil ou de défense face à un stimulus douloureux

Cette description simplifie la réalité des voies trigémino-thalamiques. En effet, tout le long de leur ascension en direction du thalamus, les axones croisent et recroisent la ligne médiane, émettant des collatérales du tronc cérébral au thalamus. Ces connections jouent

certainement un rôle de modulation dans l'information douloureuse aussi bien dans l'interprétation que dans la réponse.

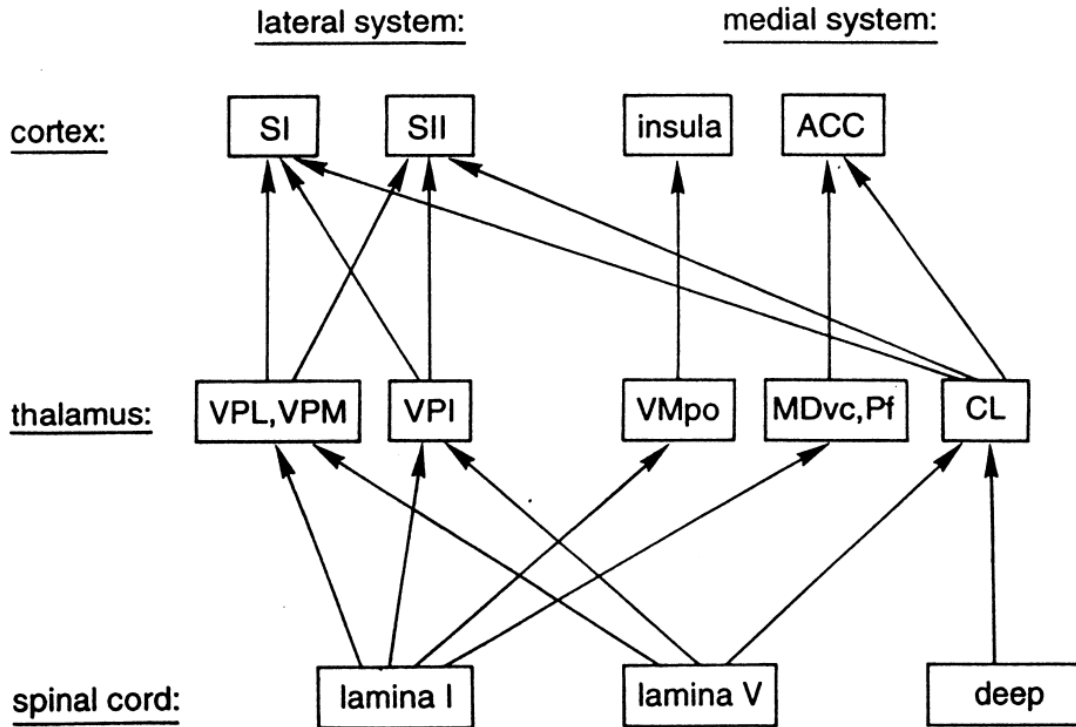
Le thalamus présente une organisation complexe et sert de relai à de multiples voies sensorielles. Pour schématiser, les voies qui projettent dans la région latérale du thalamus conservent une somatotopie. La composante sensorielle discriminative de la douleur s'exprime grâce aux neurones du noyau ventro-postéro-latéral pour le corps et grâce à ceux du noyau ventro-postéro-médial pour la sphère oro-faciale.

Les voies qui se terminent dans le thalamus médian (dans les noyaux intralaminaires et submedius) ne reçoivent pas d'afférences directes en provenance de la moelle mais des afférences indirectes en provenance de la formation réticulée via le faisceau spino-réticulo-thalamique.

Le message nociceptif projette du thalamus latéral ou médial aux structures corticales pour y être intégré et modulé. Une interaction complexe et dynamique cortico-corticale ou cortico-sous-corticale se produit dans les différentes régions du cerveau. Elle engendre une perception globale et une compréhension de l'expérience douloureuse (Treede et al., 1999).

Le cortex somesthésique primaire permet l'analyse sensori-discriminative du stimulus nociceptif c'est à dire de définir le type, l'intensité et la topographie du stimulus. Le cortex somesthésique secondaire permet l'intégration du stimulus avec sa représentation spatiale et le contrôle de l'attention. Le cortex insulaire est impliqué dans l'analyse discriminative de la sensation de froid non douloureux et douloureux ainsi que dans la sensibilité interoceptive.

Le contingent du faisceau spinothalamique passant par le thalamus médian projette préférentiellement sur le cortex pré-frontal, le cortex cingulaire antérieur, le cervelet, le striatum, l'hypothalamus et le système limbique. Les projections antérieures permettraient l'élaboration d'une réaction motrice de défense à un stimulus douloureux : le cortex cingulaire antérieur joue un rôle dans le contrôle de l'attention, la réponse motrice, l'anticipation et dans la composante émotionnelle ; le cortex pré-frontal joue un rôle dans la composante cognitive de la douleur (réaction émotionnelle et mémorisation). **(Figure 5).**



**Figure 8 : résumé des projections du faisceau spino-thalamique vers les aires corticales.** ACC, anterior cingulate cortex ; CL, centrolateral nucleus ; MDvc, ventrocaudal part of medial dorsal nucleus ; Pf, parafascicular nucleus, SI, primary somatosensory cortex ; SII, secondary somatosensory cortex ; VMpo, posterior part of ventromedial nucleus; VPI, ventral posterior inferior nucleus ; VPL, ventral posterior lateral nucleus ; VPM, ventral posterior medial nucleus (*adapté d'après Treede et al., 1999*).

### 3. PARTICULARITES DE LA SENSIBILITE ORO-CRANIO-FACIALE

L'innervation sensitive de l'extrémité céphalique a pour fonction première de protéger comme le ferait n'importe quel nerf sensitif. Cependant, la concentration d'organes indispensables à la vie quotidienne (manger, dormir, communiquer, respirer, se protéger...), la composante émotionnelle majeure du visage (avoir une image de soi) et la proximité des structures supra-segmentaires peuvent expliquer une évolution différente par rapport au système spinal. Tous les tissus cranio-faciaux reçoivent une innervation sensorielle à l'exception du parenchyme cérébral et de la rétine.

#### 3.1. L'ORIGINE EMBRYOLOGIQUE

Le ganglion trigéminal ou ganglion de Gasser est le plus volumineux ganglion des nerfs crâniens, il est construit par la fusion de deux ganglions (ophtalmique et maxillo-mandibulaire). Les ganglions sensoriels spinaux dérivent essentiellement de la crête neurale. Le ganglion trigéminal, quant' à lui, est composé par la fusion de deux groupes de cellules d'origines distinctes : les cellules issues des placodes neurogéniques trigéminales et les cellules de la crête neurale. Les premières constituent les neurones sensoriels qui innervent la ou les régions cutanées la plus éloignés du ganglion de Gasser. Les secondes constituent les neurones sensoriels et proprioceptifs des régions proximales par rapport au ganglion de Gasser. Les cellules des placodes sont issues de la couche ectodermique et migrent dans l'espace mésenchymateux. Les cellules de la crête neurale sont issues de la partie dorsale du tube neural (*Shigetani, 2008*).

#### 3.2. UNE PROPORTION DE FIBRES AFFERENTES DIFFERENTES

Alors que les fibres amyelinisées C représentent 80% des fibres sensorielles au niveau du corps, au niveau du nerf trijumeau le ratio s'inverse entre fibre myélinisées A et fibres amyélinisées C (Young et King, 1973). De plus, au niveau du corps la majorité des thermorécepteurs sont des fibres C, alors qu'au niveau de la région oro-faciale ce sont les fibres A $\delta$ . Ces dernières véhiculent l'information avec une plus grande vélocité. De plus, les distances sont, en général, plus courtes. La région oro-faciale semble donc mieux protégée avec une transmission de l'information plus rapide et plus précise face à des stimuli douloureux. Mais, en cas de dysfonctionnement, ce système, plus efficient en situation physiologique, devient plus complexe et plus difficile à traiter que pour le reste du corps.

### 3.3. LES TISSUS MUQUEUX

Les muqueuses nasales, buccales et sinusiennes sont tapissées d'un épithélium muco-sécrétant et la muqueuse linguale d'un épithélium malpighien non-kératinisé. Ces tissus sont innervés par les afférences primaires trigéminales composées en grande partie de nocicepteurs A $\delta$  polymodaux et C polymodaux avec un champ récepteur large comparé aux récepteurs cutanés (Toda et al., 1997). L'absence de couche cornée rend les récepteurs sensitifs plus facilement accessibles aux stimuli chimiques, mécaniques et thermiques.

La cavité buccale se caractérise, en plus, par une forte densité de récepteurs au tact et au froid et par une faible densité de récepteurs au chaud, notamment au niveau du palais primaire. Les brûlures fréquentes de cette région en témoignent. Paradoxalement, alors que la perception du chaud est proportionnellement moins développée, la bouche est l'objet d'un syndrome spécifique : la stomatodynie (burn mouth syndrom). Il existe en l'absence d'inflammation des muqueuses, faisant évoquer une origine neuropathique. L'analyse de biopsies linguales a mis en évidence une diminution du nombre de fibres C (confirmant un processus neuropathique) et une augmentation significative des fibres TRPV1-positives et des fibres NGF-positives. Ces modifications peuvent expliquer la sensation de brûlure ressentie par les patients (Woda et al., 19998 ; Grémeau-Richard et al. 2010). Au niveau du corps, la surexpression de ces deux familles de récepteurs est impliquée dans la modification de l'activité cellulaire et la sensibilisation au chaud, mais elle n'apparaît qu'en présence d'un processus inflammatoire (Basbaum et al., 2009; Yilmaz et al., 2007).

### 3.4. LA CORNEE ET LA CONJONCTIVE

La cornée est le tissu le plus densément innervé du corps. C'est le seul tissu où les terminaisons nerveuses pénètrent les couches superficielles de l'épithélium. Au niveau de la cornée et de la conjonctive, toutes les terminaisons nerveuses sont considérées comme nociceptives et sont essentiellement des fibres de petit diamètre (Rozsa et Beuerman, 1982). Elles sont activées par des stimuli chimiques, thermiques ou mécaniques même minimes : la sensation est toujours douloureuse mais avec des nuances différentes en fonction du stimulus (Feng et al., 2003). Cela peut suggérer des récepteurs périphériques différents d'autant plus que les neurones mécano-sensibles sont exclusivement des fibres A $\delta$  et les neurones polymodaux sont de type A $\delta$  et C (Moreira et al., 2007). Les mécanorécepteurs de bas- et haut-seuil participent au réflexe de clignement des paupières. Ce réflexe de protection se déclenche aussi bien pour des stimuli de faible ou de forte intensité.

### 3.5. L'INNERVATION DES STRUCTURES INTRACRANIENNES.

L'innervation sensitive des structures intracrâniennes, méninges et vaisseaux, donc en dehors du parenchyme cérébral, est assurée par des nocicepteurs. La douleur est la seule réponse possible qu'elle que soit la stimulation appliquée. La démonstration a pu être faite en retrouvant la présence de marqueurs spécifiques des nocicepteurs (CGRP, substance P) et par l'enregistrement électrophysiologique de l'activité des fibres afférentes. L'analyse au microscope électronique du diamètre des fibres a permis de voir qu'un tiers d'entre elles sont myélinisées et se classent dans le groupe des fibres A $\delta$ , le reste étant des fibres amyélinisées C. La répartition des nocicepteurs est hétérogène avec une prédominance à proximité des collatérales du polygone de Willis, des artères de gros calibre et des sinus (Strassman et al., 2004).

### 3.6. LA DENT.

La dent est une structure qui n'a pas d'équivalent dans le reste du corps. Elle est sensible au chaud, au froid, aux substances chimiques et à la pression mais surtout au message douloureux (Bereiter et al., 2008). C'est une boîte solide sensible et fragile correspondant à la dentine, recouverte d'une structure dure plutôt insensible : l'émail. Le tout protège dans la chambre pulpaire un tissu mou très innervé, caractérisé par une proportion élevée de nocicepteurs A par rapport aux nocicepteurs C (Mengel et al., 1996). Comme les autres tissus durs du corps, elle présente deux types d'innervation nociceptive : une innervation extrinsèque assurée par le parodonte et une innervation intrinsèque assurée par la chambre pulpaire. Les nocicepteurs jouent surtout un rôle de défense car ils rapportent les lésions telles que les caries ou infections dentaires. Les mécanorécepteurs de bas seuil sont impliqués dans la proprioception et évitent lors de la mastication de fracturer les dents ou de se mordre sévèrement.

La dent se caractérise par une perception exclusivement douloureuse au niveau de la dentine, même pour des stimuli légers et en dehors de toute pathologie. Cette spécificité est en lien direct avec son innervation. Les terminaisons nerveuses au niveau de la pulpe ont les propriétés neurochimiques des mécanorécepteurs de bas seuil mais sont de petit diamètre et véhiculent l'information à travers les fibres C et A $\delta$ , puis lorsqu'elles quittent la pulpe, la plupart de ces fibres présentent les propriétés (gros diamètre, vitesse de conduction rapide et marquages neurochimiques) spécifiques des fibres A $\beta$ . Ensuite, une partie de ces neurones se terminent au niveau des couches superficielles du complexe sensitif du trijumeau et expriment les neuropeptides et récepteurs spécifiques des nocicepteurs non peptidergiques (CGRP, trkA,

substance P et IB4). Au final, par leurs caractéristiques de fibres A $\beta$ , elles répondent au tact léger mais du fait de leur projection et de la présence de neuropeptides typiques des fibres C, elles activent des neurones de second ordre sensibles à la douleur. La pulpe dentaire présente aussi, dans une moindre mesure, des nocicepteurs C et A $\delta$  typiques (Tal et Devor, 2008).

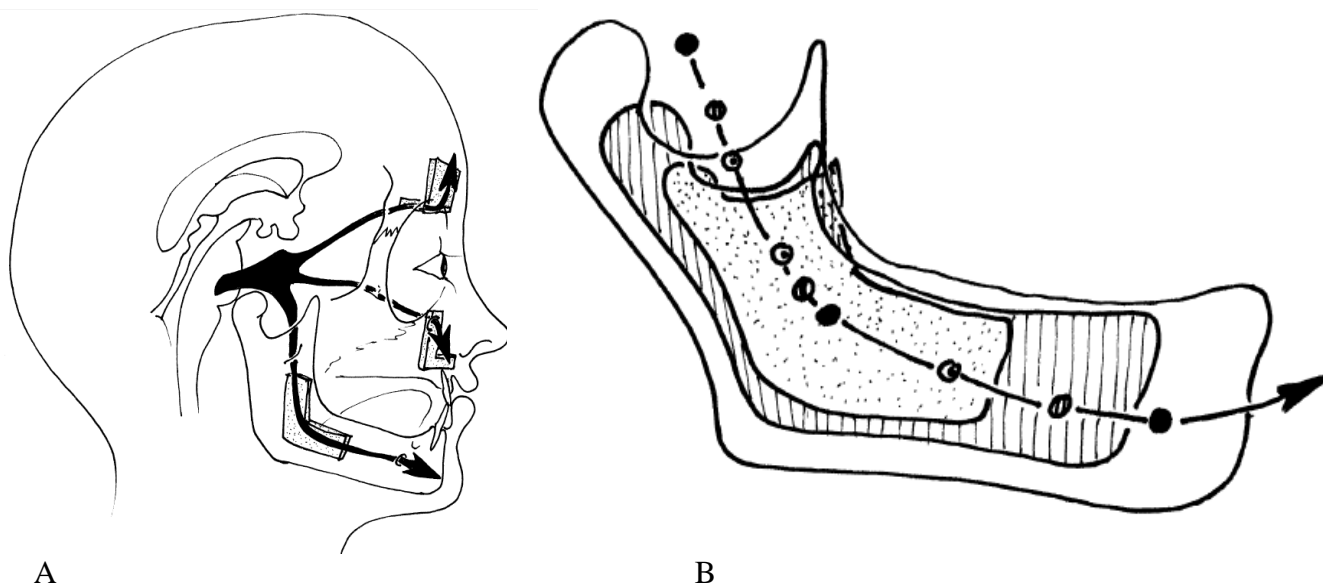
Les terminaisons nerveuses des afférences pulpaire ont des particularités anatomiques. Elles traversent les odontoblastes et pour 40% d'entre elles se terminent à 1-3 mm de la jonction entre l'émail et la dentine, sous forme de terminaisons libres dans les tubuli dentinaires, remplis de fluide. Les mécanismes de la nociception dentinaire sont essentiellement basés sur la théorie hydrodynamique de Brännström (1966). Chaque perturbation du fluide dentinaire soit mécanique par déplacement du liquide, soit chimique par modification de sa concentration, soit thermique par modification de sa viscosité entraîne un mouvement du fluide vers l'extérieur ou l'intérieur des tubuli et active les nocicepteurs pulpaire. La réponse douloureuse est proportionnelle au déplacement du liquide qui entraîne une force de cisaillement sur les mécanorécepteurs. Elle est aussi plus intense et plus rapide lorsque le déplacement se fait vers l'extérieur des tubuli. Les stimuli froids provoquent un mouvement du fluide vers l'extérieur à l'inverse des stimuli chauds, expliquant ainsi la plus grande sensibilité dentaire au froid (Mantzourani et al., 2013).

### 3.7. LES OS DE LA FACE

Les tissus osseux et nerveux de l'ensemble du corps évoluent de façon distincte car ils ont une origine embryologique différente, mésodermique pour l'un et à partir des crêtes neurales pour l'autre. Par contre, le nerf trijumeau et les os de la face sont intimement liés et dérivent tous deux de la crête neurale. La croissance des branches du trijumeau entraîne avec elle la croissance de la mandibule, la projection de l'os zygomatique et de l'os frontal. C'est l'axe neuro-matriciel, défini par l'émergence d'un nerf, à l'origine d'une ébauche osseuse neurale (Raphael et al., 2001), (**Figure 6**). C'est ainsi que les branches du trijumeau cheminent dans des canaux intra-osseux. L'ossification des os de la face est de type membraneux alors que pour les autres os elle est de type chondral.

Cette origine embryologique particulière pourrait expliquer, en partie, la différence fondamentale entre l'innervation sensitive intrinsèque des os de la face et ceux du squelette.





**Figure 6 : croissance du massif facial.** A. L'organisation trigéminal de la face et l'ossification neurale à l'émergence des branches du nerf trijumeau. B. Axe neuro-matriciel et présomption de croissance (d'après Raphael, 2001).

Les tumeurs et métastases intra-osseuses vertébrales, costales... même de petite taille sont connues pour provoquer des douleurs intenses. A l'inverse, la mandibule et le maxillaire sont le siège de processus expansifs bénins ou malins qui sont diagnostiqués soit fortuitement lors d'imageries médicales ou lorsqu'ils commencent à devenir douloureux en envahissant les tissus mous contigus mais la douleur est rarement le premier symptôme.

### 3.8. LE NOYAU MESENCEPHALIQUE DU TRIJUMEAU

Le noyau mésencéphalique du trijumeau (MesV), ou tractus mésencéphalique situé au niveau de la jonction mésopontine, est une structure sensorielle unique. Il contient les corps cellulaires des afférences primaires sensibles des muscles masticateurs (muscle masséter, muscle temporal et muscle ptérygoïdien médial) et du tissu parodontal (composé par le ligament parodontal, l'os alvéolaire, le ciment et la gencive adhérente). Il correspond à un ganglion sensitif qui est demeuré dans le système nerveux central. A la différence des autres ganglions des nerfs crâniens ou rachidiens, les neurones du MesV reçoivent directement des informations en provenance de la périphérie.

Au niveau de l'organisme les muscles fléchisseurs et extenseurs sont à peu près identiques en taille et en puissance mais les muscles releveurs de la mandibule sont beaucoup plus puissants que les muscles abaisseurs, avec une très forte innervation. Ce phénomène,

unique n'a pas d'explication claire (Lennartsson, 1980). Par contre, la présence de certaines douleurs chroniques musculo-squelettiques cranio-faciales s'explique en partie par une majoration de ce déséquilibre souvent provoqué par des parafonctions (bruxisme ou onychophagie).

### 3.9. L'ARTICULATION TEMPORO-MANDIBULAIRE

Cette articulation complexe est une diarthrose qui permet l'ouverture et la fermeture de la cavité buccale. Son innervation permet de déterminer la position des mâchoires et la puissance appliquée par les muscles masticateurs. Les surfaces articulaires sont dépourvues de terminaisons nerveuses. Par contre, le disque intra-articulaire est composé de terminaisons nerveuses de type propriocepteurs de bas seuils. Les structures péri-articulaires (muscles et ligaments) sont également richement innervées et majoritairement par des nocicepteurs trigéminaux, justifiant probablement la fréquence des douleurs de l'ATM.

### 3.10. LA SOMATOTOPIE DANS LES TROIS PLANS DE L'ESPACE

Les tissus cranio-faciaux sont représentés de façon somatotopique au niveau du complexe sensitif du trijumeau (Sessle et al., 2000). La partie dorsale des sous-noyaux et du noyau principal est principalement composée de neurones dont les champs récepteurs correspondent à la région mandibulaire. La partie ventrale contient les neurones avec des champs récepteurs ophtalmiques et la partie intermédiaire contient ceux de la région maxillaire. En plus de l'organisation étagée de la face, au niveau du sous-noyau caudal les parties les plus médiales de la face sont rostrales et les parties les plus latérales sont caudales. Cette somatotopie au niveau du tronc cérébral se poursuit au niveau des structures thalamiques et du cortex somato-sensoriel.

Après l'ensemble des différences précitées entre le territoire du nerf trijumeau et le reste du corps, on constate d'un point de vue anatomique que le sous-noyau caudal est un acteur clé dans les voies de la douleur. Or, rappelons ici que l'extrémité distale du complexe sensitif du trijumeau correspond aux premiers segments de la moelle épinière. Il apparaît donc intéressant de replacer l'ensemble des travaux sur la somesthésie oro-face dans un contexte plus général.

## 4. LE SOUS-NOYAU CAUDAL DU TRIJUMEAU

### 4.1. UNE STRUCTURE LAMINAIRE

#### 4.1.1. LES COUCHES DU SOUS-NOYAU CAUDAL

La substance grise de la moelle épinière, décrite en 1952 par Rexed sur le chat, est divisée en X couches. Les couches I à VI composent la corne dorsale de la moelle épinière et correspondent à la partie sensitive (*Basbaum et Jessel, 2000*). Le reste compose la corne ventrale qui est la partie motrice. Le sous-noyau caudal présente une structure laminaire tout à fait similaire à celle de la corne dorsale de la moelle, à la différence près qu'il ne comporte que 5 couches (Kerr, 1970). D'où la description ci-dessous qui s'appuie sur les données obtenues aussi bien dans la corne dorsale de la moelle que dans le sous-noyau caudal.

On décrit de la superficie vers la profondeur ou du dorsal vers le ventral :

- la couche I, appelée substance spongieuse ou zone marginale, est la couche la plus fine et la plus superficielle. De l'épaisseur de quelques cellules, elle est composée d'interneurones et de neurones de projection responsables du transfert de l'information des structures segmentaires aux structures supra-segmentaires. La majorité des neurones de la couche I exprime le récepteur neurokinine 1 (NK1) activé par la substance P. L'utilisation d'antagonistes spécifiques des récepteurs NK1 et la combinaison de la substance P à la saporine induit une destruction de ces neurones, une réduction de l'hyperalgésie au chaud et au froid. La douleur aiguë et les effets analgésiques de la morphine restent par contre inchangés (Suzuki et al., 2002). Les neurones NK1-positifs de la couche I semblent jouer un rôle majeur dans l'apparition et le maintien de la douleur neuropathique et inflammatoire (Nichols et al., 1999).
- la couche II, est appelée substance gélatineuse de Rolando du fait de son apparence plutôt transparente. Les couches I et II constituent les couches superficielles de la corne dorsale. Elle contient des interneurones inhibiteurs et excitateurs. Au niveau de la partie interne de la couche II (IIi) et dans la partie externe de la couche III (IIIe), on trouve plus spécifiquement et en grande quantité un type particulier d'interneurones qui expriment spécifiquement l'isoforme  $\gamma$  de la protéine kinase C (Tanaka et al., 1992 ; Malmberg et al. 1997).
- les couches profondes correspondent aux couches III à V. Elles sont composées essentiellement d'interneurones inhibiteurs et excitateurs et de neurones de projections.

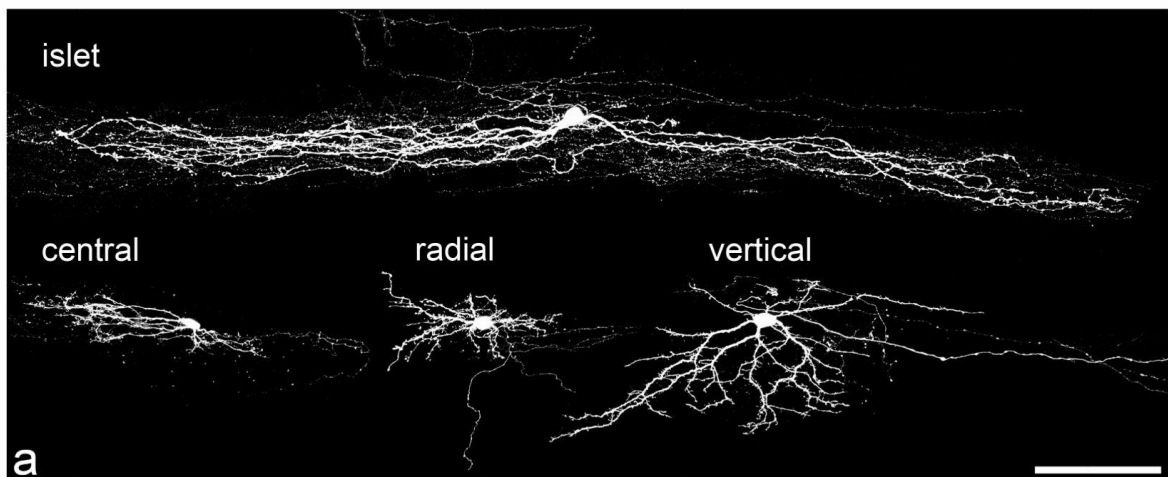
Les couches IV et V du sous-noyau caudal la couche magnocellulaire (Fukushima, 1979)

#### 4.1.2. LES INTERNEURONES

Les interneurones constituent la majorité des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière/du sous-noyau caudal. Ils sont distingués en fonction : (1) de leur rôle excitateur ou inhibiteur, (2) de leur aspect morphologique ou (3) de leurs caractéristiques neurochimiques.

- 1- Des interneurones excitateurs glutamatergiques sont très présents dans la couche II. Des interneurones GABAergiques représentent respectivement 25, 30 et 40% des neurones des couches I, II et III. Des neurones glycinergiques sont peu présents dans les couches I et II mais très présents dans la couche III. Des interneurones à la fois glycinergiques et GABAergiques sont présents dans les couches I à III.
- 2- Au niveau de la couche I, les interneurones sont divisés en trois groupes en fonction de leur morphologie : pyramidal, fusiforme et multipolaire (Han et al., 1998). Leur analyse est difficile car la distinction entre les neurones de projection et les interneurones n'est pas encore claire. Au niveau de la couche II, ils ont été divisés, par Grudt et Perl, en 4 groupes en fonction de la morphologie de leurs dendrites (les neurones en îlot, centraux, verticaux et radiaux) (**Figure 7**).
- 3- Les neurones en îlot présentent une arborescence dendritique s'étirant sur plus de 400µm selon l'axe rostro-caudal avec de petites extensions dorso-ventrales ou médio-latérales. Les neurones centraux sont similaires mais avec une arborescence plus courte (<400µm). Les neurones radiaux ont une arborescence dendritique compacte qui s'étire dans toutes les directions. Les neurones verticaux ont un soma qui se situe dorsalement et des dendrites qui s'étalent comme un éventail ventralement. Il existe une corrélation entre l'aspect morphologique des neurones et les neurotransmetteurs qu'ils libèrent. Les neurones en îlot sont GABAergiques. Les neurones radiaux et la plupart des neurones verticaux sont glutamatergiques. Les neurones centraux sont des deux types. Il existe environ 30% de neurones non classés (Todd, 2010).
- 4- L'analyse neurochimique des neurones de la corne dorsale a montré que certains neuropeptides leurs sont spécifiques. La somatostatine, la neurotensine, la substance P et la neurokinine B sont électivement trouvés dans les neurones excitateurs glutamatergiques. Le neuropeptide Y et la galanine sont spécifiques des neurones inhibiteurs GABAergiques. Deux protéines de fixation du calcium (la calbindin et la calretinin) et l'isoforme  $\gamma$  de la

protéine kinase C ( $PKC\gamma$ ) sont essentiellement trouvées dans les neurones glutamatergiques. Par contre, l'enképhaline et la dynorphine sont exprimées à la fois dans les neurones excitateurs et inhibiteurs. La parvalbumine (protéine de fixation du calcium) et l'oxyde nitrique synthase neuronale (nNOS) sont retrouvées dans des populations de neurones à la fois GABAergiques et glycinergiques (Todd, 2010).



**Figure 7 : classification morphologique des interneurones de la couche II**

Image au microscope confocal de 4 neurones typiques de la couche II marqués à la Neurobiotine. Les neurones correspondent à ceux décrits par Grudt et Perl. Les neurones en îlot présentent une arborescence dendritique s'étirant sur plus de 400 $\mu$ m selon l'axe rostro-caudale avec de petites extensions dorso-ventrales ou médio-latérales. Les neurones centraux sont similaires mais avec une arborescence plus courte (<400 $\mu$ m). Les neurones radiaux ont une arborescence dendritique compacte qui s'étire dans toutes les directions. Les neurones verticaux ont un soma qui se situe dorsalement et des dendrites qui s'étalent comme un éventail ventralement (*D'après Todd, 2010*).

#### 4.1.3. CARACTERISTIQUES FONCTIONNELS DES NEURONES

Trois types de neurones sont clairement identifiés au niveau du sous-noyau caudal : les neurones nociceptifs spécifiques (NS), les neurones à convergence ou wide dynamic range (WDR) et les neurones non-nociceptifs. Les neurones NS répondent essentiellement aux stimulations nociceptives et sont plutôt localisés dans les couches I et II ; leur activité n'est quasiment pas modifiée par l'intensité du stimulus. Les neurones WDR répondent d'abord à

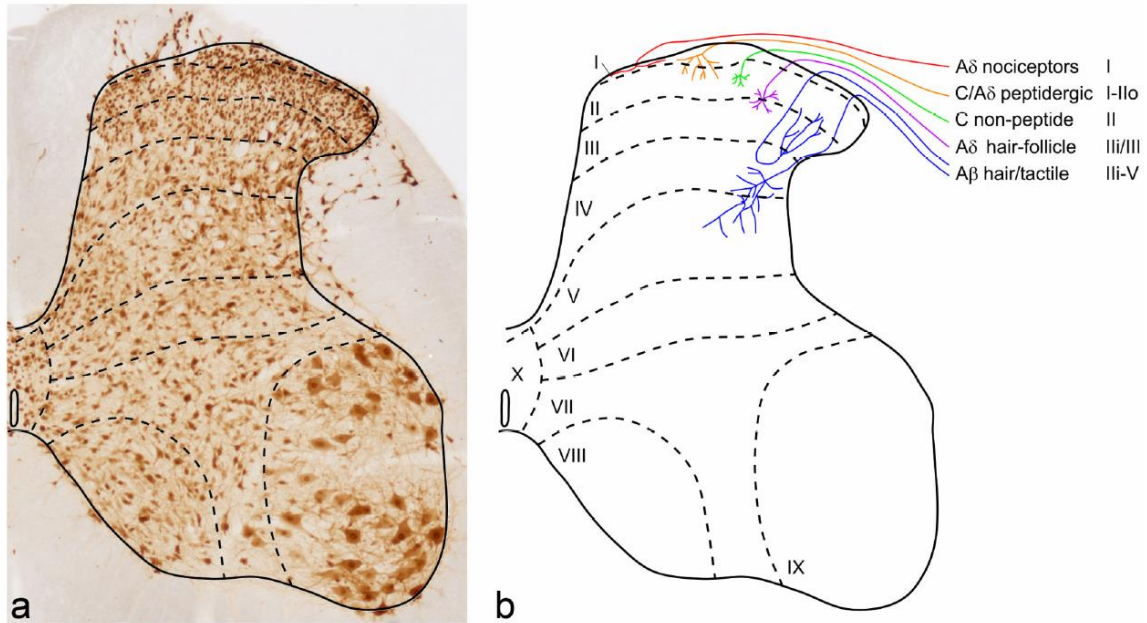
la mise en jeu des fibres myélinisées non nociceptives de type  $A\beta$  puis, pour des intensités de stimulation plus fortes, à celles des fibres de petit diamètre  $A\delta$  et C, par voie polysynaptique. Ils codent pour l'intensité des stimulations électriques ou mécaniques appliquées sur leur champ récepteur. (Dallel et al., 1999). Ils sont principalement localisés au niveau des couches profondes III-V. Les propriétés des champs récepteurs des neurones WDR et NS sont différentes. Les champs récepteurs des neurones WDR sont plus larges et leur centre est sensible aux stimuli non nociceptifs (Iwata et al., 2011).

Les neurones non-nociceptifs sont sensibles exclusivement au tact léger et ont des champs récepteurs étroits au niveau de la peau et des muqueuses oro-faciales. Ils se localisent principalement au niveau des couches III-V (Sessel et al., 2000).

#### 4.2. PROJECTIONS DES AFFERENCES PRIMAIRES

Les afférences primaires projettent au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière où se fait le premier relais avec les neurones de second ordre : interneurones ou neurones de projection. Le marquage spécifique des différentes fibres afférentes a permis de voir une somatotopie et une distribution laminaire en fonction du diamètre et du type de fibres (**Figure 8**) (Todd, 2010 ; Li et al, 2011) :

- les fibres  $A\beta$  projettent majoritairement dans les couches III à V avec des extensions dans la couche IIi.
- les afférences primaires des mécano-récepteurs à bas seuil  $A\delta$  ( $A\delta$ -LTMR) projettent surtout au niveau des couches IIi et III.
- les afférences primaires des mécano-récepteurs à bas seuil C (C-LTMR) projettent au niveau de la couche IIi.
- les afférences primaires nocicepteurs  $A\delta$  projettent majoritairement dans la couche I et IIe.
- les fibres peptidergiques C projettent dans les couches I et IIe avec quelques fibres qui pénètrent plus profondément.
- les fibres non peptidergiques C projettent dans la couche IIi.



**Figure 8 : organisation laminaire de la corne dorsale de la moelle épinière avec schématisation des projections des afférences primaires en fonction des couches.**

a. Section transverse au niveau de la moelle lombaire de rat immunomarquée par l'anticorps neurone spécifique anti-NeuN. Les pointillés reflètent les changements de densité et de morphologie des neurones permettant d'individualiser différentes couches.

b. Les fibres A $\beta$  du tact projettent majoritairement au niveau des couches III à V avec des extensions dans la couche III.

Les fibres A $\delta$  en provenance des follicules pileux arborisent surtout de part et d'autre de la jonction entre couche II et III.

Les nocicepteurs A $\delta$  se terminent principalement au niveau de la couche I.

Les afférences primaires peptidergiques C et certains nocicepteurs A $\delta$  projettent dans les couches I et IIo.

Les afférences primaires non-peptidergiques C projettent au niveau de la partie centrale de la couche II.

(Schéma d'après Todd, 2010)

#### 4.3. LES NEURONES DE PROJECTION

Les neurones de projection des couches I et V constituent les projections majeures vers les noyaux thalamiques (Basbaum et Jessel, 2000) et sont à l'origine des voies ascendantes principales.

Ces neurones de projection sont divisés en trois populations :

- les neurones nociceptifs spécifiques (NS), principalement localisés dans la couche I de la moelle. Ils répondent à des stimulations nociceptives mécaniques ou thermiques (Basbaum et Braz, 2010). Leurs champs récepteurs sont de petite taille. Ils ne sont activés que par les fibres C et A $\delta$ .

- les neurones nociceptifs non spécifiques ou WDR sont principalement localisés dans la couche V. Ils répondent aussi bien à des stimuli mécaniques légers non nociceptifs qu'à des stimuli nocifs mécaniques ou thermiques. Leurs champs récepteurs cutanés présentent un gradient de sensibilité : dans leur partie centrale tous les stimuli, nociceptifs ou non, activent le neurone, par contre dans la zone périphérique, seuls les stimuli nociceptifs véhiculés par les fibres C et A $\delta$  activent le neurone WDR (Basbaum et Braz, 2010).

## 5. CONTROLE DE LA DOULEUR

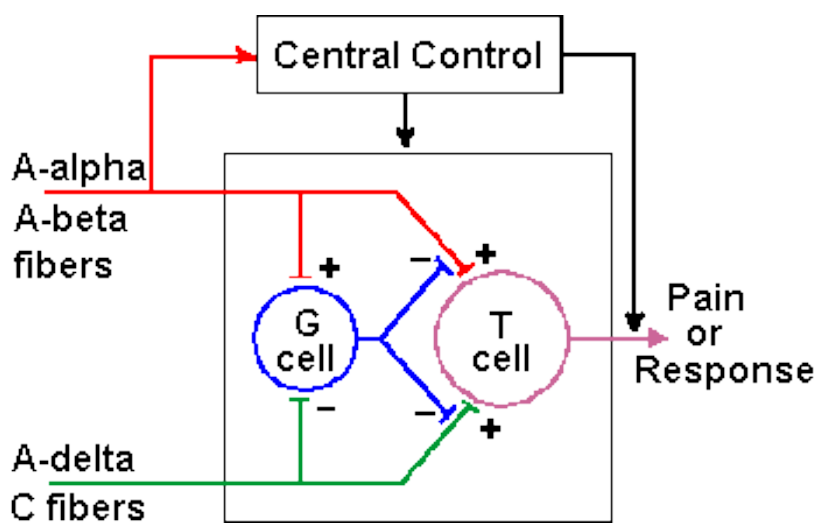
La corne dorsale de la moelle épinière est un lieu majeur de la modulation du message nociceptif. C'est à son niveau que se fait le contrôle segmentaire et qu'agissent les voies descendantes d'origine supra-segmentaire.

### 5.1. CONTROLE SEGMENTAIRE : LA THEORIE DU « PORTILLON » ET L'ANALGESIE MORPHINIQUE

En 1965, en collaboration avec le neurophysiologiste Patrick Wall, Ronald Melzack a formulé la théorie de porte ou de portillon (gate control theory of pain) (Melzack et Wall, 1965) (**Figure 9**). Au niveau de la corne dorsale, les neurones WDR de la couche V reçoivent des informations excitatrices nociceptives en provenance des fibres A $\delta$  et C, des informations excitatrices non-nociceptives des fibres A $\beta$  et des informations en provenance des interneurons de la couche II. Ces interneurons ont pour fonction de réguler l'accès des informations sensorielles issues de la périphérie vers les neurones WDR par un mécanisme inhibiteur pré-synaptique. L'activation des fibres A $\delta$  et C, déprime le tonus inhibiteur de l'interneurone et ouvre le portillon. L'information nociceptive passe alors vers les neurones WDR puis rejoint les structures supra-segmentaires. A l'inverse, l'activation des fibres A $\beta$  augmente l'activité de cet interneurone inhibiteur et ferme le portillon : l'information nociceptive ne passe plus. Ces mécanismes sont soumis à des contrôles d'origine supra-spinale. De façon empirique, chacun a expérimenté une réduction de la sensation douloureuse après une pique ou un coup en frottant la zone traumatisée. Bien qu'aujourd'hui controversé, ce circuit de modulation de la douleur est utilisé en médecine afin de réduire certaines douleurs chroniques, c'est la neurostimulation transcutanée des nerfs périphériques médullaires ou TENS (transcutaneous electrical nerve stimulation). Elle réduit la perception de la douleur aigüe en se basant sur la théorie du portillon à condition d'appliquer la neurostimulation sur le même dermatome et de façon ipsilatérale (Vassal et al., 2013).



Les couches dorsales de la moelle épinière sont riches en récepteurs opioïdes situés entre autres sur les terminaisons centrales des afférences primaires. Les interneurones possèdent également des ligands endogènes des récepteurs opioïdes (enképhaline et dynorphine). Les mécanismes sont mal connus mais leurs applications cliniques sont largement exploitées. Les injections péri-durales ou intrathécales de morphine entraînent une dépression directe de la transmission des messages nociceptifs dès l'étage médullaire avec un soulagement de longue durée et peu d'effets secondaires (Le Bars et Willer, 2004).



**Figure 9: théorie du « gate control ».** Théorie énoncée par Melzack et al. en 1965. Dans ce schéma, un neurone central reçoit à la fois un contact par des fibres nociceptives et un contact par des fibres non nociceptives. Un interneurone situé entre les deux dans la substance gélatineuse (G cell) permet de réduire l'activité des neurones de transmission (T cell) par des stimulations non nociceptives ou au contraire faciliter son excitation par des stimulations nociceptives (*d'après Melzack et Wall, 1965*).

## 5.2. LES CONTROLES INHIBITEURS DIFFUS INDUITS PAR STIMULATION NOCICEPTIVE (CIDN)

Selon le modèle décrit par Le Bars (1979), une stimulation nociceptive périphérique active les voies ascendantes de la douleur. En réaction, un système d'inhibition descendant s'active pour moduler la réponse des neurones nociceptifs à une autre douleur. Il est important de noter qu'ici les dermatomes des stimulations douloureuses conditionnantes et test sont différents. Contrairement à la théorie du portillon, les CIDN ne sont pas organisés de façon somatotopique mais diffus et concernent l'ensemble du corps. Ils ne se limitent pas à la région stimulée (Willer et Bouhassirra, 1999). Les voies ascendantes et descendantes de la boucle

sont respectivement localisées dans le cadran ventro-latéral et dans le funiculus dorso-latéral (Willer et Bouhassiria, 1999). La section de la moelle supprime les CIDN suggérant que ce mécanisme implique des structures supra-segmentaires. Les structures cérébrales impliquées dans les CIDN sont localisées au niveau de la partie caudale du bulbe cérébral et impliquent entre autre le sous-noyau réticulaire dorsal (SRD), le noyau parabrachial (Lapirot et al., 2009) et le noyau hypothalamique (Lapirot et al., 2011).

### 5.3. LES VOIES DESCENDANTES

Ces voies descendantes ont été mises en évidence par les travaux de Reynolds (1969). L'implantation d'électrodes déchargeant à 60 cycles/seconde sur 8 rats au niveau de la substance grise du mésencéphale, a provoqué sur 6 rats une analgésie complète avec une absence de réponse aux stimuli nociceptifs. Cinq ans plus tard, Mayer et Liebeskind (1974) ont montré que la stimulation spécifique de la substance grise péri-aqueducule (PAG) était à l'origine de cette inhibition. Ces constatations ont été étendues du rat à l'homme avec des résultats similaires (Hosobuchi et al., 1977). La PAG reçoit des projections directes de l'hypothalamus, du cortex insulaire, du cortex cingulaire antérieur et de l'amygdale. Elle contrôle les transmissions nociceptives par l'intermédiaire de connections aux neurones des régions bulbaire ventro-médiale (RVM) et dorso-latérale du tegmentum pontique qui projettent ensuite aux différents neurones nociceptifs de la corne dorsale.

Deux voies descendantes ont été décrites, la voie GABA-ergique (Fields et al., 2004) et des voies mono-aminergiques (sérotoninergique et noradrénergique et dopaminergique) (Lapirot et al., 2011 ; Abdallah et al., 2013 ; Chebbi et al., 2014)

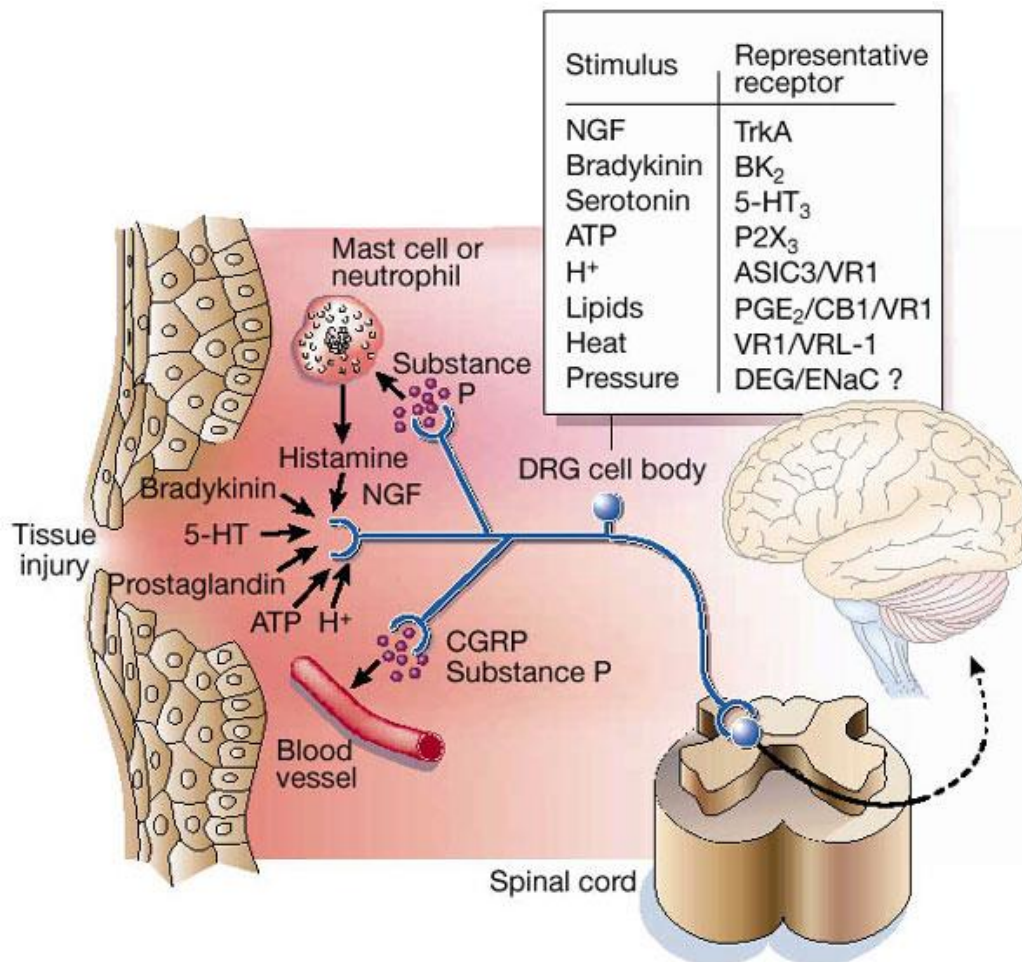
## 6. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DOULEUR

Différents mécanismes peuvent contribuer au passage d'une douleur aiguë à une douleur inadaptée et chronique.

### 6.1. SENSIBILISATION PERIPHERIQUE

Des lésions tissulaires périphériques liées à un acte chirurgical, une infection, un processus tumoral ou une pathologie systémique induisent une modification de l'environnement chimique des fibres nerveuses responsable de la sensibilisation périphérique.

Lors de lésions tissulaires des facteurs endogènes pro-inflammatoires ainsi que des cellules impliquées dans l'inflammation (mastocytes, leucocytes, plaquettes, macrophages, kératinocytes, fibroblastes...) s'accumulent localement. L'ensemble forme la « soupe inflammatoire ». Elle est composée de neurotransmetteurs, de peptides (substance P, CGRP, bradykinine), d'eicosanoïdes et autres substances lipophiles (prostaglandines, thromboxanes, leucotriènes, endocannabinnoïdes), neurotrophines, cytokines, protéases, protons... Or les nocicepteurs expriment à leur surface un ou plusieurs récepteurs capables de reconnaître et de réagir aux substances pro-inflammatoires et pro-algiques. Leur activation entraîne une augmentation de l'excitabilité des fibres nerveuses, accroissant leurs sensibilités thermique et mécanique. La modification d'activité se fait dès la transduction du stimulus et lors de la conduction, **Figure 10** (Pour revue, voir Julius et Basbaum, 2001).



**Figure 10:** réponse aux médiateurs de l'inflammation libérés au niveau de la lésion tissulaire (d'après Julius et Basbaum, 2001).

## 6.2. SENSIBILISATION CENTRALE

L'inflammation et la sensibilisation périphérique n'expliquent pas à elles seules l'ensemble des modifications somesthésiques durables observées chez les patients. En 1983, Woolf (Woolf, 1983) démontre que l'hypersensibilité accompagnant la blessure d'un tissu périphérique était le résultat direct d'une augmentation du signal sensoriel dans le système nerveux central (SNC). En effet, l'activité afférente induite par une blessure périphérique provoque une augmentation de longue durée de l'excitabilité des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière. Cela se manifeste par une diminution du seuil d'excitabilité neuronal (dont le symptôme est l'allodynie), une augmentation de la réactivité lors des stimulations nociceptives (dont le symptôme est l'hyperalgie) ainsi que par un accroissement du champ de réception neuronal (dont le symptôme est l'hyperalgie ou l'allodynie secondaires). Trois principaux mécanismes sont impliqués dans ce processus : 1- l'altération de la transmission glutamatergique, 2- les interactions entre les neurones et la glie, 3- la désinhibition GABAergique et glycinergique.

### 6.2.1. LA SENSIBILISATION GLUTAMATERGIQUE

Le glutamate est un neurotransmetteur excitateur majeur utilisé par les afférences primaires et les neurones intrinsèques de la corne dorsale de la moelle épinière. Les récepteurs ionotropiques glutamatergiques permettent la transmission de l'information sensorielle, dont la nociception, vers les structures supra-segmentaires. Les récepteurs glutamatergiques sont impliqués dans la plasticité à court terme et à long terme. Ils jouent un rôle majeur dans l'hyperalgésie secondaire à une lésion tissulaire ou nerveuse (Larsson, 2009).

#### 6.2.1.1. La potentialisation à long-terme

La potentialisation à long-terme (ou long-term *potentiation*, LTP) est un processus de renforcement synaptique qui correspond à une augmentation de l'amplitude de la réponse post-synaptique suite à une intense activité pré-synaptique, comme par exemple un stimulus à haute fréquence pendant quelques secondes ou tetanus (voir les revues Bliss et Collingridge, 1992 ; Malenka et Nicoll, 1999). Ce processus peut être réversible. La douleur aiguë est signalée par la libération de glutamate au niveau des terminaisons centrales des nocicepteurs qui génère un courant post-synaptique dans les neurones de second ordre de la corne dorsale de la moelle épinière. Le glutamate se fixe sur les récepteurs glutamatergiques ionotropiques

post-synaptiques de type AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate) /kainate et NMDA (N-méthyl-D-aspartate). Dans les conditions basales, lors d'une activité synaptique faible, la dépolarisation postsynaptique n'est pas suffisante pour éliminer l'ion  $Mg^{2+}$  qui bloque le canal NMDA. Par contre, si cette dépolarisation augmente, comme par exemple avec la sommation temporelle lors du tetanus, le  $Mg^{2+}$  est éliminé du canal NMDA : il y a alors un influx d'ions  $Ca^{2+}$  et  $Na^+$  dans le neurone postsynaptique, cette augmentation de  $Ca^{2+}$  postsynaptique déclenche la chaîne de mécanismes moléculaires conduisant à la LTP (voir les revues Bliss et Collingridge, 1992 ; Malenka et Nicoll, 1999). Lors d'une stimulation électrique nociceptive répétée ou lors d'une lésion tissulaire, il y a libération de glutamate et de substance P dans la corne dorsale. Ils activent respectivement les récepteurs AMPA et NMDA et NK-1. Les récepteurs NK-1 sont exprimés au niveau des neurones de projection de la couche I. Il y a un influx entrant massif d'ions  $Ca^{2+}$  conduisant à une série de cascades intracellulaires impliquant les kinases (MAPK, PKA, PKC, PI3K, Src). Cette cascade d'évènements modifie la synthèse protéique (voir les revues de Larsson 2009, Basbaum et Braz, 2010), renforce les connections entre les nocicepteurs et les neurones de second ordre, exacerbe la réponse aux stimuli nociceptifs et génère l'hyperalgésie. Ainsi une stimulation électrique répétée à haute fréquence (100 Hz) des afférences  $A\delta$  entraîne une LTP de la synapse fibre  $A\delta$ -neurone de 2<sup>nd</sup> ordre (Randic et al., 1993). Une stimulation à basse fréquence (2 Hz pendant 2 à 3 min) induit une LTP sélectivement de la synapse fibre C-neurone de projection de la couche I exprimant le récepteur NK-1. Ces neurones projettent au niveau de la substance grise périaqueducule (Ikeda et al., 2003).

#### 6.2.1.2. La plasticité intrinsèque

La plasticité intrinsèque se définit comme un changement de l'excitabilité des neurones. Si l'excitabilité augmente, le neurone répond plus facilement au potentiel d'action afférent. A l'inverse, la diminution de l'excitabilité le rend moins sensible aux potentiels d'actions pré-synaptiques. Dans les deux cas, cela entraînera un changement de la fréquence de décharge du neurone. La propagation du signal nerveux dépend de la composition en canaux ioniques de la membrane plasmique. Un changement qualitatif ou quantitatif des canaux ioniques entraîne un changement du signal électrique.

L'augmentation de façon prolongée d'un courant  $Na^+$  entraîne une augmentation du nombre des canaux sodiques voltage dépendant  $Na_v1.3$ . En cas de lésion du nerf sciatique, lorsque l'hyperalgésie est à son acmé, on retrouve également une augmentation de

l'expression des canaux  $Na_v$  1.3 au niveau des neurones nocicepteurs de la corne dorsale de la moelle épinière.

Au niveau des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière l'activation des protéines kinases A et C réduit le courant à travers les canaux potassiques de type A et augmente l'excitabilité membranaire des neurones. Cela implique la phosphorylation de Kv 4.2 (Todd, 2010). Les souris knock-out pour Kv 4.2 ne présentent plus l'hyperexcitabilité neuronale après l'activation de la voie des kinases (Sandkhüler, 2009).

Une autre voie des kinases semble jouer un rôle dans la plasticité neuronale est celle des Extracellular-Signal-Regulated Kinase (ERK) utilisée en immuno-histochimie. ERK fait partie du groupe des MAP Kinases (Mitogen Activated Protein Kinases). La stimulation nociceptive des tissus périphériques active les voies de la douleur et entraîne la phosphorylation de ERK au niveau des neurones de la corne dorsale. Elle débute 2 minutes après le début de la stimulation (Ji et al., 1999). Au niveau du système nerveux, la phosphorylation de ERK provoque une modification de l'excitation neuronale. Elle est responsable d'une hypersensibilité à court-terme visible dans les ganglions de la racine dorsale (Dai et al., 2002) et au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (Liu, 2004). Elle est également responsable de l'activation de facteurs de transcription de la neurokinine-1 impliqués dans l'installation de la douleur chronique inflammatoire (Liu et al., 2004). La phosphorylation ne se produit pas en cas de stimulation non nociceptive en conditions physiologiques. Mais ERK peut-être phosphorylé en réponse à un stimulus mécanique non douloureux lors d'une désinhibition glycinergique (Miraucourt et al., 2009). Cette phosphorylation se distribue au niveau des couches superficielles (Liu et al., 2004; Miraucourt et al., 2009) mais également dans les couches II<sub>i</sub> et III externe (Miraucourt et al., 2009), révélant tout un réseau neuronal partant des couches profondes vers les couches superficielles en cas d'allodynie mécanique.

#### 6.2.1.3. Le rôle des interactions entre la glie et les neurones

Dans les conditions physiologiques, la microglie est constituée par les macrophages du système nerveux central, elle joue un rôle de sentinelle face aux lésions ou aux infections. En cas de lésion tissulaire, la réaction inflammatoire fait intervenir des polynucléaires neutrophiles, puis des macrophages, qui envahissent rapidement le ganglion dorsal et induisent une activation des cellules gliales dont la microglie et les astrocytes

L'activation de la microglie et des astrocytes s'accompagne de la libération d'un ensemble de molécules dont les cytokines, substances pro-inflammatoires, (TNF- $\alpha$ ,

interleukines -1 $\beta$  et interleukines -6) et de certains marqueurs intracellulaires, dont la protéine fibrillaire acide qui joue un rôle dans la sensibilisation centrale et la persistance de la douleur après une lésion tissulaire (Basbaum et Braz, 2010). L'activation gliale peut être induite par des voies différentes, incluant la libération de substance P et de glutamate par les terminaux des fibres C, ou le NO et les prostaglandines par les neurones des couches médullaires superficielles. La glie activée libère à son tour du NO, des prostaglandines et des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF- $\alpha$ ), or les neurones et la glie expriment les récepteurs de ces substances. Ce sont des médiateurs de la douleur induite aussi bien par l'inflammation que par les lésions du système nerveux. Cette « neuro-inflammation » a un effet neuroprotecteur et neurotrophique favorisant la guérison mais parfois elle crée également des dommages neuronaux qui participent à la genèse de la douleur neuropathique (Garcia-Larrea, et al., 2008).

#### 6.2.2. LA DESINHIBITION GABAERGIQUE ET GLYCINERGIQUE

La corne dorsale de la moelle épinière est le chef d'orchestre du contrôle de la douleur avec tout un système inhibiteur qui repose sur des interneurones et des terminaisons supraspinales. Ce système utilise deux principaux neurotransmetteurs : la glycine et le GABA. Les neurotransmetteurs GABA et glycine sont colocalisés dans certaines synapses, augmentant significativement l'efficacité inhibitrice de ces synapses et renforçant les contrôles inhibiteurs associés à une hypoalgésie. Ils se fixent respectivement sur le récepteur de la glycine (R-Gly) et le récepteur GABA de type A (R-GABA<sub>A</sub>). Ils sont tous les deux formés de 5 sous-unités protéiques formant un canal sélectivement perméable aux ions chlorure (Cl<sup>-</sup>). A l'état physiologique la concentration en ions Cl<sup>-</sup> intracellulaire des neurones de la corne dorsale de la moelle est maintenue faible grâce à l'activité d'un co-transporteur membranaire K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> (KCC2) qui expulse les ions Cl<sup>-</sup> hors de la cellule. La perte de cette inhibition, la désinhibition, est responsable de l'augmentation de la douleur. Elle a été mise en évidence par l'utilisation directe d'antagonistes des récepteurs GABA (la bicuculline) ou glycinergiques (la strychnine) qui produisent un comportement douloureux chez le rat (Sandkhüler, 2009). Des modèles animaux tels que la ligature du nerf sciatique ou la constriction chronique nerveuse ont été mis en place, pour être plus proches de l'homme. Leur analyse électrophysiologique, au niveau de la corne dorsale retrouve une réduction de la conduction des neurones GABAergiques (Sandkhüler, 2009). Moore et al. (2002) retrouvent dans ces modèles une apoptose des interneurones inhibiteurs au niveau des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle ainsi qu'une diminution de la synthèse de GAD (Glutamic Acid

Decarboxylase), enzyme qui catalyse la décarboxylation du glutamate en GABA (Moore et al., 2002). Mais ce résultat a été ultérieurement contesté (Polgar et al., 2005). L'atteinte nerveuse périphérique provoque également une activation de la microglie spinale et la libération de BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) au niveau médullaire, entraînant une sous régulation de KCC2 dans les neurones post-synaptiques de la corne dorsale et une altération du potentiel d'équilibre du chlore dans ces neurones (Coull et al., 2003). La dépression de l'activité de KCC2 et l'augmentation de la concentration en ions  $\text{Cl}^-$  réduisent ou même inversent l'effet inhibiteur post-synaptique (Coull et al., 2005). L'activation des R-GABA<sub>A</sub> ou des R-Gly induit alors une entrée massive d'ions  $\text{Cl}^-$  et une dépolarisation membranaire rapide plutôt qu'une hyperpolarisation.

### 6.2.3. ALTERATION DES VOIES DESCENDANTES DE MODULATION DE LA DOULEUR

Les structures supra-segmentaires modulent l'activité des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière en passant entre autre par la voie descendante sérotoninergique qui prend son origine au niveau de la RVM dans le tronc cérébral (décrite précédemment). Dans les conditions physiologiques, cette voie descendante inhibe la transmission de la douleur en provenance des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière. Mais, cet effet inhibiteur est déprimé lors de lésions des nerfs périphériques. La diminution sélective du taux de sérotonine entre la RVM et la corne dorsale de la moelle épinière augmente le comportement de fuite lors de test au formol, l'hypersensibilité mécanique inflammatoire lors de test au CFA et l'hypersensibilité neuropathique lors de la ligature du nerf sciatique. L'activation de la RVM nécessite des courants en provenance de la corne dorsale de la moelle s'accompagnant de libération de substance P et NK-1, suggérant l'existence d'une boucle sérotoninergique spinal-supra-spinale qui entretiendrait les phénomènes de douleur chronique (Suzuki et al., 2005, Basbaum et Jessel, 2000). A côté de la voie sérotoninergique, le locus coeruleus envoie des efférences noradrénergiques à la corne dorsale de la moelle épinière. Cette catécholamine active les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques qui inhibent la libération de neurotransmetteurs excitateurs permettant de bloquer la voie nociceptive. Ce phénomène disparaît lors de certains modèles neuropathiques s'accompagnant d'une diminution de récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques. Cela s'accompagne d'une perte de l'effet inhibiteur et d'une augmentation de la sensibilité douloureuse (Basbaum et Jessel, 2000).



De façon empirique, l'efficacité contre les douleurs neuropathiques, de l'imipramine (Tofranil), inhibiteur de la capture neuronale des catécholamines et de la sérotonine, a été découverte par Paoli en 1960. Il avait administré de l'imipramine à des patients déprimés souffrant de sclérose en plaque et remarqué, outre une amélioration de leur état dépressif, une réduction de leurs douleurs neuropathiques. Depuis, l'efficacité des antidépresseurs tricycliques a été constatée dans des lésions nerveuses périphériques, notamment la neuropathie douloureuse du diabète et la douleur post-zostérienne et les douleurs centrales de l'accident vasculaire cérébral pour l'amitriptyline (Laroxyl). Les inhibiteurs de recapture de la sérotonine ont en revanche une efficacité plus inconstante. Ainsi la fluoxétine (Prozac) n'est pas supérieure au placebo, alors que l'efficacité de la paroxétine (Deroxat) et du citalopram (Séropram) a été confirmée dans les douleurs neuropathiques du diabète. Un inhibiteur mixte de la noradrénaline et de la sérotonine, la venlafaxine (Effexor), apparaît également prometteur. De façon objective, chez la souris, l'administration répétée d'antidépresseurs tricycliques tel l'amitriptyline (Laroxyl) ou d'antidépresseurs type inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline tel milnacipran (Ixel) ou d'antidépresseurs inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine telle la paroxétine (Deroxat) a montré sur la souris une réduction significative de l'hyperalgésie thermique et de l'allodynie (Matsuzawa et Yanagida, 2008).

## 7. MECANISMES DE LA DOULEUR TRIGEMINALE

Les lésions nerveuses et réactions inflammatoires sont responsables de la sensibilisation périphérique et centrale connue pour générer et maintenir la douleur (Woolf et Salter, 2000). Chacun a déjà été concerné, au niveau de l'extrémité céphalique, soit par un traumatisme (fractures, plaies), soit par un acte chirurgical (traitements dentaires, chirurgie orthognatique ou plastique) soit par une infection (dentaires, sinusiennes, pharyngées, cutanée...) provoquée par des agents viraux (herpès, zona,), bactériens ou mycosiques. Mais, alors que la région oro-faciale est particulièrement exposée, la douleur chronique y est moins fréquente qu'au niveau du reste du corps (7 à 11% : Macfarlane, 2002 ; contre 31,7% : Bouhassira et Attal, 2007) ; cependant lorsqu'elle s'installe, elle prend des proportions dramatiques. Les mécanismes qui sous-tendent la douleur oro-faciale sont encore mal connus et différent en partie de ceux du reste du corps (Hargreaves, 2011). Pour les étudier, deux principaux modèles animaux ont été développés. Les modèles neuropathiques par lésion d'une des branches du nerf trijumeau et les modèles inflammatoires par injection d'une substance pro-inflammatoire (telle que le

formol ou le CFA) au niveau cutané, dentaire ou articulaire (articulation temporo-mandibulaire). Ils se traduisent par des symptômes similaires (douleur spontanée, hyperalgésie, allodynie) mais qui sont induits par des mécanismes sous-jacents différents. En effet, la douleur neuropathique pourrait être définie comme la transmission d'un message erroné vers le système nerveux central du fait d'une altération des systèmes nociceptifs et la douleur inflammatoire comme une stimulation excessive des récepteurs à la douleur due aux médiateurs libérés au cours du processus inflammatoire. Nous allons présenter ces différents mécanismes ci-dessous.

### 7.1. LES MECANISMES DE LA DOULEUR NEUROPATHIQUE

La plupart des changements qui apparaissent après une lésion nerveuse sont adaptés. Ils ont pour rôle : 1- de nettoyer les débris cellulaires ou de myéline, 2- de modifier la qualité et la quantité des récepteurs pour compenser la diminution de l'information, 3- de tempérer la modification des courants ioniques dus à la lésion nerveuse ou au stress métabolique, 4- d'éviter l'apoptose des neurones restants et 5- d'induire la croissance axonale et les connections entre les neurones pour compenser les voies détruites (Benn et Woolf, 2004). Néanmoins un certain nombre d'entre eux sont inadaptées comme la sensibilité anormale et la modification des seuils de réponse aux stimuli à distance de la lésion, la génération de décharges ectopiques, la modification de la conduction, la perte d'inhibition, les troubles de la croissance axonale et les cicatrices au niveau de la glie. Ils sont responsables de la transmission d'un message erroné de la périphérie vers le système nerveux central et d'une modification de l'excitabilité de ce dernier.

#### 7.1.1. LES MECANISMES PERIPHERIQUES.

Au niveau périphérique, les mécanismes impliqués dans l'apparition des douleurs neuropathiques sont liés à la présence d'une activité électrique aberrante, à la sensibilisation des récepteurs nociceptifs et à la présence d'éphapses.

##### 7.1.1.1. Présence d'activités électriques ectopiques

A l'échelle cellulaire, l'enregistrement électrophysiologique des afférences primaires, après constriction chronique du nerf infra-orbitaire, a mis en évidence une diminution du nombre de fibres A $\beta$  et C enregistrées, une modification du phénotype des fibres A $\beta$  et une augmentation d'activité des fibres A $\delta$ . Le seuil d'excitabilité aux stimuli mécaniques des fibres A $\delta$  s'abaisse et elles continuent à décharger à distance d'un stimulus nociceptif. Ces

modifications électriques peuvent expliquer l'apparition d'une douleur de fond, d'accès paroxystiques douloureux, d'une allodynie ou d'une hyperalgésie (Kitagawa et al., 2006, Nakagawa et al., 2010).

Chez l'animal, la lésion du nerf infra-orbitaire provoque immédiatement une douleur de fond qui se complète, autour du 14<sup>ème</sup> jour, d'une allodynie et d'une hyperalgésie. Lors de cette seconde phase, l'analyse de l'expression des différents canaux sodiques dans le ganglion du trijumeau montre une expression de novo de mRNA  $Na_v$  1.3 et une diminution de l'expression de  $Na_v$  1.8 et  $Na_v$  1.9. A la surface des neurones nociceptifs et des neurones mécano-sensibles non lésés, on constate en plus, une redistribution des canaux  $Na_v$  1.8 (Eriksson et al., 2005). L'injection de fluorogold dans la lèvre inférieure, également 14 jours après section du nerf alvéolaire inférieur, montre que plus de la moitié des neurones du ganglion du trijumeau sont marqués et que ce marquage augmente par rapport aux premiers jours après la chirurgie (Nakagawa et al., 2010). Il y a donc une réinnervation de la région sous-mentale. Elle s'accompagne d'une augmentation du nombre de canaux sodiques sensibles et résistants à la tétrodoxine et d'une diminution des canaux potassiques voltage dépendant. Ces modifications canalaire entraînent une diminution du potentiel membranaire de repos et une hyperexcitabilité membranaire des neurones lésés (Nagawa et al., 2010). Elles se traduisent par une augmentation de l'excitabilité des afférences nerveuses du trijumeau et par des décharges ectopiques au niveau du tronc nerveux, des corps cellulaires situés dans le ganglion sensitif et au niveau des plaques de démyélinisation.

Les modifications des flux électriques impliquant les canaux potassiques ne se limitent pas à la branche lésée. Chez des rats avec transection du nerf alvéolaire inférieur, l'association d'enregistrements électrophysiologiques et d'études de patch-clamp au niveau du ganglion du trijumeau a montré une modification de l'activité des fibres A et de leurs courants potassiques pour le territoire du nerf infra-orbitaire. Cette approche a objectivé une extension du territoire douloureux au niveau du ganglion du trijumeau (Tsuboi et al., 2004).

#### 7.1.1.2. La sensibilisation des récepteurs nociceptifs.

La sensibilisation des récepteurs nociceptifs se traduit par une diminution du seuil d'activation de ces récepteurs, une augmentation de leurs réponses aux stimulations supraliminaire, ainsi que par l'apparition d'activité spontanée. Cette sensibilisation serait en grande partie liée à l'accumulation de neuropeptides (tels que la substance P, neurokinine A et la CGRP) et de facteurs neurotrophiques ou neurostimulateurs (ATP) au niveau du ganglion du trijumeau après lésion du nerf (Iwata et al., 2011).

La substance P est présente en plus grande quantité au niveau du ganglion du trijumeau qu'au niveau des ganglions des racines dorsales (Hargreaves, 2011). Elle fait l'objet de multiples études sur son implication dans la douleur trigéminal. Les travaux de Teodoro et al. (2012) ont montré que l'injection de substance P au niveau de la lèvre supérieure induit électivement une hyperalgésie au chaud chez un rat naïf. A l'inverse l'injection systémique d'un antagoniste spécifique des récepteurs NK1 chez un rat neuropathique après constriction du nerf infra-orbitaire induit une régression de l'hyperalgésie au chaud, mais pas au froid ou à une stimulation mécanique. Ceci confirme l'implication de la substance P et de son récepteur NK1 dans la douleur neuropathique.

L'Adenosine-5-triphosphate (ATP) est considérée comme une source d'énergie pour les processus biochimiques intracellulaires et comme un important neuro-stimulateur extracellulaire. Il active entre autre la famille des récepteurs P2X dont P2X<sub>3</sub>. P2X<sub>3</sub> est exprimé préférentiellement au niveau du corps cellulaire et des terminaisons périphériques des fibres afférentes de petit diamètre. L'étude de Shinoda *et al.* (2007) a montré, après ligature du nerf infra-orbitaire, une augmentation significative des cellules P2X<sub>3</sub> R positives parmi les neurones de petit diamètre mais pas parmi les neurones de moyen ou de gros diamètre ainsi qu'une augmentation de l'expression des mRNA P2X<sub>3</sub> dans le ganglion trigéminal au niveau des corps cellulaires des neurones non lésés. Cette double modification de l'expression de récepteurs P2X<sub>3</sub> montre l'implication de P2X<sub>3</sub> et de l'ATP dans la douleur neuropathique.

#### 7.1.1.3. Rôle de la glie

La glie joue un rôle important dans la cicatrisation après lésion d'un nerf périphérique. Elle sécrète pour cela le « glial cell line-derived neurotrophic factor » (GDNF). GDNF agit sur la sécrétion de molécules telles CGRP, IB4 et NF200 qui jouent un rôle dans la modulation de la douleur et la modification du phénotype des neurones sensitifs (Chao et al., 2008). Or le ganglion trigéminal est plus riche en neurones myélinisés que le reste du corps. Il est donc encore plus exposé aux modifications d'activité des cellules gliales après ligature ou constriction des branches du nerf trijumeau. Le marqueur immuno-histochimique des cellules gliales est la « glial fibrillary acid protein » (GFAP) qui n'est détectable dans les cellules gliales du ganglion du trijumeau qu'après une lésion nerveuse. L'augmentation de la GFAP semble liée à une augmentation de libération du glutamate dans le ganglion sensoriel, elle-même liée à l'augmentation des décharges électriques neuronales. Une partie des modifications constatées au niveau des afférences primaires, telles que la modification du nombre et du phénotype des canaux sodiques et potassiques ainsi que de leurs courants, des

récepteurs de la famille P2X, la libération excessive de substance P et CGRP se produisent au niveau des cellules de la glie. L'interaction entre la glie et les afférences primaires se fait de façon paracrine ou par l'intermédiaire de pores perméables au calcium. On peut donc penser, qu'au niveau du système trigéminal, les cellules gliales puissent activer les neurones du ganglion du trijumeau et provoquer une douleur anormale au niveau oro-facial (Chiang et al., 2011).

#### 7.1.1.4. Présence de connections anormales entre les fibres.

Les éphapses sont de véritables courts-circuits entre les fibres. Plusieurs hypothèses sont proposées. 1- La lésion du nerf alvéolaire inférieur entraîne une démyélinisation et les potentiels d'actions arrivent ainsi à activer directement les fibres adjacentes intactes (Iwata et al., 2011). 2- Les fibres sensibles démyélinisées semblent pouvoir émettre au niveau de leurs axones des collatérales qui vont contacter par l'intermédiaire de synapses les terminaisons nerveuses des fibres intactes (Ueda, 2006), c'est la « théorie du sprouting ». Ces modifications seraient responsables de la transformation du tact en douleur ou de l'apparition des sensations douloureuses dans un territoire situé à distance du nerf lésé.

### 7.1.2. LES MECANISMES CENTRAUX DE LA DOULEUR NEUROPATHIQUE ORO-FACIALE

L'activation intense des neurones nociceptifs du caudalis modifie l'excitabilité des neurones nociceptifs segmentaires et supra-segmentaires.

#### 7.1.2.1. La sensibilisation centrale

Il s'agit de mécanismes conduisant à la présence d'une hyperexcitabilité des neurones nociceptifs du caudalis. L'enregistrement électrophysiologique des neurones WDR et NS au niveau du caudalis après section du nerf alvéolaire inférieur montre une modification franche de l'activité des neurones WDR à la différence des neurones NS. L'intensité de la réponse des neurones WDR lors de stimulations thermiques chaudes ou froides est augmentée et leur champ récepteur élargi (Iwata et al., 1999). Toujours au niveau du caudalis, mais après régénérescence du nerf alvéolaire inférieur, les neurones WDR et LTMR présentent une augmentation de leur excitabilité. Cela suggère l'implication des neurones WDR et LTMR dans l'apparition et la persistance de la douleur neuropathique oro-faciale.

Au niveau du caudalis, les récepteurs NMDA, AMPA, kainate et mGluR (G-protein coupled metabotropic) sont naturellement impliqués dans la transmission de l'information douloureuse (Miyamoto et al., 2011, Iwata et al. 2011).

La voie des mitogen-activated protein kinases (MAPK), voie de transduction cellulaire impliquant ERK au niveau des neurones, joue aussi un rôle dans la sensibilisation centrale trigéminal. Suzuki *et al.*, (2013) ont mis en évidence une hyperalgésie aux stimuli mécaniques et thermiques sur la lèvre supérieure des rats après constriction chronique du nerf infra-orbitaire. Ce comportement s'associe à une augmentation ipsilatérale de la phosphorylation de ERK (phospho-ERK) au niveau du sous-noyau caudal. Normalement phospho-ERK ne se produit que pour des stimuli mécaniques ou thermiques nociceptifs. L'injection intrathécale d'un inhibiteur de MEK1 entraîne une diminution du comportement nociceptif et de la phosphorylation de ERK pour des stimuli nociceptifs thermiques. Le bruit de fond, les décharges ectopiques et les réponses des neurones WDR suite aux stimulations douloureuses mécaniques et thermiques sont également fortement diminuées après injection d'un inhibiteur de MEK1 alors que les réponses aux stimuli non nociceptifs mécaniques et chimiques sont maintenues. Les neurones immuno-réactifs à pERK semblent impliqués dans l'hyperalgésie thermique présente dans la douleur neuropathique du nerf trijumeau.

#### 7.1.2.2. Les modifications histologiques

Les lésions nerveuses périphériques induisent une modification de la topographie des terminaisons centrales des afférences primaires et des neurones du complexe sensitif du trijumeau. Après section d'un nerf périphérique, les afférences de gros diamètre A $\beta$  qui véhiculent les messages non nociceptifs et se terminent dans les couches III-IV, envoient des ramifications vers la couche II du sous-noyau caudal. Les neurones de la couche II normalement exclusivement activés par des stimulations nociceptives seraient, dans ces conditions, activés par des stimulations non nociceptives. Cette réorganisation semble être responsable de certains symptômes douloureux tels que l'allodynie.

Par ailleurs, la stimulation excessive des récepteurs NMDA à cause de l'activation permanente des fibres de petit diamètre (sous forme de décharges ectopiques) induirait des effets excitotoxiques provoquant la lyse des interneurones inhibiteurs locaux. L'altération des systèmes de contrôle entraînerait une augmentation de l'excitabilité des neurones, engendrant encore une fois un phénomène d'amplification auto-entretenu. L'administration de NGF empêche ces remaniements histologiques, impliquant un nouveau facteur dans la modulation de la douleur neuropathique (Dallel et Voisin, 2007).

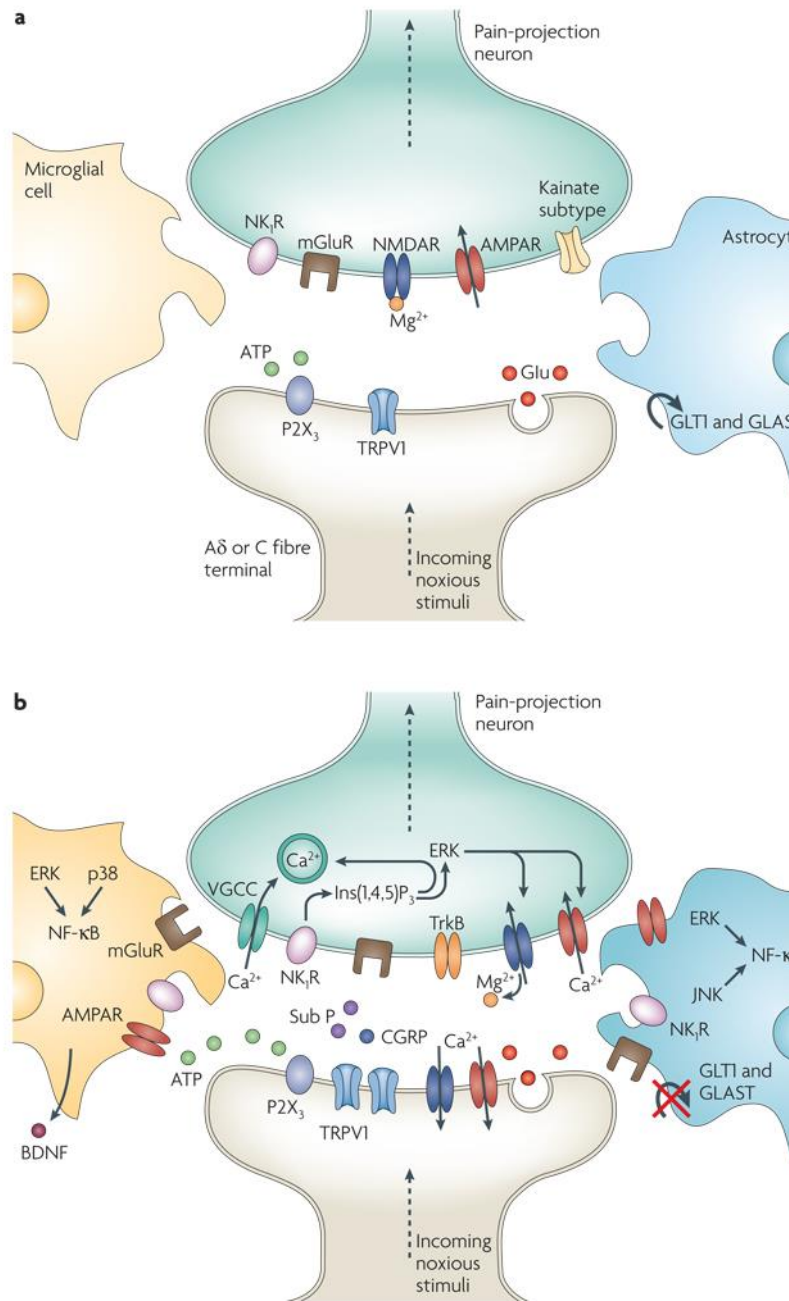
### 7.1.2.3. L'altération des systèmes de modulation

En condition physiologique, au niveau du noyau spinal du trijumeau, de puissants mécanismes inhibiteurs permettent de focaliser les messages nociceptifs provenant de la périphérie afin de produire une réponse adaptée.

### 7.1.2.4. Le rôle de la glie dans les mécanismes de la nociception centrale.

Au niveau du système nerveux central, les astrocytes et la microglie peuvent être activés par une lésion du SNC et SNP. Elles interagissent entre elles pour accroître la réponse douloureuse secondaire à une lésion nerveuse. Par contre la lésion de la glie sans lésion nerveuse ou réaction inflammatoire associées, ne provoque pas d'allodynie ou d'hyperalgésie (Chiang et al., 2011).

Actuellement, il est difficile de distinguer les effets d'une lésion nerveuse ou d'une réaction inflammatoire périphérique sur la glie au niveau du SNC. On sait seulement que la sensibilisation centrale altère de façon durable l'activité des neurones au niveau segmentaire et que cette altération induit une modification d'activité des astrocytes. Les astrocytes répondent à l'hyperexcitabilité neuronale en mobilisant leur  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Ceci entraîne une libération de glutamate, d'ATP, de  $TNF\alpha$ , d'interleukine  $1\beta$  (Il- $1\beta$ ), d'oxyde nitric (NO) et de prostaglandine  $E_2$  qui sont des médiateurs de l'inflammation. L'activation de la microglie conduit aussi à la libération de médiateurs de l'inflammation et à maintenir l'activation des astrocytes (Milligans et Watkins, 2009). Les neurotransmetteurs et neuromodulateurs libérés lors d'une lésion nerveuse périphérique altèrent la réponse normale de la microglie et des astrocytes. Dans ces conditions neuropathiques, la glie libère aussi des signaux neuroexcitateurs tels Il- $1\beta$ ,  $TNF\alpha$  et des substances telles que la substance P, le glutamate, le NO et l'ATP ; or leurs récepteurs sont des acteurs clés de la douleur neuropathique. L'ATP produite par les neurones active les récepteurs ionotropiques purinergiques P2X, qui provoquent la libération d'ATP et de BDNF par la microglie, provoquant une dépolarisation qui inverse la polarité des courants activés par le neurotransmetteur inhibiteur GABA au niveau des neurones segmentaires. Astrocytes, microglie et neurones nociceptifs se renvoient des messages qui amplifient la réaction douloureuse et semble l'entretenir. Ces voies de communication entre la microglie et les neurones pourraient être une cible thérapeutique contre l'installation de la douleur neuropathique (Coull et al., 2005), (**Figure 11**).



**Figure 11 : molécules impliquées dans la douleur et la sensibilisation centrale.**

a : dans les conditions physiologiques, l'activation à basse fréquence des fibres nociceptives Aδ et C par des stimuli peu nocifs conduit à la libération de glutamate (Glu) au niveau présynaptique des terminaisons centrales des afférences primaires présynaptiques de la corne dorsale de la moelle. Il en découle une activation de courte durée des récepteurs ionotropiques du glutamate de type AMPA et kainate. Les récepteurs de type NMDA restent silencieux car



ils sont bloqués par un ion  $Mg^{2+}$ . Ces neurones de projection au niveau de la corne dorsale fournissent des informations sur l'apparition, la durée et l'intensité des stimuli nocifs périphériques. Les astrocytes et la microglie restent inchangés par ces événements synaptiques.

b : en cas de stimulation nociceptive répétée et de forte intensité, il se produit une augmentation de la réactivité des neurones de la corne dorsale, c'est la sensibilisation centrale. Ceci s'accompagne d'une co-libération de glutamate et de neurotransmetteurs tels que la substance P et la CGRP qui entraînent l'activation de récepteurs NMDA. Ceci conduit à la création de courants  $Ca^{2+}$  voltage-dépendants (VGCCs). En outre, la voie de signalisation de l'inositol-1,4,5-triphosphate et la voie des MAP kinases avec la phosphorylation de ERK, p38 et c-Jun N-terminal kinase (JNK) sont activées. De plus phospho-ERK peut sensibiliser les récepteurs AMPA et NMDAR. L'activation de purino récepteurs (P2X3) par l'ATP, l'activation de récepteurs NK1 par la substance P, l'activation des récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) et la libération de BDNF contribuent à renforcer la transmission nociceptive. De plus, les astrocytes et la microglie expriment différents récepteurs au glutamate, à l'ATP et à la substance P.

Au niveau des synapses, les transporteurs de glutamate : glutamate transporteur1 (GLT1) et glutamate-aspartate transporteur (GLAST) sont cruciaux pour évacuer le glutamate de la fente synaptique. Après une exposition prolongée au glutamate, ce système se dérégule. L'activation prolongée au niveau de la synapse, qui en découle, provoque une activation de pERK, de p38 et de JNK dans la microglie et les astrocytes. Chacune de ces kinases peut activer le facteur de transcription nucléaire facteur-kB (NF-kB) qui induit la synthèse de facteurs pro-inflammatoires. La libération de facteurs pro-inflammatoires provoque une activation excessive du récepteur TRPV1 qui participe à la sensibilisation centrale.

*(d'après Milligans et Watkins, 2009)*

## 7.2. LES MECANISMES DE LA DOULEUR CHRONIQUE INFLAMMATOIRE

La région oro-faciale est hautement pourvoyeuse de douleurs inflammatoires de type pulpite, cellulite et arthrite chronique. Ces différents processus s'accompagnent de la libération des médiateurs chimiques de l'inflammation produits par les mastocytes, macrophages et cellules immunitaires ou produits par les terminaisons des afférences primaires. Ces médiateurs sont actifs sur les terminaisons nerveuses des afférences primaires des nocicepteurs. Ils agissent sur les récepteurs et les canaux ioniques membranaires mais également peuvent modifier la transduction cellulaire en activant des seconds messagers ou en activant les voies de signalisation intracellulaire. Les terminaisons nerveuses des afférences primaires oro-faciales et leurs corps cellulaires au niveau du ganglion du trijumeau sont soumises à des modulations provenant des systèmes nerveux, immunitaire, cardiovasculaire et endocrinien qui peuvent eux-mêmes fluctuer sous l'effet de l'inflammation (Matthews et Sessle, 2008).

### 7.2.1. MECANISMES PERIPHERIQUES

Certains neurones nocicepteurs ne répondent qu'à une stimulation des champs récepteurs mécaniques cutanés ou muqueux. Ils sont précis pour localiser, détecter et discriminer les stimuli nociceptifs superficiels. Mais d'autres peuvent également être activés par des messages en provenance de la pulpe dentaire, de l'articulation temporo-mandibulaire, des muscles masticateurs et de la vascularisation cérébrale. Ces derniers sont responsables de la difficulté clinique à localiser la douleur des tissus profonds de la tête ou de la pulpe dentaire. Ils jouent un rôle dans la sensibilisation centrale. L'application d'irritants (capsaïcine ou huile de moutarde) sur ces différents tissus déclenche des réactions similaires : les terminaisons périphériques des afférences primaires lésées abaissent leur seuil d'activation, par l'intermédiaire des médiateurs chimiques. Ce phénomène s'étend même aux fibres avoisinantes. Ces modifications entraînent une hyperalgésie voire des douleurs spontanées. C'est la sensibilisation. Elle se traduit à l'échelle cellulaire par une modification du phénotype ; c'est-à-dire par une modification de l'expression de certains récepteurs ou canaux ioniques ( $Na_v$ ) et par la transcription de neuropeptides tel le BDNF responsables de la sensibilisation périphérique et centrale. Les médiateurs de l'inflammation agissent sur ces récepteurs et entretiennent la sensibilisation (Sessle, 2011). Comme pour la douleur neuropathique, les cellules de la glie jouent aussi un rôle primordial dans l'installation et le maintien de la douleur inflammatoire.

Une partie des mécanismes impliqués dans la douleur inflammatoire sont communs au corps et à l'extrémité céphalique. Les spécificités oro-faciales sont probablement liées à la nature des tissus innervés et aux protocoles utilisés pour les analyser. Passons en revue ces particularités :

#### 1- La peau, la cornée et les muqueuses.

Elles sont innervées par des nocicepteurs sensibles aux irritants ; cette caractéristique a permis de développer plusieurs protocoles (Sessel, 2011). Pour les modèles de douleur aigue, l'application sur la peau ou la cornée de capsaïcine (8-méthyl-N-vanillyl-6-nonénamide) active les afférences nociceptives trigéminales impliquant les canaux ioniques TRPV1. Cette activation se traduit par un comportement douloureux exclusivement de type allodynie mécanique et hyperalgésie thermique ; la capsaïcine en agissant sur les récepteurs TRPV1 des terminaisons des fibres C peptidergiques et certaines fibres A $\delta$  (Honda et al., 2008). En plus de son action directe sur les récepteurs TRPV1, elle provoque une réaction inflammatoire responsable de la sensibilisation des terminaisons périphériques des afférences primaires C et A $\delta$ . La sensibilisation induit aussi une allodynie mécanique et une hyperalgésie. Par contre, lorsqu'une lésion cutanée péri-orale est suivie d'une injection de capsaïcine dans les tissus profonds (tel que l'articulation temporo-mandibulaire), la sensibilisation centrale liée aux incisions cutanées diminue et la sensibilisation centrale habituellement provoquée par l'injection de capsaïcine n'apparaît pas. La stimulation douloureuse intense entraîne la libération d'acides aminés excitateurs (tels que le glutamate) qui provoque à son tour la libération d'acides aminés inhibiteurs (tels que la sérine) activant une voie inhibitrice endogène segmentaire ou supra-segmentaire caractéristique du système trigéminal (Lam et al., 2008).

Par contre, comme pour le reste du corps, pour les modèles de douleur chronique, l'injection de CFA au niveau de la lèvre supérieure du rat induit une réaction inflammatoire avec une allodynie mécanique statique qui dure au moins 28 jours et une hyperalgésie thermique de plus de 14 jours mettant en jeu les canaux Na<sub>v</sub> 1.8 résistants à la tétrodoxine (Morgan et Gebhart, 2008).

#### 2- La dent.

La dent est une spécificité structurelle de la région oro-faciale. Le fait que la pulpe soit richement innervée et encapsulée dans une structure inextensible tend à la rendre plus sensible à la douleur inflammatoire et en fait un très bon modèle d'étude. En effet, l'inflammation

entraîne toujours un œdème qui va s'associer à une compression des fibres nerveuses dans la chambre pulpaire et activer les récepteurs mécano-sensibles. De plus, le processus qui amène à la carie fait baigner la dent dans un environnement propice à une sensibilisation : une invasion bactérienne qui entraîne une lyse de la dent, puis une réaction inflammatoire libérant des médiateurs de l'inflammation et activant les cellules immunitaires. Ces phénomènes s'accompagnent d'une modification phénotypique des terminaisons nerveuses qui innervent la dent avec des phénomènes de sprouting, de modification d'expression des neuropeptides entraînant une augmentation des champs récepteurs et une sommation spatiale. De plus le grand nombre de fibres polymodales A $\delta$  et de fibres C au niveau de la pulpe et de la dentine et son organisation somatotopique au niveau du ganglion du trijumeau permet de réaliser des modèles d'étude intéressant pour montrer les interactions neuro-inflammatoires (Byers et Narhi, 1999).

Bon nombre de processus chimiques, récepteurs et canaux ioniques responsables de l'activation et de la sensibilisation des afférences primaires sont similaires pour la dent et le reste du corps. Au niveau de la dent, on retrouve des neuropeptides (tels que la substance P, la CGRP), de l'ATP, des récepteurs TRP et un grand nombre de médiateurs chimiques (histamine, 5-HT, opioïdes et cytokines) libérés par les cellules de la pulpe dentaire. Ils participent également à la réaction inflammatoire et aux phénomènes de réparation de la pulpe. La dent, en plus de conforter les découvertes faites au niveau du corps, a permis la mise au point de modèles d'études spécifiques par microdialyse ou perfusion de la pulpe, chez l'homme et l'animal (Khan et Hargreaves, 2010, Hargreaves, 2011). A la différence d'une dent saine, le taux de substance P dans la chambre pulpaire est très élevé lors d'une inflammation chronique, laissant supposer une augmentation d'activité des neurones peptidergiques. Cette observation laisse penser que l'augmentation de la concentration de certains médiateurs de l'inflammation serait impliquée dans la douleur inflammatoire dentaire chronique (Bowles et al., 2003). Les travaux sur la pulpe dentaire ont aussi montré l'existence de récepteurs opioïdes  $\mu$  au niveau du système nerveux périphérique. En conditions physiologiques, ces récepteurs sont inaccessibles aux morphiniques exogènes du fait de la barrière périneurale. Au stade précoce de l'inflammation, la barrière périneurale se rompt et facilite l'accès des agonistes aux récepteurs opioïdes  $\mu$ . Au stade chronique, s'ajoute une augmentation du nombre de récepteurs opioïdes au niveau des afférences nerveuses primaires. Ces résultats sont confortés par la clinique puisque les opioïdes exogènes administrés par la voie périphérique ont une action efficace sur la douleur inflammatoire chronique dentaire. Ceci ouvre la voie à l'utilisation périphérique des agonistes des récepteurs morphiniques dans

un contexte de douleur inflammatoire chronique ou de douleur dentaire permettant d'éviter la voie centrale qui s'accompagne de multiples effets indésirables (nausées, constipation, somnolence) (Jaber et al., 2003).

### 3- L'ATM et les muscles masticateurs

La richesse en terminaisons nerveuses des muscles masticateurs et de l'articulation temporo-mandibulaire est responsable chez l'homme de multiples douleurs et permet de créer de nombreux modèles d'études chez l'animal. Comme pour le reste du corps, les études électro-physiologiques, comportementales et immuno-histochimiques ont montré le rôle des récepteurs glutamatergiques, GABAergiques ou opioïdes, des hormones femelles (œstrogène) et des médiateurs de l'inflammation dans la douleur musculo-squelettique cranio-faciale (Sessel, 2011). L'étude de Castrillon et coll. (2010), réalisée sur l'homme a permis de montrer une augmentation significative de la concentration en glutamate au niveau du muscle masséter chez les patients avec des désordres musculo-squelettiques de l'articulation temporo-mandibulaire, par rapport au groupe sain. Ceci permet de penser que le glutamate périphérique est impliqué dans la physiopathologie des douleurs oro-faciales. Dans les conditions physiologiques, les neuropeptides (substance P, CGRP) et des médiateurs de l'inflammation (5-HT, cytokines, prostaglandines...) sont indétectables au niveau de l'ATM ; mais dans les conditions d'inflammation ils deviennent dosables. Ils pourraient ainsi servir de moyen de diagnostic ou de cible thérapeutique (Sessle, 2011).

### 4- Les méninges et les vaisseaux intracrâniens.

Les vaisseaux intracrâniens et les méninges sont innervés par des fibres afférentes de petit diamètre qui peuvent être activées par des stimuli nociceptifs ou par l'application d'une « soupe inflammatoire ». L'activation répétée des nocicepteurs méningés par la soupe inflammatoire entraîne une aggravation de l'hypersensibilité cutanée et une hyperexcitabilité neuronale qui s'accompagnent d'une augmentation du territoire d'hypersensibilité, d'une persistance des symptômes même entre les injections. La répétition des injections entraîne une sensibilisation centrale et le développement d'une allodynie (Boyer et al., 2014).

### 5- La glie

La réaction inflammatoire provoque des changements au niveau des voies de signalisation intracellulaires des cellules gliales en agissant sur la phosphorylation de ERK, la voie des MAP Kinases et des phosphatases. La substance P et la CGRP libérées au niveau des

cellules du ganglion du trijumeau après un processus inflammatoire affectent l'activité des cellules gliales. L'existence de pores entre les neurones et la glie participe à la propagation de l'hyperexcitabilité cellulaire entre les neurones et la glie (Sessles, 2011).

### 7.2.2. LES MECANISMES CENTRAUX DE LA DOULEUR INFLAMMATOIRE.

Les neurones nociceptifs du caudalis, de l'oralis et des structures supra-segmentaires tel le thalamus peuvent être activés par des stimuli oro-faciaux nociceptifs mécaniques et thermiques mais également par des irritants appliqués au niveau des tissus de cette région. L'injection de CFA, capsaïcine ou huile de moutarde au niveau de l'ATM des rats, des muscles masticateurs ou des dents provoquent un comportement douloureux avec un état de douleur inflammatoire chronique et une activation centrale des neurones nociceptifs (Tsuboi et al., 2011, Yamazaki et al., 2008, Bereiter et al., 2006).

#### 7.2.2.1. Au niveau du sous-noyau caudal

Au niveau du sous-noyau caudal, les différents modèles de douleur chronique précités s'accompagnent d'une expression de c-Fos, témoin d'une augmentation de l'activité neuronale (Sessles, 2011). Après injection de capsaïcine au niveau de l'ATM les enregistrements électrophysiologiques au niveau du sous-noyau caudal retrouvent une sensibilisation centrale avec augmentation des champs récepteurs cutanés et un abaissement des seuils d'activation des neurones NS et WDR du caudalis après mise en charge de l'ATM (Lam et al., 2009b).

Une différence entre mâles et femelles, en rapport avec l'imprégnation oestrogénique est également constatée. La création d'un modèle inflammatoire au niveau de l'ATM s'accompagne d'une augmentation de l'expression de c-Fos au niveau des couches superficielles du caudalis. Le site d'action des oestrogènes implique des cibles centrales et périphériques. Elles affectent l'activité cellulaire en se fixant sur des récepteurs de la membrane plasmique et du cytoplasme. Elles altèrent la transcription des gènes, les cascades intracellulaires et l'activité des canaux ioniques. Or, des récepteurs aux oestrogènes sont présents en quantité variable, chez l'Homme comme chez l'animal au niveau de la synoviale des ATM. L'injection d'agoniste des intégrines, au niveau du sous-noyau caudal, bloque la possibilité de liaison des oestrogènes aux récepteurs transmembranaires et s'accompagne d'une diminution de l'expression de c-Fos chez les rates présentant une inflammation de l'ATM. Les oestrogènes jouent donc un rôle dans la sensibilisation centrale (Bereiter et al., 2006).

De plus, la sensibilisation du caudalis provoquée par l'administration d'huile de moutarde au niveau de la pulpe dentaire (Sunakawa et al., 1999) ou au niveau de l'ATM (Tsai, 1999) se traduit par une augmentation de l'activité électromyographique des muscles digastrique et masséter. Le sous-noyau caudal semble être un acteur clé dans les voies sous-tendant les réflexes de contractures des muscles masticateurs dans le cadre de douleurs inflammatoires chroniques dentaires ou de l'ATM.

#### 7.2.2.2. Extension de la sensibilisation du sous-noyau caudal au sous-noyau oral et au thalamus.

La sensibilisation centrale du trijumeau peut s'étendre du sous-noyau caudal au sous-noyau oral. Le caudalis, par la couche gélatineuse, peut moduler l'activité du sous-noyau oral en agissant sur les récepteurs NMDA localisés dans le caudalis lui-même. L'activation des fibres C de haut seuil active les neurones WDR des sous-noyaux caudal et oral ; or, l'injection de dizocilpine, un antagoniste des récepteurs NMDA au niveau des couches profondes ou superficielles du sous-noyau oral, provoque une inhibition de l'effet wind-up qui devrait apparaître au niveau du sous-noyau oral après application de trains de décharges électriques dans le territoire cutané des fibres C. L'inhibition de l'effet wind-up au niveau du sous-noyau oral, après injection au niveau du sous-noyau caudal d'un antagoniste spécifique NMDA, indique l'existence d'un circuit entre ces deux noyaux impliquant les récepteurs NMDA (Woda et al., 2001).

Le caudalis joue un rôle clé dans la sensibilisation centrale au niveau supra-segmentaire. L'application d'huile de moutarde au niveau de la pulpe dentaire entraîne une sensibilisation des sous-noyaux caudal et oral et du thalamus. L'application d'un bloqueur de l'activité synaptique (le chlorure de cobalt,  $\text{CoCl}_2$ ) lorsqu'il est appliqué au niveau du sous-noyau oral ne provoque aucune modification de l'activité des neurones thalamiques. Par contre, quand il est appliqué au niveau du sous-noyau caudal, cela provoque une atténuation des variations d'activités dans les VPM et PO du thalamus induites par l'irritation de la pulpe dentaire. L'effet dure au moins 20 minutes. La sensibilisation centrale du VPM et du PO suite à une stimulation nociceptive de la pulpe dentaire, n'est possible que si le sous-noyau caudal est intègre, mais semble indépendante du sous-noyau oral (Park et al., 2006).

#### 7.2.2.3. Altération des voies de modulation

Comme dans la sensibilisation centrale, dans la douleur neuropathique, on retrouve une altération des voies de modulation descendante, associant des voies inhibitrices et des

voies excitatrices. Toutes ces altérations s'accompagnent d'une exacerbation de la douleur inflammatoire. Les mêmes médiateurs chimiques et récepteurs entrent en jeu tel 5-HT, NMDA, GABA, les interleukines, les opioïdes et P2X (Sessle, 2011).

#### 7.2.2.4. Implication de la glie, la neuroinflammation

La perturbation des cellules gliales du tronc cérébral jouent un rôle dans le développement et le maintien de la sensibilisation centrale au niveau du caudalis (Chiang et al., 2011).

La mobilisation de deux dents chez le rat provoque une allodynie repérable dans le territoire du masséter en utilisant les filaments de Von Frey. Le marquage immunohistochimique en utilisant OX42 (marqueur spécifique de la microglie) et GFAP (marqueur des astrocytes) du caudalis retrouve un marquage positif à J1, 3, 7 pour OX42 et à J3, 7 et 14 pour GFAP. L'injection de minocycline, réducteur d'activité de la microglie et des astrocytes, provoque une diminution de l'allodynie mécanique dans ce modèle. L'implication de la microglie dans la douleur trigéminal est très précoce puisqu'elle est retrouvée dès J1 (Liu et al., 2009).

Des travaux ont même pu montrer une implication de la microglie dans les 20 minutes qui suivent l'application d'huile de moutarde au niveau de la pulpe dentaire. Cette réactivité est liée au fait que la microglie utilise des processus intracellulaires tel la cascade des kinases. En effet, une injection intrathécale d'un inhibiteur de p38 MAPK (activée dans la microglie) ou par du fluoroacétate (inhibiteur de l'activité des astrocytes) sur ce modèle de rat entraîne une diminution des champs récepteurs cutanés, une atténuation de la réponse aux stimuli nociceptifs et une atténuation de l'abaissement des seuils d'activation. Cette diminution de la sensibilisation se fait sans modifier la réponse physiologique aux stimuli nociceptifs (Xie et al., 2007).

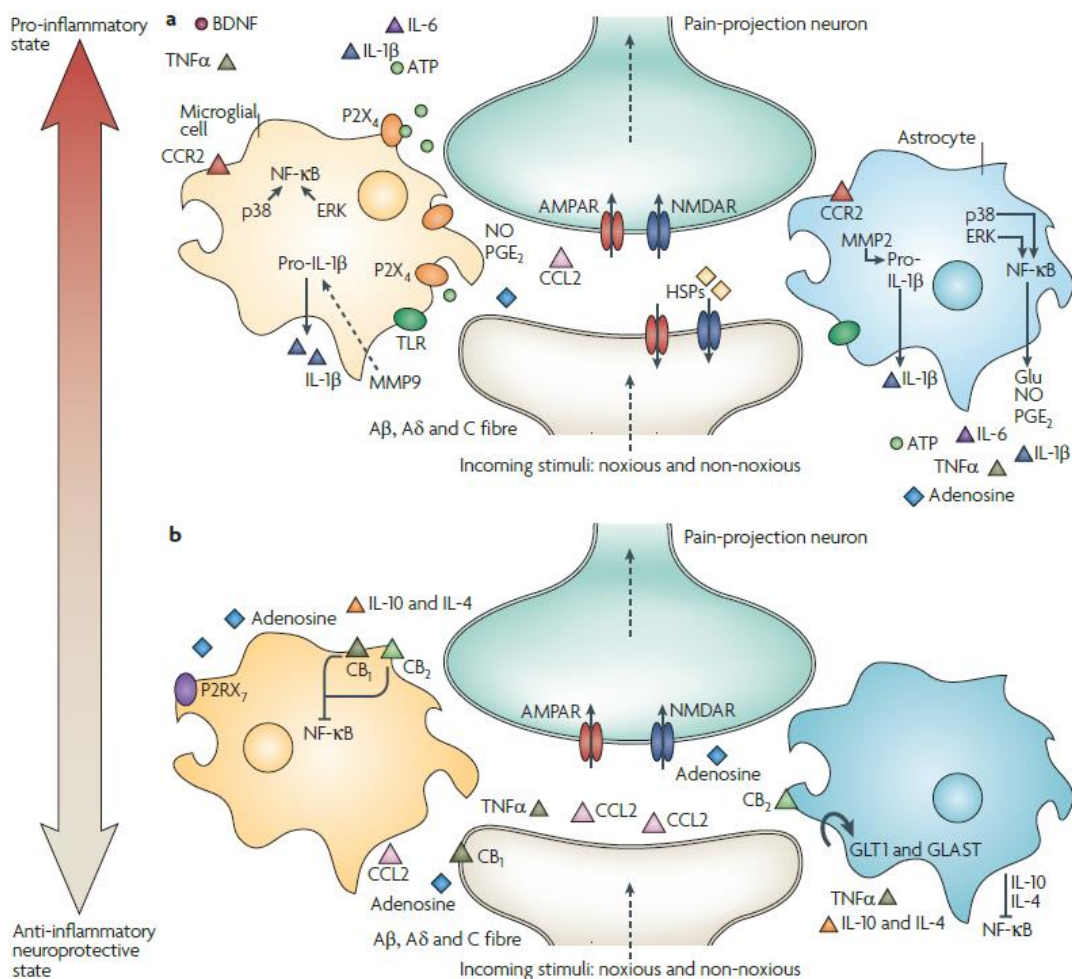
La grande famille des récepteurs purinergiques connue à travers P2X<sub>3</sub>, connue pour son rôle dans la sensibilisation centrale, présente également les sous-types P2X<sub>4</sub> et P2X<sub>7</sub> sur la microglie du sous-noyau caudal. L'activation des récepteurs P2X<sub>7</sub>, entraîne une production massive par la microglie d'ATP et de substances pro-inflammatoires qui stimulent les astrocytes pour produire des cytokines, chemokines et de glutamate. En plus de la libération des médiateurs chimiques et de la modulation par la microglie, les astrocytes expriment un grand nombre de récepteurs aux neurotransmetteurs (récepteurs NMDA, glutamate, TrkB, purinergiques, neurokinine, cytokines). Par l'intermédiaire des neurotransmetteurs libérés et



des récepteurs présents, les cellules gliales peuvent à la fois moduler l'activité des neurones et de la glie.

**(Figure 12)**

Cet ensemble de voies aussi intriquées et entremêlées vont se traduire à l'échelle comportementale par un certain nombre de symptômes douloureux dont l'allodynie mécanique.



**Figure 12: activation gliale: des effets pro-inflammatoire aux effets anti-inflammatoires.**

**a : rôles pro-inflammatoires pour la glie.**

Lors d'une inflammation chronique ou d'une lésion nerveuse, des stimulations nociceptives prolongées apparaissent et provoquent une sensibilisation centrale. Elles conduisent à une modification de la transcription neuronale au niveau de la corne dorsale avec une modification prolongée de leur activité. Les astrocytes répondent à cette activité synaptique excessive par la modification des courants calciques. Ils sont responsables de la libération de glutamate, de TNF $\alpha$ , l'interleukine 1b (IL-1b), IL-6, d'oxyde nitrique (NO), de prostaglandine E2 (PGE2) et de la liaison de l'ATP à P2X4. La microglie activée est également une source de libération de facteurs pro-inflammatoires. La libération de la métalloprotéinase matricielle 9 (MMP9) induit le clivage de la pro-IL-1b et maintient l'activation de la microglie. La MMP-2 induit le clivage de la pro-IL-1b et maintient l'activation des astrocytes. En parallèle, les astrocytes et la microglie activent p38 MAPK et la cascade des MAP kinases provoquant une modification de la transcription. Après lésion nerveuse, les protéines de choc thermique (HSP) sont libérées et se lient à des récepteurs Toll-like (TLR) exprimés par les astrocytes et la microglie, entretenant l'activité de ces cellules.

b : à l'opposé l'activation de la glie peut avoir un effet neuroprotecteur.

L'activation de la glie libère des cytokines anti-inflammatoires telles IL-10 et IL-4. Elle exprime également les récepteurs cannabinoïdes (CB1 et CB2) dont l'activation induit un effet anti-inflammatoire inhibant la toxicité de la microglie en supprimant la transduction MAPK. Les transporteurs du glutamate : glutamate 1 (GLT1) et le glutamateaspartate transporteur (GLAST) peuvent restaurer une concentration normale de glutamate dans la fente synaptique. L'activation par l'ATP purinorécepteur de P2RX7 de la microglie conduit à la libération de TNF $\alpha$  qui protège les neurones contre la toxicité induite par le glutamate. L'activation des astrocytes réduit la propagation de la dégénérescence tissulaire après lésion tissulaire en éliminant les débris neuronaux et cellulaires.

*(d'après Milligan et Watkins, 2009)*

## 8. L'ALLODYNIE

### 8.1. DEFINITION

Paul Potter avait défini, en 1994, l'allodynie comme une douleur provoquée spécifiquement par un stimulus non douloureux. Cette définition a été précisée en 2008 par le IASP ; le terme d'allodynie ne s'applique plus qu'aux douleurs provoquées par l'activation des fibres nerveuses sensibles de bas seuil, les nocicepteurs ne doivent pas être activés par le stimulus sinon on parle d'hyperalgésie. Les fibres impliquées dans l'allodynie sont donc les fibres A $\beta$  ou les fibres A $\delta$  et C de bas seuil. L'allodynie est classée en fonction du type de stimulus responsable de la douleur. L'allodynie thermique se réfère à un stimulus chaud ou froid, l'allodynie mécanique statique à la pression et l'allodynie mécanique dynamique au frottement.

L'allodynie est d'abord un symptôme, c'est une adaptation du système nociceptif. En abaissant le seuil de sensibilité, on obtient la protection, par des réactions d'évitement, d'un tissu plus vulnérable le temps de sa cicatrisation. Par contre quand l'intensité, la durée et la localisation de l'allodynie ne sont plus ou pas en adéquation avec la lésion en cause on passe du symptôme à la maladie.

Dans cet exposé, nous allons nous intéresser à l'allodynie mécanique.

### 8.2. DIFFERENCES DE MECANISMES ENTRE L'ALLODYNIE STATIQUE ET MECANIQUE

En 1993, l'allodynie mécanique a été divisée en 2 types (statique et dynamique). Cette distinction était initialement fonction du type de stimulus qui la déclenche (Ochoa et Yarnitsky, 1993) : l'allodynie mécanique statique était provoquée par l'application d'une

pression sur la peau et l'allodynie mécanique dynamique était provoquée par un frottement doux sur la peau. En réalité, la différence ne se constate pas seulement à travers le type de stimulus mais se traduit également par une chronologie d'installation et une réponse pharmacologique différentes.

Deux modèles neuropathiques ont été comparés, l'un est induit par une constriction chronique du nerf sciatique et l'autre par une ligature serrée des nerfs spinaux L5 et L6 (Field, 1999). Le premier modèle se caractérise : - par l'installation progressive d'une allodynie statique qui apparaît 8 jours après la chirurgie puis qui touche tous les rats au bout de 19 jours, - et par l'apparition d'une allodynie dynamique au bout de 19 jours mais qui ne concerne que 80% des rats. Le second modèle se caractérise par une installation de l'allodynie statique et dynamique chez tous les rats dès le 2<sup>ème</sup> jour. La cause de la lésion nerveuse provoque une chronologie d'installation de l'allodynie statique et dynamique différente.

De plus, chez les rats neuropathiques, la morphine stoppe l'allodynie statique mais pas l'allodynie dynamique alors que l'administration de prégabaline réduit les deux (Field, 1999). Si on compare l'effet pharmacologique de substances habituellement utilisées dans le traitement de la douleur chronique en fonction de différents modèles de rats allodyniques, on constate que les antagonistes spécifiques NK1 bloquent l'allodynie mécanique statique et dynamique liées à une inflammation induite par l'injection de formol (Field, 1999 ; Gonzalez et al., 2000) (**Tableau 2**).

Substance administrée	Allodynie statique	Allodynie dynamique
Morphine	Réverse	Aucun effet
Prégabaline	Réverse	Réverse
antagoniste des récepteurs NK1 (CI-1021)	Réverse	Aucun effet
Carbamazepine	Faiblement active	Active à forte dose

**Tableau 2** : effet de différentes substances sur l'allodynie statique et dynamique dans un modèle de douleur neuropathique provoqué par une constriction chronique du nerf sciatique.

Dans les modèles de douleurs neuropathiques induites par la ligature du nerf sciatique, l'administration de prégabaline réverse l'allodynie statique de façon permanente et l'allodynie dynamique de façon transitoire. La morphine et les antagonistes NK1 réversent l'allodynie

statique mais pas dynamique. L'injection de capsaïcine au niveau de la patte bloque l'allodynie statique mais n'a aucun effet sur l'allodynie dynamique. La carbamazépine est faiblement active sur l'allodynie statique et active mais à dose élevée sur l'allodynie dynamique (Field, 1999 ; Gonzalez et al., 2000). Toutes ses données laissent penser que les mécanismes sont différents en fonction de la cause et du type d'allodynie.

### 8.3. ROLE DES FIBRES A $\beta$

La transformation du tact en douleur implique en grande partie les fibres myélinisées de gros diamètre A $\beta$ . Mais quels mécanismes permettent cette transformation, alors que les voies qui véhiculent le tact et celles qui véhiculent la douleur sont distinctes ? Trois hypothèses ont été évoquées pour expliquer cette transformation lors des processus inflammatoires ou neuropathiques. 1- Le changement de phénotype des fibres A $\beta$  qui dans certaines conditions miment celui des fibres C. 2- La croissance des fibres A $\beta$  et la création de nouvelles connections synaptiques dans la couche II de la corne dorsale de la moelle épinière ou du complexe sensitif du trijumeau. 3- L'activation d'un réseau polysynaptique habituellement silencieux entre les couches profondes et superficielles. Ces trois hypothèses ne s'excluent pas mutuellement.

#### 8.3.1. CHANGEMENT DE PHENOTYPE DES FIBRES A $\beta$

Le neurofilament NF 200kDA est un marqueur des fibres A alors que l'isolectine IB-4 et la substance P sont des marqueurs spécifiques des fibres C. Lors de la constriction chronique du nerf sciatique, l'expression des mRNA preprotachykinines codant pour la tachykinine, précurseur de la substance P, augmente au niveau du corps cellulaires des neurones de petits et de moyens diamètres à la phase précoce (dans les 5 premiers jours après la lésion nerveuse) puis diminue à la phase tardive (après 10 jours). Or, la substance P semble participer à la régénéscence des neurones, lésés en stimulant la croissance axonale, et à la formation de nouvelles connections au niveau des champs récepteurs. Le processus qui s'installe a pour but d'aider à cicatriser. De façon moins attendue, progressivement entre le 2<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour, 30% des neurones A $\beta$  présentant des signes de dégénéscence post-lésionnelle, deviennent immuno-positifs pour les mRNAs preprotachykinines. Ils miment dans des conditions neuropathiques le phénotype des fibres C (Marchand et al., 1994).

La stimulation d'un nerf périphérique à 20 Hz, stimule les fibres A et ne cause pas de post-décharges (spécifiques des fibres C). Or, après constriction du nerf sciatique, des post-décharges apparaissent lorsqu'on stimule les fibres nerveuses à 20 Hz suggérant une

modification majeure des caractéristiques des fibres myélinisées de gros diamètre. L'injection intraveineuse d'un antagoniste des récepteurs NK-1 (CP-99,994) réduit la durée et l'amplitude de ces post-décharges. Ce changement de comportement électrique des fibres A $\beta$  et leur sensibilité à la substance P montrent la modification de leur phénotype pour ressembler aux fibres C (Pitcher et Henry, 2004).

### 8.3.2. CROISSANCE DES FIBRES A $\beta$

Dans certaines conditions d'inflammation ou de lésion neuropathique, les fibres A $\beta$  semblent s'étendre dans des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière, où elles ne sont pas présentes habituellement.

Chez le rat neuropathique, l'expression de c-Fos (marqueur d'activité neuronale) augmente au niveau de la couche II de la corne dorsale de la moelle épinière après application de stimulations tactiles non-douloureuses. La stimulation des mécanorécepteurs de bas seuil qui se terminent normalement dans les couches profondes de la corne dorsale de la moelle semble activer directement ou indirectement les neurones nociceptifs de la couche II (Bester et al., 2000). Woolf et Thomson (1991) ont défini quelles fibres sont impliquées dans la transformation du tact en douleur. Le traceur peroxydase du raifort (Horseradish peroxydase tracer), lorsqu'il est injecté à la périphérie d'un nerf, est internalisé et transporté jusqu'à la terminaison centrale de celui-ci. Lorsqu'il est en plus couplé à la sous-unité B de la toxine du choléra (CTb), il marque spécifiquement les fibres afférentes myélinisées. Dans les conditions physiologiques, les fibres myélinisées A projettent spécifiquement dans les couches profondes de la corne dorsale de la moelle épinière. En cas de lésion neuropathique, on retrouve le marquage dans les couches II, où se projettent habituellement les fibres C. Ces auteurs (Woolf et Thompson, 1991) ont pu conclure que les fibres A $\beta$  émettent des ramifications dans la couche II, connectant ainsi les voies nociceptives responsables de l'allodynie rencontrée dans la douleur neuropathique. Cette hypothèse a été ensuite invalidée, bien plus tard, par Shehab et al. (2003). La recherche d'un double marquage entre le Vasoactive Intestinal Peptid (VIP), plus spécifique des fibres C de petit diamètre, et CTb a montré que les fibres C acquièrent la capacité de véhiculer CTb après une lésion nerveuse. D'autres études (voir Sandkhüler, 2009) ont conforté le rôle substantiel de la croissance des fibres A $\beta$  dans la douleur neuropathique.

### 8.3.3. L'ACTIVATION DE VOIES POLYSYNAPTIQUES HABITUELLEMENT SILENCIEUSES

L'activation de voies polysynaptiques semble être l'hypothèse la plus prometteuse dans l'explication de l'allodynie. Elle se traduit par l'activation de voies habituellement silencieuses en conditions physiologiques. Elles permettraient de faire communiquer les couches profondes avec les couches superficielles de la moelle épinière pour transformer un message tactile en douleur.

Un changement d'activité au niveau des connections synaptiques peut être provoqué par :

- une altération pré- ou post-synaptique
- une augmentation de l'excitabilité ou une diminution de l'inhibition entre les afférences primaires et les neurones de second ordre
- une augmentation de l'excitabilité ou une diminution de l'inhibition au niveau des voies polysynaptiques véhiculant l'information des fibres A $\beta$  des couches profondes à la couche II (Baba et al., 1999).

#### 8.3.3.1. Désinhibition des voies GABA- et glycinergiques.

La désinhibition des neurones inhibiteurs GABA- et glycinergiques par l'utilisation d'un antagoniste spécifique GABA<sub>A</sub> (la bicuculline) ou glycinergique (la strychnine), s'accompagne sur le plan comportemental d'une allodynie mécanique. La stimulation des fibres A $\beta$  entraîne sur le plan électrophysiologique une activation des neurones nociceptifs des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière ou du sous-noyau caudal (Miraucourt et al., 2007 ; Schoffnegger et al., 2008). Il existe donc un circuit neuronal habituellement silencieux entre les couches profondes et superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière, transformant le tact en douleur. Ce circuit existe anatomiquement mais est inactif du fait d'un fort contrôle inhibiteur.

Chez les rats neuropathiques, les lésions nerveuses enclenchent aussi une perte de l'inhibition glycinergique et GABAergique ; mais cette réduction de l'inhibition est incomplète. En effet, l'injection de bicuculline ou de strychnine déclenche une allodynie mécanique chez les rats contrôles mais majore aussi de façon drastique celle chez les rats neuropathiques (Schoffnegger et al., 2008).

Des études comportementales sur le rat ont montré que les deux désinhibitions GABA- et glycinergiques produisent une allodynie mécanique. Néanmoins, la désinhibition glycinergique provoque uniquement une allodynie mécanique dynamique et la désinhibition

Gabaergique provoque exclusivement une allodynie mécanique statique (Miraucourt et al. 2009).

#### 8.3.3.2. Inhibition d'une voie glutamatergique, implication des récepteurs NMDA et des récepteurs AMPA/kainate

Schoffnegger et al. (2008) ont validé par une étude comportementale avec le test de Von Frey, l'existence d'une allodynie à la pression sur la patte après lésion du nerf sciatique. Ensuite, ils ont stimulé (intensité de 17–21  $\mu$ A, fréquence de 0.1 ms) les fibres nerveuses du ganglion rachidien afin d'activer de façon élective les fibres A $\beta$ . En enregistrant les courants calciques transitoires, ils ont pu mettre en évidence une activité cellulaire au niveau des couches superficielles chez 12% des animaux contrôles contre 67% des rats neuropathiques. L'activation des couches superficielles passe par l'activation d'un réseau synaptique qui va des couches profondes aux couches superficielles. Chez le rat neuropathique, l'activation de ce circuit n'est pas altérée par l'injection d'un antagoniste spécifique des récepteurs NMDA (D-AP5). Par contre, l'injection d'un antagoniste spécifique des récepteurs AMPA/kainate (CNQX) entraîne une disparition complète de l'activité des cellules des couches I et II après stimulation électrique des couches profondes. L'activation de ce circuit synaptique dépendrait donc uniquement des récepteurs AMPA/kainate.

Par contre, au niveau du système trigéminal, l'injection intra-cisternale de D-AP5, avant d'induire une allodynie mécanique pharmacologique par désinhibition glycinergique prévient justement l'apparition de l'allodynie mécanique (Miraucourt et al., 2007). On peut se demander si la différence de résultat provient du choix du modèle (trijumeau ou nerf sciatique) ou de la chronologie (l'utilisation à titre « préventif » ou « thérapeutique » d'une molécule).

#### 8.3.3.3. Implication des astrocytes et de la D-sérine dans le circuit de l'allodynie mécanique.

Depuis 2006, la synapse n'est plus considérée comme une structure bipartite. Un troisième élément intervient : la cellule gliale. Elle peut détecter et intégrer le signal synaptique et y répondre en libérant des « gliotransmetteurs » dont l'ATP, le glutamate et la D-sérine. Ces trois structures ont une relation anatomique étroite faisant naître le concept de « synapse tripartite » (Oliet et Mothet, 2006).

L'allodynie mécanique dynamique provoquée par une désinhibition glycinergique est inhibée en utilisant de façon préventive un inhibiteur spécifique des récepteurs NMDA



(Miraucourt, 2007). Or, les astrocytes régulent l'activation des récepteurs NMDA en libérant un co-agoniste des récepteurs NMDA, la D-sérine (Henneberger et al., 2010). En marquant spécifiquement les astrocytes par la GFAP et la microglie par du OX-42, il a été montré que seuls les astrocytes étaient impliqués dans le circuit de l'allodynie mécanique. De plus l'inactivation des astrocytes par l'injection intra-cisternale de fluorocitrate (inhibiteur spécifique de la glie) empêche l'apparition d'une allodynie mécanique même après désinhibition glycinergique. Plus spécifiquement l'inhibition de la synthèse de D-sérine empêche le développement de l'allodynie mécanique induite par la strychnine et l'injection d'un analogue de la D-sérine restaure l'allodynie. Ceci montre le rôle pivot de la glie à travers la libération de D-sérine dans le circuit de l'allodynie mécanique (Miraucourt et al., 2011).

#### 8.3.3.4. Implication des neurones NK1- de la couche I

Après avoir mis en évidence l'existence de circuits silencieux à l'état basal, des équipes ont cherché à définir les caractéristiques physiopathologiques des neurones impliqués ainsi que leur nombre.

La couche I du sous-noyau caudal se caractérise par un grand nombre de neurones présentant des récepteurs NK1. L'activation des fibres C par l'injection de capsaïcine au niveau de la lèvre supérieure provoque une internalisation des récepteurs NK1 de la couche I, confirmant implication des neurones NK1 positifs de la couche I dans les voies de la douleur. A contrario, après injection de strychnine, l'induction d'une allodynie mécanique dynamique par un stimulus non nociceptif n'entraîne pas l'internalisation des récepteurs NK1 et ne s'accompagne pas d'un double marquage ERK-NK1 (Miraucourt, 2009). Au niveau de la couche I, les neurones impliqués dans ces circuits sont de type NK1 négatif. Ceci, rejoint les constatations cliniques, puisque les antagonistes spécifiques de NK1 (metoclopramide) sont inefficaces contre les douleurs neuropathiques (Urban et Fox, 2000).

#### 8.3.3.5. Implication des interneurones PKC $\gamma$ dans les couches II et IIIo

La désinhibition glycinergique pharmacologique par l'injection intra-cisternale de strychnine provoque une allodynie mécanique dynamique dans le territoire du trijumeau. L'injection de strychnine au niveau des neurones à convergence augmente leur activité de décharge, enregistrée en électrophysiologie, mais sans modification de la pression sanguine. Il n'y a pas de transformation du tact en douleur (Miraucourt, 2007) ; donc, les neurones à convergence ne sont pas impliqués dans le circuit de l'allodynie. Par contre, après injection intra-cisternale de strychnine et activation des fibres A $\beta$  par « brush », l'enregistrement de

l'activité électrophysiologique des neurones NS (qui répondent exclusivement à la stimulation des nocicepteurs), montre une augmentation d'activité et une élévation de la pression sanguine. Dans ces conditions, le tact est transformé en douleur. La latence entre l'activation des fibres A $\beta$  et l'activation des neurones NS étant supérieure à 7 ms, il n'y a pas de connexion directe entre ces 2 neurones. La recherche de l'expression de c-Fos, (marqueur spécifique de l'activité neuronale en cas de stimulation douloureuse) a montré une activation des neurones des couches I, II et III<sub>e</sub>. Les voies de la douleur se terminant en grande partie dans l'aire para-brachiale, l'injection du traceur fluorogold à ce niveau permet de retrouver de façon rétrograde les neurones impliqués dans les voies de la douleur. Dans cette étude, 15% des neurones de la couche I sont doublement marqués c-Fos et fluorogold. Or les fibres A $\beta$  à bas seuil ne projettent pas dans les couches I. Le circuit silencieux est donc composé d'interneurones localisés dans les couches II et III<sub>e</sub>, qui connectent les couches profondes et superficielles. Le double marquage c-Fos et PKC $\gamma$  atteint 29% dans les couches II et III<sub>e</sub> et les interneurones PKC $\gamma$  de ces 2 couches expriment à leur surface les récepteurs glycinergiques. L'inhibition sélective des interneurones PKC $\gamma$  par KIG31-1 (antagoniste spécifique des PKC $\gamma$ ) empêche l'apparition de l'allodynie mécanique après avoir réalisé une désinhibition glycinergique. Le circuit silencieux est donc composé entre autre d'interneurones PKC $\gamma$  localisés dans les couches II et III<sub>e</sub>.

Les travaux récents permettent de décrypter progressivement les neurones et les cellules gliales intervenant dans l'allodynie mécanique. Les interneurones PKC $\gamma$  semblent jouer un rôle pivot dans les voies de la transformation du tact en douleur.

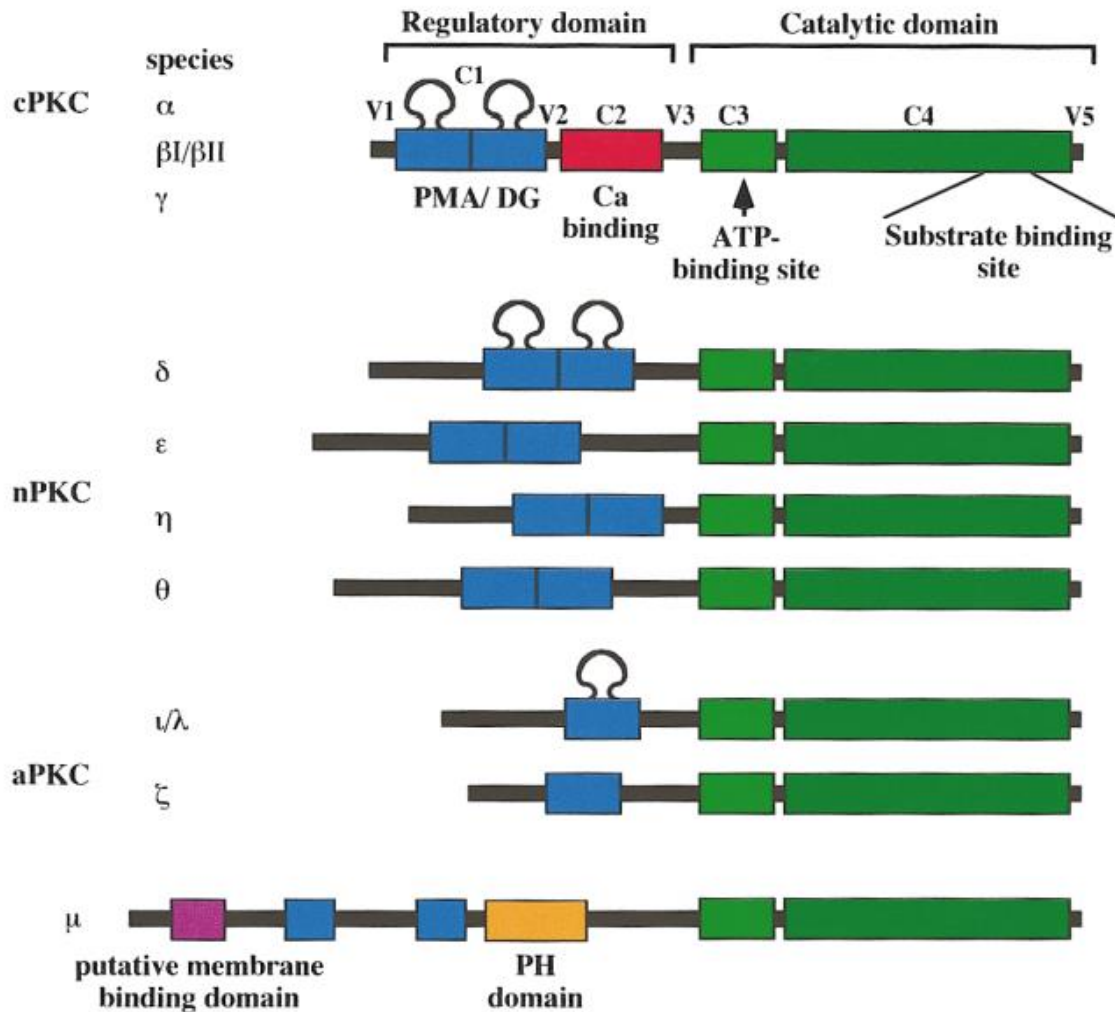
## 9. LA PROTEINE KINASE C $\gamma$

La protéine kinase C  $\gamma$  fait partie du groupe des protéines kinases C. Ce sont des protéines ubiquitaires de la famille des sérine/thréonine kinases dépendantes des phospholipides et du Ca<sup>2+</sup>.

### 9.1. CLASSIFICATION DES PKCs

Les protéines kinases C jouent un rôle important dans la régulation et la coordination des différents aspects de la cellule par phosphorylation et déphosphorylation de protéines effectrices. Elles sont largement impliquées dans l'activité neuronale et jouent un rôle dans la modulation de l'activité des canaux ioniques, la libération de neurotransmetteurs, la LTP et

dans la régulation de la transduction (Akinori, 1998). Elles sont composées de 10 isoformes plus une, toutes constituées d'une seule chaîne protéique, formée de régions conservées (C1 à C4) et de régions variables (V1 à V5). Chaque protéine est constituée de 2 domaines. Le premier, situé du côté N-terminal, est le domaine de régulation ; il réagit à différents activateurs en fonction de l'isoforme. Le second, situé du côté C-terminal, est le domaine catalytique : à ce niveau viennent se fixer l'ATP (qui donne le phosphate) et le substrat (la protéine qui accepte le phosphate). Les domaines régulateur et catalytique sont reliés par la région variable V3 (**Figure 12: représentation schématique des isoformes des PKCs**).



### Figure 12 : représentation schématique des isoformes PKCs

Les isoformes sont regroupées en 3 groupes (Mochly-Rosen, 1998) :

1- Les PKCs conventionnelles (cPKCs) : isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II et  $\gamma$ . Elles comportent 4 domaines homologues (C1, C2, C3 et C4) espacés par des domaines V variables. Leur activation nécessite du  $\text{Ca}^{2+}$  et du diacylglycérol (DAG). Elles peuvent être activées par les phorbol esters, en présence de phosphatidyl sérine. C'est le groupe le plus abondant dans le SNC.

2- Les nouvelles PKCs (nPKCs) : isoformes  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ . Elles ne comportent pas de domaine homologue C2 et n'ont pas besoin de  $\text{Ca}^{2+}$  pour être activées.

3- Les PKCs atypiques (aPKCs) : isoformes  $\zeta$  et  $\lambda$ . Il leur manque le domaine C2 et la moitié du domaine C1. Elles sont insensibles au DAG, au  $\text{Ca}^{2+}$  et au phorbol ester.

Il convient d'ajouter l'isoenzyme PKC $\mu$ , non encore définitivement classée : elle est dépendante des phospholipides, insensible au  $\text{Ca}^{2+}$  et activée par le phorbol ester.

(d'après Mochly-Rosen, 1998)

## 9.2. LES VOIES D'ACTIVATION DES PKCs

Trois voies principales d'activation des PKCs sont décrites : les voies des phospholipases C, D et A2 qui semblent interdépendantes.

### 9.2.1. LA VOIE DES PHOSPHOLIPASES C

Lorsque le ligand se fixe sur un récepteur transmembranaire, il active la protéine G intracellulaire. Cette activation entraîne la formation d'un complexe protéique avec la Guanosine Triphosphate (GTP) qui désensibilise les voies de la signalisation liées aux protéines G et permet d'activer diverses isoformes des phospholipases C. Celles-ci migrent vers la membrane pour fixer leur substrat. En parallèle, le phosphatidylinositol (PI) est phosphorylé par une PI kinase et forme le phosphatidylinositol-4-phosphate (PIP) qui à son tour est phosphorylé par une PIP kinase en phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP2). La phospholipase C hydrolyse PI et PIP, mais pas PIP2, pour donner le diacylglycérol (DAG) et l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP3). IP3 interagit avec un récepteur spécifique de la membrane du réticulum endoplasmique, provoquant l'ouverture de canaux et la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  contenu dans les vésicules. Le  $\text{Ca}^{2+}$  interagit avec le DAG pour activer la PKC. Le DAG produit par cette voie est rapidement dégradé en acide phosphatidique (PA) par la DAG kinase.

### 9.2.2. LA VOIE DES PHOSPHOLIPASES D

La phospholipase D (PLD) dégrade la phosphatidyl choline (PC) en choline et acide phosphatidique. Ce dernier est transformé en DAG par la phosphomonoestérase. Le DAG issu de cette voie est dégradé par la DAG lipase mais de façon lente. Certains activateurs des PKC (phorbol ester, DAG et  $\text{Ca}^{2+}$ ) peuvent également activer la PLD expliquant l'activité plus longue de la PLD.

### 9.2.3. LA VOIE DES PHOSPHOLIPASES A2

La phospholipase A2 est une enzyme composée de plusieurs isoformes qui peuvent être cytosoliques, membranaires ou sécrétoires. Son activation se fait par l'intermédiaire d'un récepteur couplé à la protéine G. La phospholipase A2 hydrolyse des phospholipides et libère des acides gras cis insaturés. En présence de DAG ou de phorbol ester, ils permettent l'activation des PKCs. L'un d'entre eux est l'acide arachidonique précurseur des leucotriènes et prostaglandines, impliqués dans les réactions inflammatoires.

#### 9.2.4. PHOSPHORYLATION DES PKCs ET ROLE DE LA PROTEINE D'ANCRAGE

En réponse à son activation la PKC migre du cytoplasme vers la membrane plasmique. Cette translocation permet à l'enzyme d'acquérir sa compétence catalytique. Le DAG joue un rôle clé dans la translocation car, quel que soit la voie d'activation, ce second messenger intervient toujours dans la boucle de régulation. Au niveau de la membrane plasmique, la PKC se fixe à une protéine d'ancrage dont le rôle est de stabiliser la PKC et d'augmenter son activité enzymatique.

### 9.3. LA PKC $\gamma$

#### 9.3.1. DONNEES GENERALES

Le gène de la PKC $\gamma$  a été séquencé en 1986. Chez l'homme, il est porté par la partie la plus distale du chromosome 19 (19q13.4). Il mesure 24.4 kb de long et est composé de 18 exons variant entre 32 et 406 paires de bases et 17 introns variant entre 94 et 5387 paires de bases (Saito et Shiraj, 2002).

Comme l'ensemble des PKCs, la PKC $\gamma$  est très présente dans le tissu nerveux (Tanaka et Saito, 1992). Elle est exclusivement post-synaptique (Mori et al., 1990). Son expression est particulièrement abondante au niveau des cellules pyramidales de l'hippocampe et des cellules cérébelleuses de Purkinje (Kose et al., 1990). Elle se trouve également au niveau du néocortex, du thalamus, de l'amygdale et du noyau cochléaire (Tanaka et Saito, 1992). Au niveau de la moelle épinière, la PKC $\gamma$  se localise principalement au niveau d'une bande correspondant aux couches Iii et IIIe. Elle est faiblement présente au niveau des couche II<sub>e</sub> et I (Tanaka et Saito, 1992 ; Polgar et al., 1999 ; Peirs et al., 2014). La PKC $\gamma$  est quasiment absente des cellules gliales (Tanaka et Saito, 1992 ; Akinori, 1998).

L'examen au microscope électronique a permis de la localiser dans le cytoplasme, le noyau, les épines dendritiques, les axones et les terminaisons post-synaptiques (Kose et al., 1990 ; Tanaka et Saito, 1992 ; Mori et al., 1990). Son marquage avec une protéine fluorescente verte (green fluorescent protein : GFP) et son activation par un phorbol ester (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate [TPA]) ou un ionophore du Ca<sup>2+</sup> ou une protéine G couplée au récepteur a permis de suivre les différentes étapes de sa translocation du cytoplasme à la membrane plasmique. L'induction par le TPA provoque une translocation lente et irréversible de PKC $\gamma$ . L'induction par les ionophores du Ca<sup>2+</sup> est rapide, réversible et dépendante de la concentration intracellulaire de Ca<sup>2+</sup>; ce dernier active d'abord la production

de phospholipides, dont la DAG, et, ensemble, ils déclenchent la translocation de la PKC $\gamma$  (Sakai et al., 1997).

L'expression de la PKC $\gamma$  est faible à la naissance et augmente progressivement pour atteindre un pic entre la 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> semaine de vie, suggérant un rôle prépondérant dans la formation synaptique plutôt que dans le développement précoce neuronal (Sweitzer et al., 2004).

L'analyse du phénotype des neurones PKC $\gamma$  montre qu'ils ne sont jamais glycinergiques. Seuls 8,4% sont de type GABAergiques et sont localisés au niveau de la couche II. La majorité des neurones PKC $\gamma$  de la couche II (76%) sont immunoréactifs à la neurotensine, près de la moitié sont immunoréactifs à la somatosatine. Au niveau de la couche I, 22% sont des neurones NK1 contre 36,7% au niveau de la couche III (Polgar et al., 1999).

La PKC $\gamma$  est impliquée dans de multiples fonctions au niveau du système nerveux central : nociception, mais également mémorisation et apprentissage qui sont des composantes majeures de la douleur.

### 9.3.2. ROLE REGULATEUR DANS LA PLASTICITE NEURONALE

Les neurones de l'hippocampe jouent un rôle dans la mémoire à long terme. Ils se caractérisent par une grande plasticité avec notamment une facilité d'induire la LTP. L'utilisation d'inhibiteurs de la PKC prévient l'apparition d'une LTP (Reymann et al., 1988; Malenka et al., 1989; Malinow et al., 1989) et, inversement, l'injection de PKC dans le neurone pyramidal de l'hippocampe, donc post-synaptique, mime la LTP (Hu et al., 1987). Ceci a suggéré que la potentialisation synaptique pouvait être due à une activation de la PKC. La création de souris génétiquement délétées pour la PKC $\gamma$  montre que ces animaux sont viables, de développement normal avec des transmissions synaptiques indistinguables des souris sauvages mais avec une LTP diminuée (Abeliovich et al., 1993). La dépression à long-terme (« long-term depression » ou LTD) est la modification synaptique inverse de la LTP. Elle est communément obtenue en stimulant les afférences à basse fréquence (1 à 5 Hertz) pendant un temps relativement long (quelques minutes). Or, chez ces souris déficientes en PKC $\gamma$ , si on induit d'abord une LTD dans les synapses hippocampiques, l'amplitude de la LTP produite par un tetanus redevient normale. La PKC $\gamma$  semble donc plutôt réguler l'induction de la plasticité cérébrale que contribuer directement à la modification de la transmission synaptique (Abeliovich et al., 1993).

Au niveau du cervelet, la LTD joue un rôle dans la mémoire implicite procédurale. Elle permet de mettre sous silence des réseaux neuronaux impliqués dans l'apprentissage de

mouvements erronés. Les souris déficientes en PKC $\gamma$  présentent des troubles de la coordination motrice avec une diminution de la LTD. L'utilisation d'inhibiteur des PKC bloque complètement la LTD chez des souris sauvages mais n'abolit pas la LTD qui subsiste chez les souris mutées. Il existe très probablement des phénomènes de compensation chez les souris mutées qui rendent difficile la compréhension du rôle de la PKC $\gamma$  dans ce circuit (Saito et Shiraj, 2002). En tout état, cette autre étude montre également le rôle régulateur de la PKC $\gamma$  dans la plasticité neuronale.

### 9.3.3. AUCUN ROLE DANS LA DOULEUR AIGUE

Ces mêmes souris ne présentent aucune différence de sensibilité aux stimuli mécaniques et thermiques nociceptifs par rapport aux animaux sauvages (Malmberg et al., 1997)

### 9.3.4. ROLE DANS LA SENSIBILISATION SECONDAIRE ET LA DOULEUR CHRONIQUE

L'injection intrathécale répétée de DAMGO (enképhaline agoniste spécifique des récepteurs opioïdes  $\mu$ ) provoque une translocation prolongée de PKC $\gamma$  et une désensibilisation des récepteurs  $\mu$  par l'activation des protéines G (Narita et al., 2001a). De même, l'activation des PKC $\gamma$  au niveau du cerveau antérieur après avoir réalisé un traitement à la morphine semble jouer un rôle majeur dans les phénomènes d'accoutumance (Narita et al., 2001b). A l'inverse, pour les souris délétées pour PKC $\gamma$ , il n'y a pas d'installation des phénomènes de tolérance aux agonistes des opioïdes  $\mu$  (Narita et al., 2001b). Ces études montrent l'implication de PKC $\gamma$  dans la voie des opioïdes  $\mu$  et dans les phénomènes d'accoutumance.

Un des principaux symptômes cliniques rencontré dans le sevrage morphinique spontané ou lorsqu'on utilise la naloxone est l'hyperalgésie thermique. Seule l'injection d'un antagoniste spécifique de la PKC $\epsilon$  bloque l'hyperesthésie induite par la naloxone. Les antagonistes spécifiques de PKC $\epsilon$  et de PKC $\gamma$  réversent l'hyperesthésie thermique provoquée par le sevrage aux morphiniques. Cette différence laisse penser que l'exposition à la morphine produit une sensibilisation précoce des afférences primaires sous la dépendance de la PKC $\epsilon$  qui est suivie par une phase secondaire de translocation de la PKC $\gamma$  impliquant une sensibilisation au niveau médullaire (Sweitzer et al., 2004).

Cette notion de rôle de la PKC $\gamma$  dans la sensibilisation secondaire est confirmée par le test au formol. L'injection de formol sous-cutané provoque un comportement douloureux biphasique. La phase 1 se caractérise par l'activation des afférences primaires et la phase 2 par l'activation des afférences primaires et la libération de neurotransmetteurs excitateurs au



niveau de la corne dorsale de la moelle épinière qui active les voies inhibitrices descendantes. La phase 2 se traduit par l'activation des fibres afférentes et par une sensibilisation au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière s'accompagnant d'une augmentation du comportement douloureux. Chez le rat âgé de 21 jours (P21), où le pic de PKC $\gamma$  a atteint son maximum, l'injection intrathécale d'un inhibiteur spécifique de PKC $\gamma$  provoque une diminution du comportement douloureux de la phase 2 après injection de formol dans la patte ; ce phénomène est inexistant chez les rats P7 (pour qui PKC $\gamma$  est peu présent dans la moelle épinière) et faiblement présent pour les rats P15 (Sweitzer et al., 2004). Cette information conforte l'idée que les neurones PKC $\gamma$  de la corne dorsale sont impliqués dans la sensibilisation et dans la douleur chronique.

#### 9.3.5. LA TRANSLOCATION DE PKC $\gamma$ S'ACCOMPAGNE D'UNE HYPERACTIVITE DES COURANTS NMDA

Au niveau médullaire, la PKC $\gamma$  est présente en abondance dans les noyaux moteurs. A ce niveau le sevrage en éthanol induit une hyperactivité des courants NMDA qui sont dépendant de la concentration en calcium des cellules. Le traitement des cellules par de l'éthanol induit une translocation de la PKC $\gamma$  du noyau vers le cytoplasme et majore l'effet de sevrage (Li et al., 2005). Le sevrage alcoolique chez le rat adulte se traduit par une augmentation de la sensibilité aux stimuli douloureux. Chez les rats âgés de 7 jours (P7), une seule injection d'éthanol suffit à déclencher une allodynie mécanique et une hyperalgésie. Par contre chez les rats âgés de 21 jours (P21), où l'expression de PKC $\gamma$  atteint son pic, les rats développent une allodynie mécanique plus précocement après l'injection d'éthanol et qui dure plus longtemps, mais ne développent pas d'hyperalgésie thermique. L'inhibition spécifique de PKC $\epsilon$  et  $\gamma$  atténue l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique chez les rats P7 alors que seule l'inhibition de PKC $\gamma$  empêche l'apparition de l'allodynie mécanique chez les rats P21. Chez les rats P7 le marquage de PKC $\epsilon$  au niveau de la racine dorsale et de PKC $\gamma$  au niveau de la moelle dorsale augmente 6 heures après l'injection d'alcool. Chez les rats P21, après le sevrage en éthanol, le marquage PKC $\epsilon$  reste inchangé alors que le marquage PKC $\gamma$  augmente et une translocation apparaît (Shumilla et al., 2005). Au niveau de la couche II, l'activation des PKC $\gamma$  potentialise les courants induits par N-méthyl-D-aspartate (NMDA) (Chen et Huang, 1992).

L'étude électrophysiologique des neurones de la couche dorsale de la moelle épinière lors du sevrage en éthanol montre une activité neuronale accrue médiée par les récepteurs NMDA (Shumilla et al., 2005). Ces données confortent l'idée que la translocation de PKC $\gamma$

dans un contexte d'hyperactivité des récepteurs NMDA s'accompagne de l'apparition d'une allodynie mécanique et qu'elle est fonction de l'âge.

### 9.3.6. IMPLICATION DE PKC $\gamma$ DANS LA DOULEUR INFLAMMATOIRE

L'hyperalgésie et l'allodynie sont des symptômes douloureux présents dans la douleur inflammatoire. L'activation isolée des récepteurs NMDA provoque une augmentation transitoire de l'excitabilité neuronale de la corne dorsale de la moelle épinière (Cumberbatch et al., 1994). Or l'activation des récepteurs NMDA est impliquée dans certains symptômes douloureux tels que l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie typiques de la douleur chronique (Larsson, 2009, Basbaum et Braz, 2010). Il y a donc forcément un second messenger après l'activation des récepteurs NMDA pour obtenir une hyperexcitabilité prolongée. Ce second messenger semble être la PKC $\gamma$ . Pour confirmer cette hypothèse, l'activité électrique des neurones à convergence de la couche V de la corne dorsale de la moelle épinière, recevant des influx nociceptifs et non-nociceptifs en provenance des fibres A et C de petit diamètre a été enregistrée chez des souris ayant eu une injection d'huile de moutarde dans la patte. L'amplitude et la durée d'activité des neurones à convergence ne diffèrent pas chez les souris sauvages et les souris déficientes en PKC $\gamma$  pour des stimuli mécaniques ou thermiques non nociceptifs. Par contre, la mesure des critères d'hyperexcitabilité neuronale (activité spontanée, décharges provoquées par le stimulus et post-décharges) montre une franche augmentation d'intensité et de durée au niveau des neurones de la couche V chez les souris sauvages par rapport aux souris déficientes. L'étude du comportement douloureux à travers la recherche de l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique retrouve un comportement similaire au début, puis au bout de 75 minutes, l'allodynie et l'hyperalgésie ont diminué chez les souris délétées alors qu'elles persistaient chez les souris sauvages. Le changement d'excitabilité des neurones de la couche V au cours d'un processus inflammatoire résulte de la sensibilisation de circuits au niveau de la corne dorsale impliquant des neurones PKC $\gamma$  (Martin et al., 2001). Le prétraitement par un antagoniste NMDA supprime l'hyperalgésie et l'allodynie dans les deux groupes. La PKC $\gamma$  ne joue pas de rôle dans l'induction de l'allodynie et de l'hyperalgésie dans la douleur inflammatoire mais elle joue un rôle dans son maintien.

### 9.3.7. IMPLICATION DE PKC $\gamma$ DANS LA DOULEUR NEUROPATHIQUE

La ligature du nerf infra-orbitaire chez le rat entraîne une diminution du seuil de retrait de la tête aux stimuli mécaniques statiques, évoquant une allodynie mécanique statique, entre le 1<sup>er</sup>

et le 14<sup>ème</sup> jour après la chirurgie. Elle s'accompagne aussi d'une augmentation de l'expression de PKC $\gamma$  au niveau du caudalis. L'administration d'un inhibiteur spécifique de PKC $\gamma$  réduit drastiquement le comportement de fuite lié à l'allodynie et l'expression de PKC $\gamma$  au niveau du caudalis. Ceci conforte l'implication de PKC $\gamma$  dans l'allodynie mécanique secondaire à une lésion nerveuse dans le territoire du trijumeau (Nakajima et al., 2011).

### 9.3.8. PKC $\gamma$ ET ALLODYNIE MECANIQUE NEUROPATHIQUE

Le développement de souris neuropathiques déficientes en PKC $\gamma$  (Malmberg, 1997) a permis de montrer que les allodynies mécanique est nettement diminuée par rapport aux souris sauvages. Cette modification comportementale s'accompagne d'une modification de la production de neuromédiateurs et de récepteurs au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. Usuellement, une lésion du nerf sciatique s'accompagne d'une diminution de l'immunoréactivité de la substance P (SP), d'une augmentation de l'immunoréactivité pour le neuropeptide Y (NPY) et les récepteurs NK-1 dans les couches I et II de la corne dorsale de la moelle épinière. Pour les souris déficientes en PKC $\gamma$ , on ne retrouve aucune de ces modifications. L'information provenant de la lésion nerveuse périphérique semble transmise au ganglion rachidien aussi bien chez les souris sauvages que déficientes. Comme les afférences primaires n'expriment pas le récepteur NK-1, on peut penser que la lésion nerveuse périphérique produit un changement neurochimique au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière impliquant des interneurons PKC $\gamma$  en aval des afférences primaires. Les cibles de ces interneurons contiennent peut-être des neurones NK-1. Ces travaux laissent supposer l'implication des interneurons PKC $\gamma$  dans la douleur neuropathique et une possible connexion avec des neurones NK-1 positifs de la couche I (Basbaum et Braz, 2010). D'autant plus que les neurones des couches I et II<sub>e</sub> répondent principalement aux messages nociceptifs véhiculés par les fibres C et A $\delta$ . Les neurones de la couche II<sub>i</sub>, couche caractérisée entre autre par son abondance en neurones PKC $\gamma$ , répondent préférentiellement aux afférences non nociceptives (Light, 1979). On peut donc supposer que PKC $\gamma$  joue un rôle crucial dans le traitement de l'information non-nociceptive et dans l'apparition d'une douleur neuropathique après lésion nerveuse.

### 9.3.9. PKC $\gamma$ ET ALLODYNIE MECANIQUE PROVOQUEE PAR UNE DESINHIBITION GLYCINERGIQUE

Les travaux précités ont permis de montrer l'implication des neurones PKC $\gamma$  dans le circuit de la douleur chronique. Les travaux de Miracourt et coll. (Miracourt, 2007 ; 2009)

ont montré que la création d'une désinhibition glycinergique en utilisant un antagoniste spécifique glycinergique, la strychnine, a permis de transformer le tact en douleur. Elle rend les neurones NS des couches superficielles sensibles aux stimuli tactiles non nociceptifs appliqués sur leurs champs récepteurs. L'analyse électrophysiologique couplée à une analyse immunohistochimique par marquage Fos a permis de révéler un circuit neuronal habituellement silencieux faisant intervenir les interneurons PKC $\gamma$ . Ce circuit permet le passage de l'information des afférences primaires A $\beta$  (véhiculant le tact) aux couches superficielles de la corne dorsale de la moelle projetant normalement l'information douloureuse vers les structures supra segmentaires. Ce circuit peut-être spécifiquement éteint en utilisant un antagoniste spécifique de PKC $\gamma$ , KIG 31-1.

## OBJECTIFS DU TRAVAIL

L'allodynie mécanique se caractérise cliniquement par une douleur évoquée par le toucher, que ce soit une pression légère ou un frottement sur la peau. Sur un plan mécanistique, il faut donc que l'information véhiculée par les afférences tactiles ou LTMRs soit perçue par le cerveau comme une douleur. Or, nous avons vu que ces afférences LTMRs, qu'elles soient de type A $\beta$ , A $\delta$  ou C, se terminent toutes dans les couches profondes, II<sub>i</sub> à V-VI, de la corne dorsale de la moelle/sous-noyau caudal (Seal et al., 2009; Li et al., 2011; voir revue Todd, 2010). Et, dans les conditions physiologiques, ces afférences n'activent pas les neurones de la couche I, à l'origine d'une des voies principales de projection de l'information douloureuse vers le cerveau. Cependant, des résultats obtenus par plusieurs équipes dont la nôtre ont clairement établi que :

- (i) il existe une voie polysynaptique, capable de transmettre les informations tactiles des couches profondes vers les neurones de la couche I de la corne dorsale de la moelle/sous-noyau caudal. Cette voie, non fonctionnelle en conditions physiologiques, a pu être mise en évidence après désinhibition GABAergique et/ou glycinergique (Torsney et MacDermott, 2006 ; Miraucourt et al., 2007 ; 2009) ;
- (ii) l'activation de cette voie est associée à la manifestation de l'allodynie mécanique dynamique (Miraucourt et al., 2007 ; 2009) ;
- (iii) cette voie implique les neurones PKC $\gamma$  de la couche II<sub>i</sub> sur lesquels se terminent des fibres afférentes myélinisées de type A (Neuman et al., 2008 ; Peirs et al., 2014). L'inactivation génétique (Malmberg et al., 1997 ; Zhao et al., 2011; Zou et al., 2011) ou pharmacologique (Miraucourt et al., 2007 ; 2009) de la PKC $\gamma$  inhibe l'expression de l'allodynie mécanique, statique et dynamique. Ces derniers résultats indiquent que l'activation de PKC $\gamma$  est **nécessaire** à l'expression de l'allodynie mécanique, après **désinhibition synaptique** (Miraucourt et al., 2007 ; 2009) ou dans des **modèles de douleurs neuropathiques** (Malmberg et al., 1997 ; Zhao et al., 2011; Zou et al., 2011), tout au moins.

En associant, chez le rat, étude comportementale de la sensibilité mécanique de la face et étude immunohistochimique phospho-ERK de l'activité cellulaire dans le sous-noyau caudal, nous avons répondu à deux questions :

**Question 1 : l'activation de la PKC $\gamma$  dans le sous-noyau caudal est-elle suffisante pour le développement d'une allodynie mécanique de la face?**

Nous savons que l'activation de PKC $\gamma$  est **nécessaire** à l'expression de l'allodynie mécanique. Mais est-elle **suffisante** ? La PKC peut être activée par le phorbol ester, 12,13-dibutyrate (PDBu). Cependant, cette activation n'est pas spécifique de l'isoforme  $\gamma$  de la PKC (pour revue voir Mochly-Rosen, 2012). Nous avons donc étudié l'effet combiné des applications locales (intracisternales) de PDBu et de l'antagoniste sélectif de la PKC $\gamma$ , KIG31-1. Tout effet déclenché par le PDBu mais bloqué par le KIG31-1 est vraisemblablement dû à l'activation de la PKC $\gamma$  dans le sous-noyau caudal.

**Question 2 : quel rôle joue la PKC $\gamma$  dans le développement de l'allodynie mécanique à la suite d'une lésion inflammatoire périphérique ?**

Le rôle de la PKC $\gamma$  dans le développement de l'allodynie mécanique est bien établi après **désinhibition synaptique** ou **lésion nerveuse périphérique**. Par contre, il l'est beaucoup moins dans l'allodynie mécanique d'origine **inflammatoire**. En effet, les données sont contradictoires. Chez les rats, un pré-traitement avec un antagoniste non sélectif de la PKC (Coderre, 1992; Yashpal et al., 1995; Wajima et al., 2000) ou sélectif de la PKC $\gamma$  (Sweitzer et al., 2004) réduit bien la réponse comportementale dans le test au formol. Mais l'inactivation génétique de la PKC $\gamma$  chez la souris n'a aucun effet sur ce même test au formol (Celierier et al., 2004; Zhao et al., 2011; mais voir Malmberg et al., 1997) ou au CFA (complete Freund's adjuvant) (Zhao et al., 2011).

Nous avons donc testé l'hypothèse que l'allodynie mécanique persistante observée à la suite d'une inflammation périphérique provoquée par une injection sous-cutanée de CFA dans la lèvre supérieure du rat est bien due à une activation de la PKC $\gamma$ . De plus, nous avons examiné si cette activation est nécessaire uniquement au développement de l'allodynie ou aussi à son maintien, en testant l'effet de l'injection intracisternales de l'antagoniste sélectif de la PKC $\gamma$ , KIG31, avant ou longtemps après celle de CFA.

**CHAPITRE II :**  
**L'ALLODYNIE MECANIQUE STATIQUE ET**  
**L'ALLODYNIE DYNAMIQUE DANS LE**  
**TERRITOIRE DU NERF TRIJUMEAU INDUITES**  
**PAR L'ACTIVATION DIRECTE DES**  
**INTERNEURONES PKC $\gamma$  DU CAUDALIS**  
**Activation of the Medullary Dorsal Horn PKC $\gamma$**   
**Interneurons Produces Static as well as Dynamic**  
**Mechanical Hypersensitivity**

**Activation of the Medullary Dorsal Horn PKC $\gamma$  Interneurons Produces Static as well as Dynamic Mechanical Hypersensitivity**

Nathalie Pham Dang<sup>1,2</sup>, Amélie Descheemaeker<sup>1</sup>, Radhouane Dallel<sup>1,2</sup>, Alain Artola<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clermont Université, Université d'Auvergne, Neuro-Dol, BP 10448, F-63000, Clermont-Ferrand & Inserm U1107, F-63100 Clermont-Ferrand, France; <sup>2</sup>CHU Clermont-Ferrand, Service d'Odontologie, F-63100 Clermont-Ferrand, France.

**Running title:** PKC $\gamma$  neurons mediate mechanical allodynia

**Correspondence to:**

Radhouane Dallel: [radhouane.dallel@udamail.fr](mailto:radhouane.dallel@udamail.fr)

INSERM/UdA U1107, Neuro-Dol: Douleur Trigéminal et Migraine

Faculté de Chirurgie Dentaire, 2 rue de Braga, 63100 Clermont-Ferrand, France

Tel: (33) 4 73 17 73 13, Fax: (33) 4 73 17 73 06

**Text pages:** 28, **Figures:** 5

**Abstract:** 199 words; **Introduction:** 421 words; **Discussion:** 1020 words



## **Abstract**

Activation of the  $\gamma$  isoform of protein kinase C (PKC $\gamma$ ) within the spinal (SDH) and medullary (MDH) dorsal horns has been shown to be necessary for the development of mechanical allodynia, a widespread and intractable symptom of inflammatory or neuropathic pain. We combined behavioral and anatomical approaches in rat MDH to examine whether PKC $\gamma$  activation is sufficient for the establishment of the two forms of mechanical allodynia: static and dynamic. Intracisternal injection of the phorbol ester, 12,13-dibutyrate (PDBu), concomitantly induced static as well as dynamic facial mechanical allodynias. Monitoring neuronal activity within MDH with phospho-ERK1/2 immunoreactivity revealed that activation of both laminae I-II<sub>o</sub> and II<sub>i</sub>-III<sub>o</sub> neurons, including lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$ -expressing interneurons, was associated with the manifestation of both mechanical allodynias. PDBu-induced mechanical allodynias and associated neuronal activations were all prevented by inhibiting selectively segmental PKC $\gamma$  with KIG31-1. Our results suggest that PKC $\gamma$  activation is not only necessary but also sufficient for the establishment of static and dynamic mechanical allodynia. Activation of PKC $\gamma$  within lamina II<sub>i</sub> interneurons appears to be a key element of central mechanisms implicated in mechanical allodynia, determining whether low-threshold mechanoreceptor inputs can gain access to the pain transmission circuitry of the superficial SDH/MDH and elicit pain.

## **Perspective**

Dissecting out the mechanisms of pain symptoms is revealing novel molecular targets which will lead to new drugs. That PKC $\gamma$  activation in lamina II<sub>i</sub> neurons appears to be sufficient for mechanical allodynia suggests that it would be advantageous to focus on these neurons for optimal treatment of mechanical pain hypersensitivity.

**Key words:** Allodynia, PKC $\gamma$  interneurons, PDBu, trigeminal, pain, orofacial

## Introduction

Chronic pain syndromes initiated by tissue damage and inflammation (inflammatory pain) or lesions to the nervous system (neuropathic pain) are characterized by pain hypersensitivity. Key symptoms of persistent pain syndromes include mechanical allodynia, painful sensation caused by innocuous mechanical stimuli like light touch. Moreover, two types of mechanical allodynia can be clinically discriminated in patients: a static one evoked by applying a gentle pressure on the skin and a dynamic one elicited by lightly stroking it.

Central mechanisms have been implicated in the development of mechanical allodynia. Touch-sensing, low-threshold mechanoreceptors (LTMRs), including all heavily myelinated A $\beta$ -fiber as well as A $\delta$ - and C-fiber LTMRs, terminate in deep spinal (SDH) and medullary (MDH) dorsal horns, between, inner lamina II (II<sub>i</sub>) and lamina V (13, 38, 41). Thus, lamina I neurons, one of the main nociceptive output pathways from the SDH/MDH to the brain, do not receive direct input from LTMRs. However, anatomical markers of neuronal activation, Fos protein or phospho-ERK1/2, have revealed that an activation of interneurons within superficial SDH/MDH, encompassing lamina I to outer lamina III (III<sub>o</sub>), is associated with mechanical allodynia (1, 19, 20). This indicates that a crosstalk between laminae can develop: LTMR inputs may then gain access to the pain transmission circuitry of superficial SDH/MDH via polysynaptic, ventral-to-dorsal excitatory pathways and elicit pain. It is important to note that the presence of such pre-existing circuits onto lamina I, nociceptive neurons was demonstrated under conditions of glycinergic and/or GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition (19, 37, 42) or neuropathic pain (12), indicating that, under physiological conditions, these circuits are usually blocked.

Among the lamina I-III<sub>o</sub> neurons that are activated by mechanical stimulation under mechanical allodynia are many interneurons of lamina II<sub>i</sub> which specifically express the  $\gamma$  isoform of protein kinase C (PKC $\gamma$ ) (19, 20). Interestingly, genetic or pharmacological

impairment of PKC $\gamma$  has been shown to prevent static as well as dynamic mechanical allodynia and the associated stimulus-evoked neuronal activations (17, 18, 19, 20, 47). Together with the evidence that such lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  interneurons receive inputs from myelinated LTMRs (16, 23, 30), this suggests that these neurons are key elements for circuits gating tactile inputs to lamina I nociceptive specific neurons, turning touch into pain.

Pervious evidence has established that activation of PKC $\gamma$  is necessary for the development of static and dynamic mechanical allodynia under conditions of disinhibition or neuropathic pain (see above). Here, using behavior and immunohistochemistry, we tested the hypothesis that activation of PKC $\gamma$  alone can produce both forms of mechanical allodynia. These experiments were performed within the trigeminal system of rats.

## **Methods**

### **Animals**

Male Sprague–Dawley rats (250 - 275 g) were obtained from Charles River (L'Arbresle, France). Rats were housed in plastic cages (3-4 rats per cage) with soft bedding and free access to food and water. They were maintained in climate- (23  $\pm$  1°C) and light-controlled (12:12-h dark:light cycle), protected units (Iffa-Credo) for at least 1 week before experiments. All efforts were made to minimize the number of animals used. All behavioral experiments started at 10.00 h a.m. Experiments followed the ethical guidelines of the International Association for the Study of Pain (46), of the Directive 2010/63/UE of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purpose. Protocols applied in this study were approved by the local animal experimentation committee: CEMEAA “Comité d’Ethique en Matière d’Expérimentation Animale Auvergne” (n° CE 28-

12). All experiments were conducted with the experimenters blinded to treatment conditions. Rats were randomized into treatment groups before any assessment was performed.

### **Chemicals**

Phorbol 12,13 dibutyrate (PDBu) was purchased from Sigma (France) and dissolved into ethanol 0.3% in aCSF. KIG31-131-1 was obtained from Kai Pharmaceuticals (San Francisco, CA, USA). It is conjugated to Tat, a peptide carrier, via a cysteine-cysteine bond at its N terminus. KIG31-131-1 competes with activated PKC $\gamma$  for binding to the isoenzyme-specific docking proteins, receptors for activated C kinase (RACK). This strategy prevents PKC $\gamma$  translocation in an isozyme-specific manner (5, 22). Linking of KIG31-1 to Tat enables efficient transfer of the peptide into cells (4).

### **Behavioral testing**

For investigating the effects of PDBu upon cutaneous mechanical sensitivity, rats were first habituated to stand on their hindpaws on the experimenter sleeve and lean against the experimenter chest in a quiet room under red light, according to a method adapted from Ren (3). The habituation required 1/2 hour during which animals were tested with von Frey filaments or gentle air puffing using a calibrated pump onto a region between the right vibrissa pad and the right upper lip, with carefully avoiding touching any vibrissa. Ascending and descending series of von Frey filaments (1.0–12 g; Bioseb, France) were used. Each filament was tested five times at intervals of at least 5 s. The habituation session was repeated during 2 days. At the end of the second habituation session, all rats responded to 6-g von Frey filament with only a simple detection, showing a non-aversive response. The actual testing session took place on the 3<sup>rd</sup> day. Rats were then placed in an observation field (0.6 x 0.6 m square) under red light for a 30-min habituation period during which the experimenter reached

into the cage to apply 6-g von Frey filament or gentle air puffing on the face of the animal. At the end of this habituation period, animals were briefly (< 3 min) anesthetized using a mask with 2% halothane and received an intracisternal injection (into the cisterna magna) of either PDBu (0.03, 0.3 and 3 nmol/5  $\mu$ l) or vehicle alone (5  $\mu$ l) using a 10  $\mu$ l Hamilton syringe. Artificial CSF consisted of: 150 mM Na<sup>+</sup>, 3 mM K<sup>+</sup>, 0.8 mM Mg<sup>2+</sup>, 1.4 mM Ca<sup>2+</sup>, 155 mM Cl<sup>-</sup>, pH 7.4, 295 mosmol.kg<sup>-1</sup>. After injection, animals were placed back within the observation field for a 10-min observation period recorded by a digital camera (Sanyo, USA) followed by a 120-min mechanical-testing period. Mechanical stimuli were applied with 6-g von Frey filament and gentle air puffing (1 s long) every 3 min onto the right upper lip. Each series of stimuli consisted of 5 stimuli, applied at an interval of at least 10 s. Stimulation was carried out when the rat was in a sniffing/no locomotion state: with four paws placed on the ground, neither moving nor freezing. The tip of the pump or von Frey filament was moved toward the target from behind the animal so that it could not see it. The behavioral responses to mechanical stimulations were observed and quantified according to the method developed by Vos et al. (45). Rat responses to mechanical stimuli consisted of one or more of the following elements: 1) detection, rats turn head toward stimulus; 2) withdrawal reaction, rats turn head away or pulls it briskly backward when stimulation is applied (a withdrawal reaction is assumed to include a detection element preceding the head withdrawal and therefore consists of two responses elements); 3) escape/attack, rats avoid further contact with the stimulus, either passively by moving their body away from the stimulus, or actively by attacking the tip of the pump or the filament; 4) asymmetric grooming, rats display an uninterrupted series of at least three wash strokes directed to the stimulated area. The following rank-ordered descriptive responses categories were formulated: no response, non aversive response, mild aversive response, strong aversive response, prolonged aversive behavior. Each category was given a score (0-4) based on the number of observed response

elements. This score is assumed to reflect the magnitude of the aversiveness evoked by mechanical stimuli. Score was equal to zero in case of no response. A mean score value was then calculated for each stimulation series. Behavior was always analyzed by a second experimenter who was blind to animal treatment.

For experiments investigating the effects of KIG31-1 upon PDBu-induced mechanical allodynia, animals were briefly (< 3 min) anesthetized using a mask with 2% halothane and received an intracisternal injection of either KIG31-1 (50 and 100 pmol/5  $\mu$ l) or Tat carrier alone (5  $\mu$ l) using a 10  $\mu$ l Hamilton syringe (19), 30 min before the intracisternal injection of PDBu.

### **Immunohistochemistry**

We assessed ERK1/2 phosphorylation under PDBu-induced mechanical allodynia. Rats were anaesthetized deeply with urethane (1.5 g.kg<sup>-1</sup> intraperitoneal) as previously described (20). Twenty min after induction of anesthesia, the depth of the anesthesia was assessed, and rats received an intracisternal injection of PDBu (3 nmol/5  $\mu$ l) or vehicle (5  $\mu$ l). Thirty min later, rats were stimulated with a paint brush (dynamic mechanical stimulus: for 10 min at 0.5 Hz) or 6-g von Frey filament (static mechanical stimulus: 60 times at 1 Hz) onto a region between the right vibrissa pad and upper lip. Two min later, rats were perfused transcardially with warm heparinized saline followed by cold 0.1 M phosphate-buffered solution pH 7.6 (PB) containing 4% paraformaldehyde (PFA) and 0.03% picric acid. The brainstem was removed and post-fixed for 2 h in the same fixative solution at 4°C and then cryoprotected in 30% sucrose diluted in 0.05 M Tris-buffered saline pH 7.4 (TBS) at 4°C for 24 h. Thirty  $\mu$ m coronal sections were cut on a freezing microtome and collected in TBS before being processed. Free-floating sections were placed in 2% normal goat serum (NGS) diluted in TBS containing 0.25% bovine serum albumin (BSA) and 0.3 % Triton X-100 (TBS-BSA-T) for 2

h before incubation in a polyclonal rabbit primary antibody directed against phospho-ERK1/2 (1:3000, Cell Signaling Technology, USA) diluted in TBS-BSA-T overnight at room temperature. Sections were then incubated for 90 min with the secondary antibody goat anti-rabbit conjugated with peroxidase (1:400, Vector Laboratories, Les Ulis, France). Immunoreactivity was revealed using nickel-diaminobenzidine (Vector Laboratories). In all cases, sections were rinsed in TBS several times, between and after each incubation, and finally transferred onto gelatinized slides before being coverslipped using DPX mountant for histology. Specificity controls consisted of omitting the primary antibody and incubating sections in inappropriate secondary antibodies. In all these controls, no specific staining was evident. A few selected sections were mounted separately and slightly counterstained with cresyl violet to help delineate the limits of MDH.

In a second series of experiments, we assessed ERK1/2 phosphorylation in PKC $\gamma$ -immunoreactive interneurons under PDBu-induced dynamic mechanical allodynia. Free floating sections were first treated with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl diluted in phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4 for 30 min at room temperature. After several washes in 0.1 M PBS with 0.2% Triton (PBS-Tx), sections were blocked by pre-incubation in 5% NGS in PBS-Tx for 1 h at room temperature. After washes in PBS-Tx, sections were incubated with a polyclonal rabbit primary antibody directed against phospho-ERK1/2 (1:1000, Cell Signaling) and a monoclonal mouse primary antibody directed against PKC $\gamma$  (1:4000, Sigma-Aldrich), diluted in 5% NGS in PBS-Tx for 24 h at 4°C. Sections were then washed with 5% NGS followed by washes in PBS-Tx. Tissues were incubated with a Cy2 conjugated goat anti-mouse secondary antibody (1:200, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) and a Cy3 conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (1:200, Jackson ImmunoResearch) diluted in 5% NGS in PBS-Tx for 1 h at room temperature. Finally, sections were washed in 5% NGS, in PBS-Tx

and then in PBS. Sections were transferred onto gelatinized slides before being coverslipped with DPX mountant for histology.

### **Data and statistical analysis**

Neurons containing phospho-ERK1/2 immunoreactivity in the MDH were photographed using a Nikon Optiphot 2 coupled with a 3CCD Sony DXC-950P digital camera at x10 and x20 magnifications. Neurons containing phospho-ERK1/2 and/or PKC $\gamma$  immunofluorescence in the MDH were photographed using a fluorescent Zeiss Axioplan 2 Imaging microscope coupled with a Hamamatsu C4742-95 digital camera, by switching between FITC and Rhodamine filter sets at x20 and x40 and x100 magnifications. Each image was then analyzed with Fiji-ImageJ 1.47 program (<http://rsbweb.nih.gov/ij> ; 36). Phospho-ERK1/2 and/or PKC $\gamma$  immunoreactive neurons were counted according to their location in the different laminae of the MDH from 7 different sections, each taken at a given rostrocaudal plane within MDH. Intervals of 400  $\mu$ m between planes ensured that cells were counted only once. The delineation of the MDH was based upon the Paxinos and Watson atlas (29) and our own myeloarchitectural atlas as determined by our previous work (30). The data are expressed as the sum of the total number of labeled cells counted from all 7 sections that were analyzed in each animal. Pictures were optimized for visual quality using Fiji-ImageJ 1.47 program at the end of analysis.

Results are presented as mean  $\pm$  s.e.m. Allodynias were analyzed using either one- or two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test (normally distributed data) or a Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks followed by a Newman-Keuls *post hoc* test (non-normally distributed data).. Data on phospho-ERK1/2 immunoreactive cells were analyzed using a Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks followed by a Newman-Keuls *post hoc* test. All



quantitative analysis, graphs and statistical tests were performed on SigmaStat. Figures were made using CorelDRAW® 12.

## **Results**

### **Activation of segmental PKC induces static as well as dynamic mechanical allodynia**

Intracisternal injection of PDBu produced a dose-dependent facial static as well as dynamic mechanical allodynia (Fig. 1). Interestingly, neither static nor dynamic mechanical allodynia was present at the first measurement (9-12 min after injection). But they both progressively developed over the first 20-30 min after injection to reach a peak (25 to 40 min after injection) and subsequently decrease (Fig. 1 A, C). Increasing the dose of intracisternal PDBu (0.03 to 3 nmol) led to (i) an increase in the peak score, (ii) a decrease in the time to peak (static: from 30-35 to 25 min; dynamic: 40 to 28 min) and (iii) an increase in the duration of allodynia. Accordingly, there was a dose-dependent increase in the areas-under-the curves of the time courses of static (Fig. 1C) and dynamic mechanical allodynia (Fig. 1D).

Of interest is the comparison between PDBu-induced static and dynamic mechanical allodynia. They concomitantly developed: for instance, following 3 nmol PDBu, they reached a peak at the same time (25-28 min), and their duration was similarly about 100 min (compare Fig. 1, A and B). Moreover, they exhibited similar dose-response curves (compare Fig. 1, C and D).

### **PDBu allows touch activation of laminae I-III<sub>o</sub> MDH neurons**

We used phospho-ERK1/2 immunoreactivity as an anatomical marker (10) to visualize MDH neurons that are activated by static (von Frey filament) and dynamic (lightly stroking with paint brush) mechanical stimuli in rats preemptively treated with intracisternal PDBu (Fig. 2

and 3). Compared with vehicle-treated rats, a strong ERK1/2 phosphorylation appeared within mostly ipsilateral MDH after both static (Fig. 2B and 3A) and dynamic mechanical stimulation (Fig. 2C and 3B) of the face in PDBu-treated rats. Von Frey filament- and light brush-induced phospho-ERK1/2 immunoreactivities were similarly located in superficial MDH, within laminae I-II<sub>o</sub> and II<sub>i</sub>-III<sub>o</sub>.

### **Lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$ interneurons are involved in PDBu-induced dynamic mechanical allodynia**

Among laminae I-III<sub>o</sub> interneurons the activation of which is associated with mechanical allodynia are many lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  interneurons (19, 20). To investigate if the activation of PKC $\gamma$  interneurons is also associated with PDBu-induced mechanical allodynias, we examined the phospho-ERK1/2 signal in PKC $\gamma$ -immunoreactive interneurons after mechanical stimulation with paint brush in PDBu-treated rats. Using dual immunocytochemistry, we found that  $26.5 \pm 5.6\%$  ( $n = 5$  in each group) of phospho-ERK1/2-immunoreactive cells within laminae II<sub>i</sub>-III<sub>o</sub> of ipsilateral MDH were also PKC $\gamma$  immunoreactive in rats under PDBu-induced dynamic mechanical allodynia, (Fig. 4). It is noteworthy that in control rats (intracisternal injection of vehicle) only very few phospho-ERK1/2-immunoreactive cells ( $4.0 \pm 4.0\%$ ;  $n = 5$ ) were also PKC $\gamma$  immunoreactive.

### **Selectively inhibiting PKC $\gamma$ prevents PDBu-induced static and dynamic mechanical allodynias**

PDBu is known to activate all PKC isoforms (21). Therefore, to test whether the effect of PDBu on cutaneous sensitivity is due to the activation of the  $\gamma$  isoform of PKC, we examined the effect of intracisternal injection, of the selective PKC $\gamma$  antagonist, KIG31-1 (50 and 100 pmol/5  $\mu$ l, 30 min before PDBu intracisternal injection), on 3 nmol PDBu-induced static and

dynamic mechanical allodynia. It dose-dependently prevented both static (Fig. 5A) and dynamic mechanical allodynias (Fig. 5B). This suggests that it is the activation of selectively PKC $\gamma$  that accounts for the effect of PDBu on cutaneous sensitivity. Moreover, the comparison of the dose-response curves of the inhibition by KIG31-1 of the PDBu-induced static and dynamic mechanical allodynias (Fig. 5, A and B insets) reveals that KIG31-1 equivalently inhibited the two mechanical allodynias: the largest dose of KIG31-1 produced a  $84.4 \pm 9.5$  and  $87.7 \pm 6.6\%$  ( $n = 5/\text{group}$ ) reduction in the areas-under-the curves of the PDBu-induced static and dynamic mechanical allodynia, respectively.

## Discussion

These experiments were designed to investigate the effect of selectively activating PKC $\gamma$  within MDH, on the trigeminal mechanical sensitivity. We found that intracisternal injection of PDBu concomitantly induced static as well as dynamic mechanical allodynia. Monitoring neuronal activity within MDH with phospho-ERK1/2 immunoreactivity revealed that activation of both laminae I-II<sub>o</sub> and II<sub>i</sub>-III<sub>o</sub> neurons, including lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$ -expressing interneurons, was associated with the expression of mechanical allodynia. PDBu-induced mechanical allodynias were both prevented by selective inhibition of segmental PKC $\gamma$  with KIG31-1.

It is now well established that PKC activation within SDH evokes pain hypersensitivity. Locally applied phorbol esters have been shown to produce punctate (measured with von Frey filaments) allodynia as well as hyperalgesia (28, 40) and heat hyperalgesia (11, 24, 25). Such mechanical and heat pain hypersensitivity is associated with enhanced both background activity and responses to cutaneous mechanical stimuli of nociceptive neurons (14, 27, 31). Interestingly, though, only neuronal responses to brush and punctate stimuli, but not to pinch,

appear to be enhanced (14, 27, 31). Finally, phorbol esters concomitantly facilitate excitatory synaptic transmission within SDH, including that at the first sensory synapse (8, 28, 39) and reduce inhibitory synaptic transmission (14, 31). It is noteworthy, however, that, whereas phorbol esters have been shown to reduce postsynaptic responses to glycine and GABA (15), they can conversely facilitate presynaptic GABA release (44). Altogether, these previous results clearly indicate that activation of PKC within DH leads to the development of central sensitization resulting in pain hypersensitivity. Unfortunately, phorbol esters activate the eight PKC isozymes (21). It is therefore not possible to assign a given effect to the activation of selectively a PKC isozyme. By combining the intracisternal injection of PDBu with that of the selective PKC $\gamma$  antagonist, KIG31-1, the present approach circumvents the lack of selectivity of phorbol esters: PDBu-dependent effects that are inhibited by KIG31-1 are likely due to the activation of selectively PKC $\gamma$ , the PKC isozyme which is restricted to a population of lamina II<sub>i</sub> SDH/MDH interneurons (30, 32).

The present findings strongly suggest that the activation of PKC $\gamma$  alone can trigger both static and dynamic mechanical allodynia. Genetic deletion or pharmacological inhibition of PKC $\gamma$  is known to prevent static (17, 18, 47) as well as dynamic mechanical allodynia (19, 20), indicating that activation of the PKC $\gamma$  isozyme within SDH/MDH is necessary for the induction of the two forms of mechanical allodynia. Our results suggest that PKC $\gamma$  activation is not only necessary but also sufficient. Activation of the PKC $\gamma$  isozyme within lamina II<sub>i</sub> interneurons appears to be the key factor determining whether LTMR inputs will gain access to the pain transmission circuitry of the superficial SDH/MDH and elicit pain.

In this study, we used ERK1/2 phosphorylation to assess MDH circuits underlying PDBu-induced static and dynamic mechanical allodynias. Stimulation of the skin with innocuous von Frey filament or light brush together with intracisternal PDBu activated ERK1/2 within I-II<sub>o</sub> and II<sub>i</sub>-III<sub>o</sub> neurons, including many lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$ -expressing cells. Such pattern of

neuronal activation is similar to that reported for the dynamic mechanical allodynia produced by intracisternal injection of the glycine receptor antagonist, strychnine (19, 20). It is now clear that polysynaptic ventral-to-dorsal excitatory pathways, through which LTMR inputs can gain access to the pain transmission circuitry of superficial SDH/MDH, are associated with mechanical allodynia. Thus, it has been shown that LTMR inputs can engage lamina I nociceptive neurons (i) in neuropathic rats expressing static mechanical allodynia (12), (ii) in rats expressing dynamic mechanical allodynia after local glycinergic disinhibition (19), and (iii) in SDH slices after combined GABA<sub>A</sub>ergic and glycinergic disinhibition (42). Such local dorsally-directed circuits begin in lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  interneurons that receive inputs from myelinated LTMRs (16, 23, 30). Our results are thus consistent with the conclusion that dorsally-directed local circuits are associated with mechanical allodynia: LTMRs signaling mechanical sensitivity to innocuous punctate (static mechanical allodynia) or light brushing (dynamic mechanical allodynia) stimuli directly activate lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  interneurons and these interneurons in turn engage lamina I nociceptive neurons through lamina II<sub>o</sub> interneurons (16). Our results suggest in addition that the local circuits beginning in lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  interneurons that are associated with static and dynamic mechanical allodynias are very similar if not the same. Indeed, static and dynamic mechanical allodynia were concomitantly induced after PDBu and exhibited similar time-courses (at all tested doses of PDBu) and dose-response curves (for both PDBu and KIG31-1).

Such conclusion is surprising in the view of previous studies reporting that each mechanical allodynia can manifest alone in patients (26) or develop independently in animal models of pain (6, 35). Moreover, pathways signaling static and mechanical allodynia also exhibit differences. That GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition induces a selectively static mechanical allodynia (20, 34) and glycinergic disinhibition a dynamic one indicates that the two pathways are under different inhibitory control (19, 20). Moreover, static mechanical allodynia is

selectively sensitive to morphine (3, 6, 7, 20) and amitriptyline (7), and the dynamic one to amimexiletine and ketamine hydrochloride (35).

Interestingly, though, static and dynamic mechanical allodynia are known to be signaled by different primary afferents: static mechanical allodynia by A $\delta$ -fiber (6, 26, 38, 43) and dynamic one by A $\beta$ -fiber LTMRs (2). One possibility is therefore that the pathways signaling static and dynamic mechanical allodynias are different until the first synapse onto lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  interneurons but common from PKC $\gamma$  interneurons onto lamina I nociceptive output neurons. The different modulations of static and dynamic mechanical allodynias differences might thus be accounted for by the different properties of A $\beta$ - or A $\delta$ -fiber LTMRs and their synapses onto PKC $\gamma$  interneurons. For instance, excitatory A $\beta$ -inputs onto PKC $\gamma$  interneurons have recently been shown to be controlled by selectively glycinergic feed-forward inhibitory circuits (16).

In summary, these findings suggest that, once PKC $\gamma$  is activated, any LTMR input onto lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  interneurons can engage lamina I nociceptive neurons through a common dorsally-directed local circuit and elicit pain. That PKC $\gamma$  activation is sufficient for the manifestation of mechanical allodynia confirms that lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  neurons are key elements for local circuits associated with static as well as dynamic mechanical allodynia. This suggests that it would be advantageous to focus on these neurons for management mechanical pain hypersensitivity.

### **Acknowledgments**

This work was supported by funding from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Université Clermont-Ferrand 1 (France), and Région Auvergne (France). We thank Anne-Marie Gaydier for secretarial assistance.

**Conflict of interest**

The authors declare no competing financial interest.

**Author contributions**

Study concept and design: NP, and RD. Acquisition of data: NP, and AD. Analysis and interpretation of data: NP, AD, RD and AA. Drafting of the manuscript: NP, RD, and AA.

Obtained funding: RD. Study supervision: AA, RD.

## References

1. Bester H, Beggs S, Woolf CJ. Changes in tactile stimuli-induced behavior and c-Fos expression in the superficial dorsal horn and in parabrachial nuclei after sciatic nerve crush. *J Comp Neurol* 428:45-61, 2000.
2. Campbell JN, Raja SN, Meyer RA, Mackinnon SE. Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury. *Pain* 32:89-94, 1998.
3. Catheline G, Le Guen S, Besson JM. Intravenous morphine does not modify dorsal horn touch-evoked allodynia in the mononeuropathic rat: a Fos study. *Pain* 92:389-398, 2001.
4. Chen L, Wright LR, Chen CH, Oliver SF, Wender PA, Mochly-Rosen D. Molecular transporters for peptides: delivery of a cardioprotective epsilonPKC agonist peptide into cells and intact ischemic heart using a transport system, R(7). *Chem Biol* 8:1123-1129, 2001.
5. Churchill EN, Qvit N, Mochly-Rosen D. Rationally designed peptide regulators of protein kinase C. *Trends Endocrinol Metab* 20:25-33, 2009.
6. Field MJ, Bramwell S, Hughes J, Singh L. Detection of static and dynamic components of mechanical allodynia in rat models of neuropathic pain: are they signaled by distinct primary sensory neurones? *Pain* 83:303-311, 1999a.
7. Field MJ, McCleary S, Hughes J, Singh L. Gabapentin and pregabalin, but not morphine and amitriptyline, block both static and dynamic components of mechanical allodynia induced by streptozocin in the rat. *Pain* 80:391-398, 1999b.
8. Gerber G, Kangrga I, Ryu PD, Larew JS, Randic M. Multiple effects of phorbol esters in the rat spinal dorsal horn. *J Neurosci* 90:3606-17, 1989.
9. Gonzalez M I, Field MJ, Hughes J, Singh L. Evaluation of selective NK(1) receptor antagonist CI-1021 in animal models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 294:444-450, 2000.



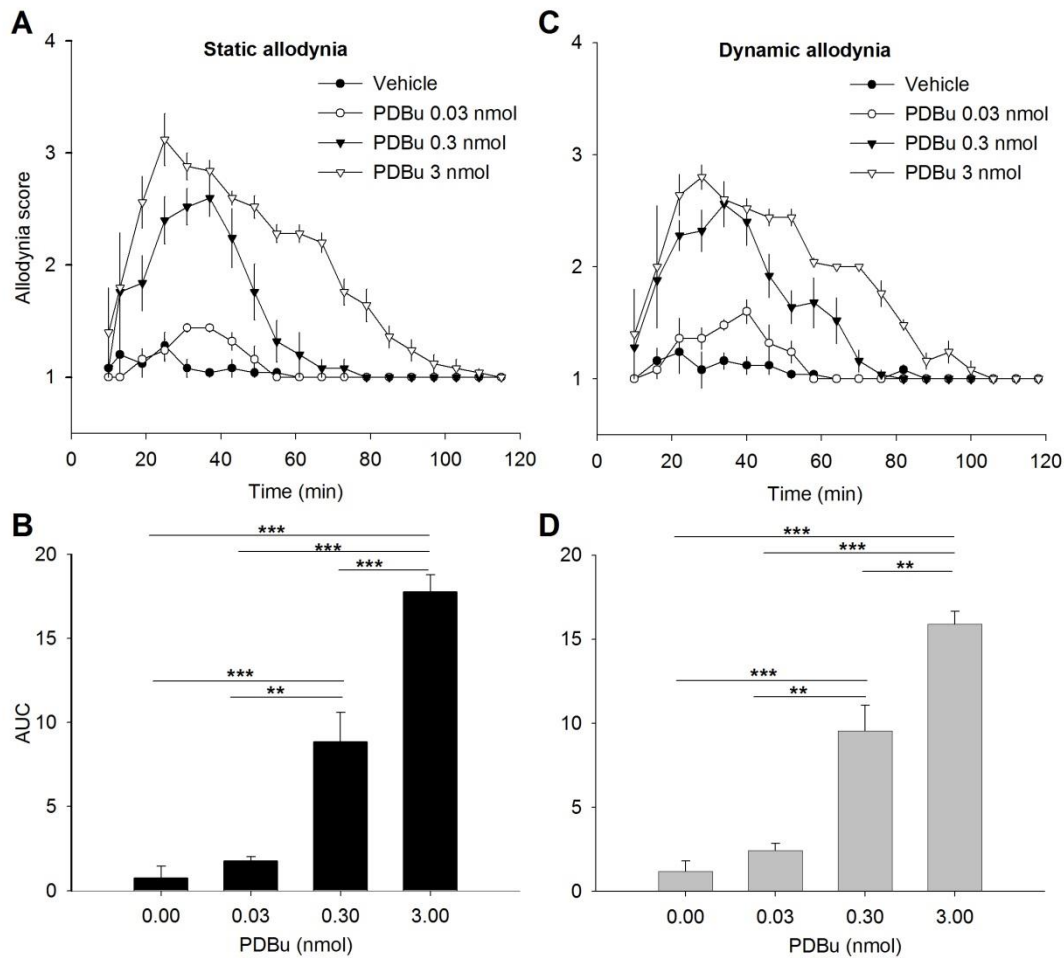
10. Ji RR, Gereau RW, Malcangio M, Strichartz GR. MAP kinase and pain. *Brain Res Rev* 60:135-148, 2009.
11. Kamei J, Zushida K. The role of spinal cholecystinin B receptors in thermal allodynia and hyperalgesia in diabetic mice. *Brain Res* 892:370-5, 2001.
12. Keller F, Beggs S, Salter MW, De Koninck Y. Transformation of the output of spinal lamina I neurons after nerve injury and microglia stimulation underlying neuropathic pain. *Molecular Pain* 3:27, 2007.
13. Li L, Rutlin M, Abaira VE, Cassidy C, Kus L, Gong S, Jankowski MP, Luo W, Heintz N, Koerber HR, Woodbury CJ, Ginty DD. The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons. *Cell* 147:1615-1627, 2011.
14. Lin Q, Peng YB, Willis WD. Inhibition of primate spinothalamic tract neurons by spinal glycine and GABA is reduced during central sensitization. *J Neurophysiol* 76:1005-1, 1996.
15. Lin Q, Peng YB, Willis WD. Possible role of protein kinase C in the sensitization of primate spinothalamic tract neurons. *J Neurosci* 16:3026-34, 1996.
16. Lu Y, Dong H, Gao Y, Gong Y, Ren Y, Gu N, Zhou S, Xia N, Sun YY, Ji RR, Xiong L. A feed-forward spinal cord glycinergic neural circuit gates mechanical allodynia. *J Clin Invest* 123:4050-4062, 2013.
17. Malmberg AB, Chen C, Tonegawa S, Basbaum AI. Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC $\gamma$ . *Science* 278:279-283, 1997.
18. Martin WJ, Malmberg AB, Basbaum AI. PKC $\gamma$  contributes to a subset of the NMDA-dependent spinal circuits that underlie injury-induced persistent pain. *J Neurosci* 21:5321-5327, 2001.
19. Miraucourt LS, Dallel R, Voisin DL. Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through PKC $\gamma$  interneurons. *PLoS One* 2:e1116, 2007.

20. Miraucourt LS, Moisset X, Dallel R, Voisin DL. Glycine inhibitory dysfunction induces a selectively dynamic, morphine-resistant, and neurokinin 1 receptor- independent mechanical allodynia. *J Neurosci* 29:2519-2527, 2009.
21. Mochly-Rosen D, Das K, Grimes KV. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nat Rev Drug Discov* 11:937-57, 2012.
22. Mochly-Rosen D, Gordon AS. Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB J* 12:35-42, 1998.
23. Neumann S, Braz JM, Skinner K, Llewellyn-Smith IJ, Basbaum AI. Innocuous, not noxious, input activates PKC $\gamma$  interneurons of the spinal dorsal horn via myelinated afferent fibers. *J Neurosci* 28:7936-7944, 2008.
24. Niikura K, Kobayashi Y, Okutsu D, Furuya M, Kawano K, Maitani Y, Suzuki T, Narita M. Implication of spinal protein kinase C $\gamma$  isoform in activation of the mouse brain by intrathecal injection of the protein kinase C activator phorbol 12,13-dibutyrate using functional magnetic resonance imaging analysis. *Neurosci Lett* 433:6-10, 2008.
25. Niikura K, Narita M, Okutsu D, Tsurukawa Y, Nanjo K, Kurahashi K, Kobayashi Y, Suzuki T. Implication of endogenous beta-endorphin in the inhibition of the morphine-induced rewarding effect by the direct activation of spinal protein kinase C in mice. *Neurosci Lett* 433:54-8, 2008.
26. Ocho JL, Yarnitsky D. Mechanical hyperalgesias in neuropathic pain patients: dynamic and static subtypes. *Ann Neurol* 33:465-472, 1993.
27. Palecek J, Palecková V, Dougherty PM, Willis WD. The effect of phorbol esters on the responses of primate spinothalamic neurons to mechanical and thermal stimuli. *J Neurophysiol* 71:529-37, 1994.

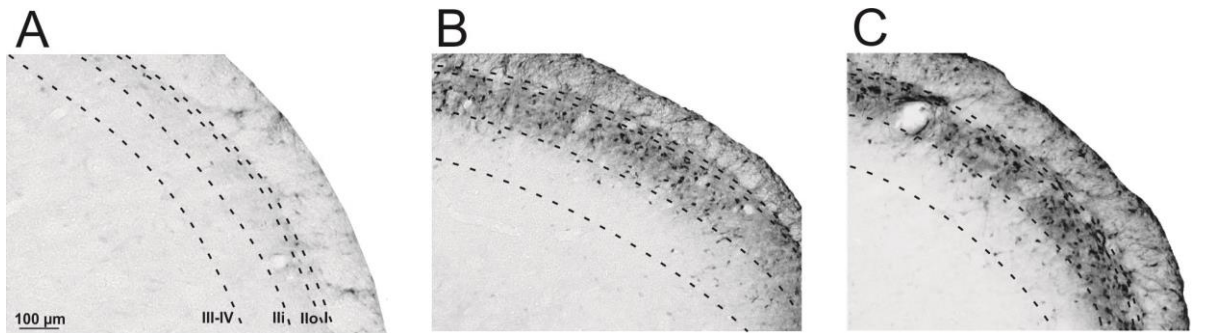
28. Palecek J, Paleckova V, Willis WD. The effect of phorbol esters on spinal cord amino acid concentrations and responsiveness of rats to mechanical and thermal stimuli. *Pain* 80:597-60, 1999.
29. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press, 1997.
30. Peirs C, Patil S, Bouali-Benazzouz R, Artola A, Landry M, Dallel R. Protein kinase C gamma interneurons in the rat medullary dorsal horn: distribution and synaptic inputs to these neurons, and subcellular localization of the enzyme. *J Comp Neurol* 522:93-413, 2014.
31. Peng YB, Lin Q, Willis WD. Involvement of protein kinase C in responses of rat dorsal horn neurons to mechanical stimuli and periaqueductal gray descending inhibition. *Exp Brain Res* 114:561-7, 1997.
32. Polgar E, Fowler JH, McGill MM, Todd AJ. The types of neuron which contain protein kinase C gamma in rat spinal cord. *Brain Res* 833:71-80, 1999.
33. Ren K. An improved method for assessing mechanical allodynia in the rat. *Physiol. Behav* 67:711-716, 1999.
34. Roberts LA, Beyer C, Komisaruk BR. Nociceptive responses to altered GABAergic activity at the spinal cord. *Life Sci* 39:1667-1674, 1986.
35. Sasaki A, Serizawa K, Andoh T, Shiraki K, Takahata H, Kuraishi Y. Pharmacological differences between static and dynamic allodynia in mice with herpetic or postherpetic pain. *J Pharmacol Sci* 108:266-273, 2008.
36. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676-682, 2012.

37. Schoffnegger D1, Ruscheweyh R, Sandkühler J. Spread of excitation across modality borders in spinal dorsal horn of neuropathic rats. *Pain* 135:300-10, 2008.
38. Seal, RP, Wang X, Guan Y, Raja SN, Woodbury CJ, Basbaum AI, Edwards RH. Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature* 462:651-655, 2009.
39. Sikand P, Premkumar LS. Potentiation of glutamatergic synaptic transmission by protein kinase C-mediated sensitization of TRPV1 at the first sensory synapse. *J Physiol* 581:631-4, 2007.
40. Sluka KA, Audette KM. Activation of protein kinase C in the spinal cord produces mechanical hyperalgesia by activating glutamate receptors, but does not mediate chronic muscle-induced hyperalgesia. *Mol Pain* 2:13, 2006.
41. Todd AJ. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci* 11:823-836, 2010.
42. Torsney C, MacDermott AB. Disinhibition opens the gate to pathological pain signaling in superficial neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord. *J Neurosci* 26:1833-1843, 2006.
43. Treede RD, Cole JD. Dissociated secondary hyperalgesia in a subject with a large-fibre sensory neuropathy. *Pain* 53:169-174, 1993.
44. Vergnano AM, Schlichter R, Poisbeau P. PKC activation sets an upper limit to the functional plasticity of GABAergic transmission induced by endogenous neurosteroids. *Eur J Neurosci* 26:1173-82, 2007.
45. Vos BP, Strassman AM, Maciewicz RJ. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *J Neurosci* 14:2708-2723, 1994.

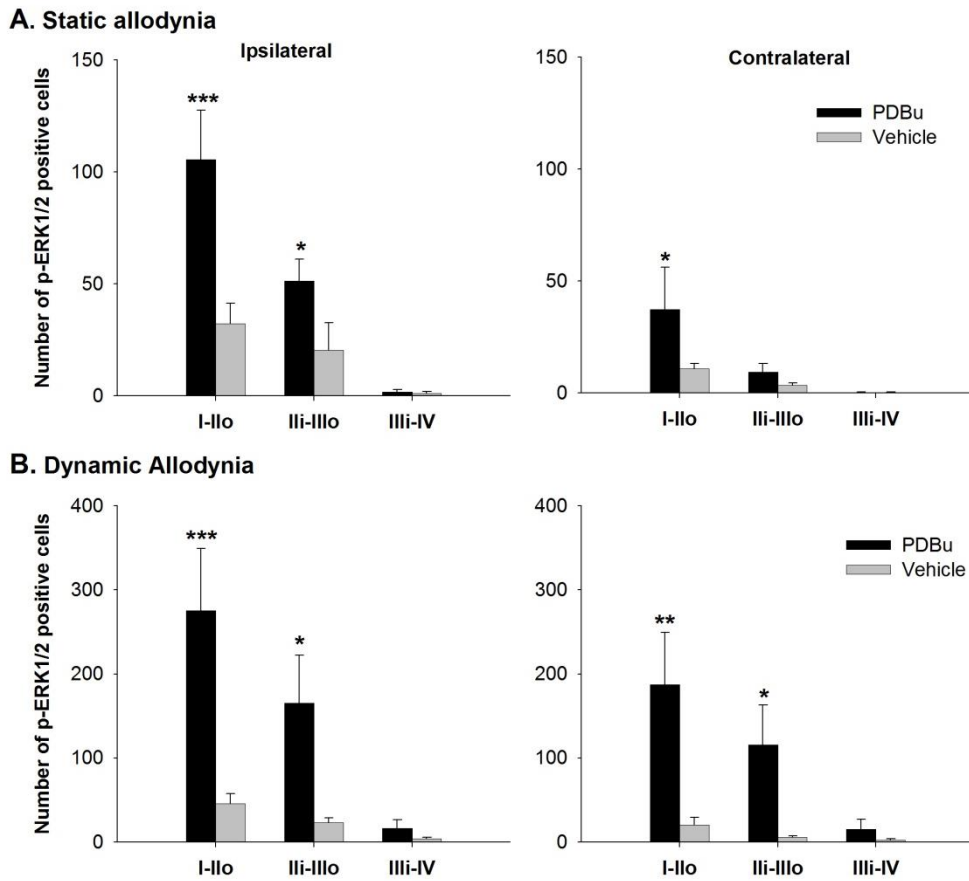
46. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109-110, 1983.
47. Zou W, Song Z, Guo Q, Liu C, Zhang Z, Zhang Y. Intrathecal lentiviral-mediated RNA interference targeting PKC $\gamma$  attenuates chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Hum Gene Ther* 22:465-475, 2011.



**Figure 1. Intracisternal injection of PDBu induces a dose-dependent facial static as well as dynamic mechanical allodynia.** Time courses of the changes in behavioral responses (**A**, **C**) and bar histograms of the corresponding areas under the curves (**B**, **D**) evoked by static (6-g von Frey filament; **A**, **C**) and dynamic mechanical stimuli (air puff; **B**, **D**) applied on the face of rats intracisternally injected with vehicle (5  $\mu$ l) or PDBu (0.03, 0.3 and 3 nmol/5  $\mu$ l). Data are represented as mean  $\pm$  s.e.m. Statistical analysis in **B** and **D** was performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; n = 5 per group; \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001.

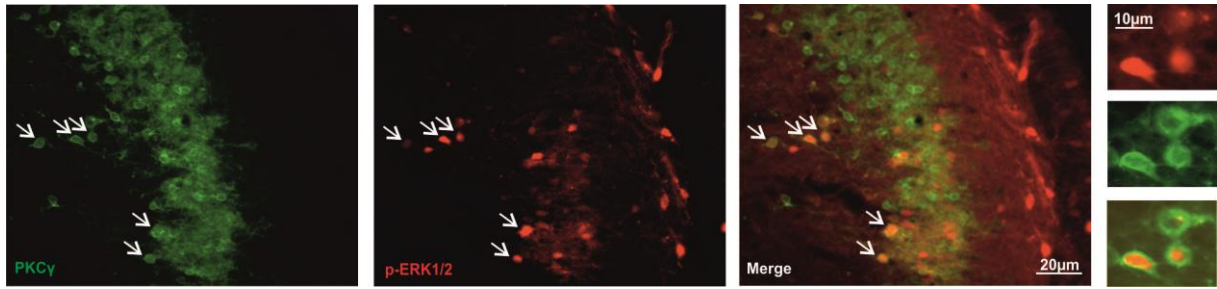


**Figure 2. Neural circuits associated with PDBu-induced static and dynamic mechanical allodynia both encompass laminae I-III<sub>o</sub>: examples.** Images of phospho-ERK1/2 immunolabeling in the MDH of rats 30 min after intracisternal injection of vehicle (5  $\mu$ l; **A**) or PDBu (3 nmol/5  $\mu$ l, **B**, **C**) with static (6-g von Frey filament, **B**) or dynamic mechanical stimulation (light brushing; **C**) applied on the face. Stippled lines indicate, from dorsal to ventral, the limits of lamina I and outer (II<sub>o</sub>) and inner (II<sub>i</sub>) lamina II. There is no or very few phospho-ERK1/2 immunoreactive cells following intracisternal vehicle but many within laminae I-II<sub>o</sub> as well as lamina II<sub>i</sub>-outer lamina III (III<sub>o</sub>) after static and dynamic mechanical stimulation following intracisternal PDBu.

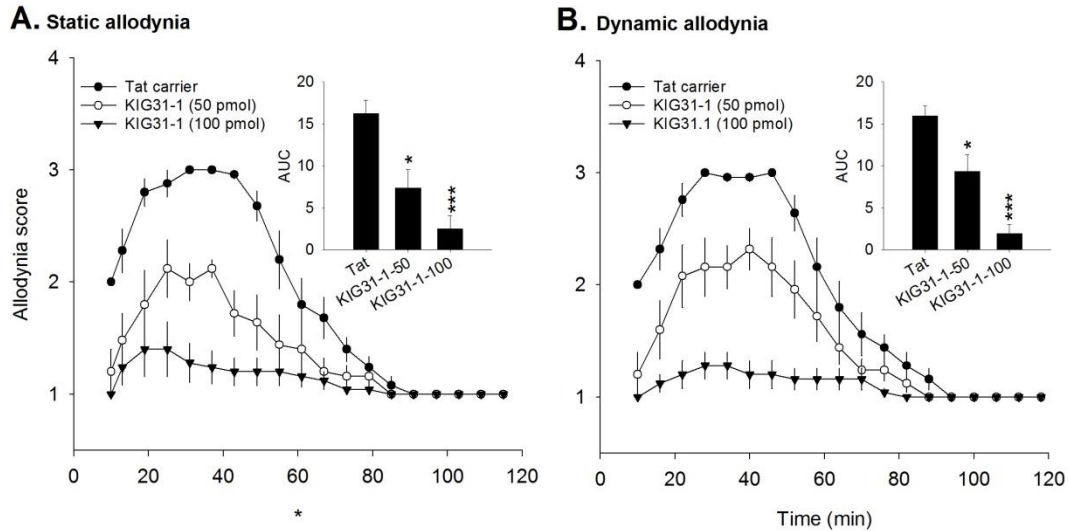


**Figure 3. Neural circuits associated with PDBu-induced static and dynamic mechanical allodynia both encompass laminae I-III<sub>o</sub>.** **A, B:** Bar histograms of the number of phospho-ERK1/2 immunoreactive neurons in the different laminae of the ipsilateral and contralateral MDH in rats after intracisternal injection of PDBu (3 nmol/5  $\mu$ l) or vehicle (5  $\mu$ l), evoked by static (6-g von Frey filament 60 times at 1 Hz, **A**) or dynamic mechanical stimuli (light brushing at 0,5 Hz for 10 min; **B**) applied on the face. **A, B:** I-II<sub>o</sub>, lamina I and outer lamina II; II<sub>i</sub>-III<sub>o</sub>, inner lamina II and outer lamina III; III<sub>i</sub>-IV, inner lamina III to lamina IV. Data are represented as mean  $\pm$  s.e.m. Von Frey filament and light brush both induce a strong phospho-ERK1/2 immunoreactivity, similarly located in superficial MDH, within laminae I-II<sub>o</sub> and II<sub>i</sub>-III<sub>o</sub>. Note that paint brush induces a much stronger phospho-ERK1/2 immunoreactivity than von Frey filament (compare ordinates). Statistical analysis was performed using a Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks followed by a Newman-Keuls *post hoc* test; n = 5 per group; \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001.





**Figure 4. PKC $\gamma$ -immunoreactive interneurons in lamina II<sub>i</sub> are activated by dynamic mechanical stimuli in rats under PDBu-induced mechanical allodynia.** Fluorescence images of phospho-ERK1/2-immunoreactive cells (red), PKC $\gamma$ -immunoreactive interneurons (green), and double labeled neurons (white arrows) within lamina II<sub>i</sub> of the MDH in rats after intracisternal injection of PDBu (3 nmol/5  $\mu$ l) and dynamic mechanical stimuli (lightly stroking the skin with paint brush) applied on the face. Insets show the double labeled neurons.



**Figure 5. Intracisternal injection of KIG31-1 dose-dependently prevents PDBu-induced static as well as dynamic mechanical allodynia. A, B:** Time courses of changes in behavioral responses evoked by static (6-g von Frey filament; **A**) and dynamic mechanical stimuli (air puff; **B**) applied on the face of rats intracisternally injected with PDBu (3 nmol/5  $\mu$ l). Rats were preemptively intracisternally injected with either Tat-carrier (5  $\mu$ l) or KIG31-1 (50 or 100 pmol/5  $\mu$ l). Insets show the corresponding areas-under-the curves of the time courses. Data are represented as mean  $\pm$  s.e.m. Statistical analysis in A and B insets was performed using Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks followed by a Newman-Keuls *post hoc* test (static allodynia) or one-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test (dynamic allodynia); n = 5 per group; \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001.



### **CHAPITRE III:**

# **LES INTERNEURONES PKC $\gamma$ SONT IMPLIQUES DANS L'INITIATION MAIS PAS LE MAINTIEN DE L'ALLODYNIE MECANIQUE STATIQUE DANS UN MODELE DE RAT PRESENTANT UNE DOULEUR INFLAMMATOIRE ORO-FACIALE PERSISTANTE**

**PKC $\gamma$  Interneurons are involved in the initiation but not maintenance of static mechanical allodynia in the rat model of persistent orofacial inflammatory pain**

**PKC $\gamma$  Interneurons are involved in the initiation but not maintenance of static mechanical allodynia in the rat model of persistent orofacial inflammatory pain**

Nathalie Pham Dang<sup>1,2</sup>, Amélie Descheemaeker<sup>1</sup>, Alain Artola<sup>1</sup>, Radhouane Dallel<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Clermont Université, Université d'Auvergne, Neuro-Dol, BP 10448, F-63000, Clermont-Ferrand & Inserm U1107, F-63100 Clermont-Ferrand, France; <sup>2</sup>CHU Clermont-Ferrand, Service d'Odontologie, F-63100 Clermont-Ferrand, France.

**Running title:** PKC $\gamma$  neurons mediate static mechanical allodynia

**Correspondence to:**

Alain Artola: alain.artola@udamail.fr

Radhouane Dallel: [radhouane.dallel@udamail.fr](mailto:radhouane.dallel@udamail.fr)

INSERM/UdA U1107, Neuro-Dol: Douleur Trigéminal et Migraine

Faculté de Chirurgie Dentaire, 2 rue de Braga, 63100 Clermont-Ferrand, France

Tel: (33) 4 73 17 73 13, Fax: (33) 4 73 17 73 06

**Text pages:**, **Figures:** 6;

**Abstract:** 217 words; **Introduction:** 482 words; **Discussion:** 1486 words

## ABSTRACT

Inflammatory and neuropathic chronic pain syndromes are characterized by pain hypersensitivity, manifest as spontaneous pain, allodynia and hyperalgesia. The  $\gamma$  isoform of protein kinase C (PKC $\gamma$ ), which is concentrated in a specific class of interneurons within inner lamina II (II<sub>i</sub>) of the spinal (SDH) and medullary (MDH) dorsal horns, has been implicated in the central mechanisms underlying mechanical allodynia, a condition wherein touch produces pain. However, whereas there is clear evidence for the involvement of PKC $\gamma$  in neuropathic mechanical allodynia, that for the involvement of PKC $\gamma$  in inflammatory mechanical allodynia is still controversial. Using behavioral and immunohistochemical techniques, we investigated the involvement of PKC $\gamma$  into the persistent mechanical allodynia induced by complete Freund's adjuvant (CFA) inflammation. Subcutaneous injection of CFA into the vibrissa pad of rats induced a persistent static, but not dynamic, mechanical allodynia. Monitoring neuronal activity within MDH with phospho-ERK1/2 immunoreactivity showed that activation of both laminae I-II<sub>o</sub> and II<sub>i</sub>-III<sub>o</sub> neurons, including lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$ -expressing interneurons, was associated with the expression of static mechanical allodynia. Intracisternal injection of the selective PKC $\gamma$  antagonist, KIG31-1, prevented CFA-induced static mechanical allodynia only when it was injected before, but not 3 days after, CFA injection. These results show that the PKC $\gamma$  interneurons are involved in the initiation but not maintenance of static mechanical allodynia in persistent orofacial inflammatory pain.

## INTRODUCTION

Chronic pain syndromes initiated by tissue damage and inflammation (inflammatory pain) or lesions to the nervous system (neuropathic pain) are characterized by pain hypersensitivity. Key symptoms of persistent pain syndromes are spontaneous pain (pain experienced in the absence of any identifiable peripheral stimulus), hyperalgesia (enhanced pain perception to noxious stimuli) and allodynia (pain in response to normally innocuous stimulus). Moreover, two types of mechanical allodynia can be clinically discriminated in patients with neuropathic syndromes: a static one evoked by applying a gentle pressure on the skin and a dynamic one elicited by lightly stroking it.

Mechanical allodynia requires that innocuous inputs elicit a nociceptive percept or response. Primary afferents terminate within the spinal and medullary dorsal horns (SDH, MDH) according to their sensory modality: fine primary afferents, either lightly myelinated A $\delta$ - or unmyelinated C-fibers, including most nociceptors, innervate the more superficial laminae, I and outer II (II<sub>o</sub>), whereas touch-sensing, low-threshold mechanoreceptors (LTMRs), including all heavily myelinated A $\beta$ -fiber as well as A $\delta$ - and C-LTMR fibers, terminate in deeper laminae, inner II (II<sub>i</sub>) to V (Seal et al., 2009; Li et al., 2011; for review see Todd, 2010). Under physiological conditions, information from different modalities are kept separate and neurons in lamina I, one of the main nociceptive output pathways from the spinal cord to the brain, do not receive direct input from A-fiber LTMRs. It has been demonstrated under conditions of disinhibition that (i) polysynaptic, ventral to dorsal circuits that can drive up innocuous inputs toward lamina I output neurons are associated with mechanical allodynia (Torsney and MacDermott, 2006; Miraucourt et al., 2007), and that (ii) these circuits are gated by neurons within inner lamina II (II<sub>i</sub>) that specifically concentrate the  $\gamma$  isoform of the protein kinase C (PKC $\gamma$ ) (Miraucourt et al., 2007; 2009; for review see Braz et al., 2014). Significant evidence supports a role for PKC $\gamma$  also in the development of neuropathic

mechanical allodynia (Malmberg et al., 1997; Zhao et al., 2011; Zou et al., 2011; Lu et al., 2013). On the other hand, whether PKC $\gamma$  is involved in inflammatory pain is still a matter of discussion. In rats, intrathecal pretreatment with non selective PKC (Coderre, 1992; Yashpal et al., 1995; Wajima et al., 2000) or selective PKC $\gamma$  antagonists (Sweitzer et al., 2004) reduces nociceptive behavior in the formalin test. But genetic deletion of PKC $\gamma$  in mice fails to alter formalin-induced nociceptive behavior (Celerier et al., 2004; Zhao et al., 2011; but see Malmberg et al., 1997) and complete Freund's adjuvant (CFA)-induced mechanical allodynia (Zhao et al., 2011).

Therefore, using behavioral and immunohistochemical techniques, we tested the hypothesis that the orofacial persistent mechanical allodynia following CFA-induced inflammation is mediated by an enhanced activation of PKC $\gamma$ . Moreover, we examined to what extent PKC $\gamma$  activation is involved in the development and/or maintenance of inflammatory mechanical allodynia by applying the specific PKC $\gamma$  antagonist, KIG31-1, before or 3 days after the subcutaneous injection of CFA.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

Male Sprague–Dawley rats (250 - 275 g) were obtained from Charles River (L'Arbresle, France). Rats were housed in plastic cages (3-4 rats per cage) with soft bedding and free access to food and water. They were maintained in climate- ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) and light-controlled (12:12-h dark:light cycle), protected units (Iffa-Credo) for at least 1 week before experiments. All efforts were made to minimize the number of animals used. Experiments were performed on 32 animals (5-6 rats/group). All behavioral experiments started at 10.00 h a.m. Experiments followed the ethical guidelines of the International Association for the Study of Pain



(Zimmermann, 1983), of the Directive 2010/63/UE of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purpose. Protocols applied in this study were approved by the local animal experimentation committee: CEMEAA "Comité d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale Auvergne" (n° CE 28-12). All experiments were conducted with the experimenters blinded to treatment conditions. Rats were randomized into treatment groups before any assessment was performed.

### **Chemicals**

Complete Freund's adjuvant (CFA) was purchased from Sigma (Difco Laboratories, Detroit, USA). KIG31-131-1 was obtained from Kai Pharmaceuticals (San Francisco, CA, USA). It is conjugated to Tat, a peptide carrier, via a cysteine-cysteine bond at its N terminus. KIG31-131-1 competes with activated PKC $\gamma$  for binding to the isoenzyme-specific docking proteins, receptors for activated C kinase. This strategy prevents PKC $\gamma$  translocation in an isozyme-specific manner (Mochly-Rosen and Gordon, 1998; Churchill et al., 2009). Linking of KIG31-1 to Tat enables efficient transfer of the peptide into cells (Chen et al., 2001).

### **Behavioral testing**

For investigating the effects of CFA upon cutaneous mechanical sensitivity, rats were first habituated to stand on their hindpaws on the experimenter sleeve and lean against the experimenter chest in a quiet room under red light, according to a method adapted from Ren (1999). The habituation required 1/2 hour during which animals were tested with von Frey filaments or gentle air puffing using a calibrated pump onto the right vibrissa pad, with carefully avoiding touching any vibrissa. Ascending and descending series of von Frey filaments (1.0-12 g; Bioseb, France) were used. Each filament was tested five times at intervals of at least 5 s. The habituation session was repeated during 2 days. At the end of the

second habituation session, all rats responded to 6-g von Frey filament with only a simple detection, showing a non-aversive response. The actual testing session took place on the 3<sup>rd</sup> day. Rats were then placed in an observation field (0.6 x 0.6 m square) under red light for a 30-min habituation period during which the experimenter reached into the cage to apply 6-g von Frey filament or gentle air puffing on the face of the animal. At the end of this habituation period, animals were briefly (< 3 min) anesthetized using a mask with 2% halothane and received a subcutaneous injection of CFA (25 µl) into the right vibrissa pad using a 30G gauge needle as previously described (Pelissier et al., 2002). After injection, animals were placed back within the observation field for a 10-min observation period recorded by a digital camera (Sanyo, USA) followed by a 120-min mechanical-testing period. Mechanical stimuli were alternatively applied with 6-g von Frey filament and gentle air puffing (1 s long) every 3 min onto the right vibrissa pad. Each series of stimuli consisted of 5 stimuli, applied at an interval of at least 10 s. Stimulation was carried out when the rat was in a sniffing/no locomotion state: with four paws placed on the ground, neither moving nor freezing. The tip of the pump or von Frey filament was moved toward the target from behind the animal so that it could not see it. The behavioral responses to mechanical stimulations were observed and quantified according to the method developed by Vos et al. (1994). Rat responses to mechanical stimuli consisted of one or more of the following elements: 1) detection, rats turn head toward stimulus; 2) withdrawal reaction, rats turn head away or pulls it briskly backward when stimulation is applied (a withdrawal reaction is assumed to include a detection element preceding the head withdrawal and therefore consists of two responses elements); 3) escape/attack, rats avoid further contact with the stimulus, either passively by moving their body away from the stimulus, or actively by attacking the tip of the pump or the filament; 4) asymmetric grooming, rats display an uninterrupted series of at least three wash strokes directed to the stimulated area. The following rank-ordered descriptive responses categories

were formulated: no response, non aversive response, mild aversive response, strong aversive response, prolonged aversive behavior. Each category was given a score (0-4) based on the number of observed response elements. This score is assumed to reflect the magnitude of the aversiveness evoked by mechanical stimuli. Score was equal to zero in case of no response. A mean score value was then calculated for each stimulation series. Behavior was always analyzed by a second experimenter who was blind to animal treatment.

### **Intracisternal injections**

For experiments investigating the effects of KIG31-1 upon CFA-induced mechanical allodynia, animals were briefly (< 3 min) anesthetized using a mask with 2% halothane and received an intracisternal injection of either KIG31-1 (100 pmol/5  $\mu$ l) or Tat carrier alone (5  $\mu$ l) using a 10  $\mu$ l Hamilton syringe (Miraucourt et al., 2007), either 30 min before or 3 days after CFA injection.

### **Immunohistochemistry**

In a first series of experiments, we assessed extracellular-signal regulated kinase 1/2 phosphorylation (phospho-ERK1/2) under CFA-induced mechanical allodynia. Rats were anaesthetized deeply with urethane (1.5 g.kg<sup>-1</sup> intraperitoneal) as previously described (Miraucourt et al., 2009) and received a subcutaneous injection of CFA (25  $\mu$ l) or vehicle alone into the right vibrissa pad using a 30 G gauge needle. Two hours after the injection, the depth of the anesthesia was assessed, 5 CFA and 5 vehicle were stimulated with a paint brush (dynamic mechanical stimulus: for 10 min at 0.5 Hz) or 6-g von Frey filament (static mechanical stimulus: 60 times at 1 Hz) onto a region between the right vibrissa pad and upper lip, whereas the 5 other CFA animals did not receive any stimulation. CFA rats were randomly assigned to one of the two CFA groups (stimulated and unstimulated). Two min

later, rats were perfused transcardially with warm heparinized saline followed by cold 0.1 M phosphate-buffered solution pH 7.6 (PB) containing 4% paraformaldehyde (PFA) and 0.03% picric acid. The brainstem was removed and post-fixed for 2 h in the same fixative solution at 4°C and then cryoprotected in 30% sucrose diluted in 0.05 M Tris-buffered saline pH 7.4 (TBS) at 4°C for 24 h. Thirty  $\mu$ m coronal sections were cut on a freezing microtome and collected in TBS before being processed. Free-floating sections were placed in 2% normal goat serum (NGS) diluted in TBS containing 0.25% bovine serum albumin (BSA) and 0.3 % Triton X-100 (TBS-BSA-T) for 2 h before incubation in a polyclonal rabbit primary antibody directed against phospho-ERK1/2 (1:3000, Cell Signaling Technology, USA) diluted in TBS-BSA-T overnight at room temperature. Sections were then incubated for 90 min with the secondary antibody goat anti-rabbit conjugated with peroxidase (1:400, Vector Laboratories, Les Ulis, France). Immunoreactivity was revealed using nickel-diaminobenzidine (Vector Laboratories). In all cases, sections were rinsed in TBS several times, between and after each incubation, and finally transferred onto gelatinized slides before being coverslipped using DPX mountant for histology. Specificity controls consisted of omitting the primary antibody and incubating sections in inappropriate secondary antibodies. In all these controls, no specific staining was evident. A few selected sections were mounted separately and slightly counterstained with cresyl violet to help delineate the limits of MDH.

In a second series of experiments, we assessed ERK1/2 phosphorylation in PKC $\gamma$ -immunoreactive interneurons under CFA-induced static mechanical allodynia. Free floating sections were first treated with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl diluted in phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4 for 30 min at room temperature. After several washes in 0.1 M PBS with 0.2% Triton (PBS-Tx), sections were blocked by pre-incubation in 5% NGS in PBS-Tx for 1 h at room temperature. After washes in PBS-Tx, sections were incubated with a polyclonal rabbit primary antibody directed against phospho-ERK1/2 (1:1000, Cell Signaling) and a

monoclonal mouse primary antibody directed against PKC $\gamma$  (1:4000, Sigma-Aldrich), diluted in 5% NGS in PBS-Tx for 24 h at 4°C. Sections were then washed with 5% NGS followed by washes in PBS-Tx. Tissues were incubated with a Cy2 conjugated goat anti-mouse secondary antibody (1:200, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) and a Cy3 conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (1:200, Jackson ImmunoResearch) diluted in 5% NGS in PBS-Tx for 1 h at room temperature. Finally, sections were washed in 5% NGS, in PBS-Tx and then in PBS. Sections were transferred onto gelatinized slides before being coverslipped with DPX mountant for histology.

### **Data and statistical analysis**

Neurons containing phospho-ERK1/2 immunoreactivity in the MDH were photographed using a Nikon Optiphot 2 coupled with a 3CCD Sony DXC-950P digital camera at x10 and x20 magnifications. Neurons containing phospho-ERK1/2 and/or PKC $\gamma$  immunofluorescence in the MDH were photographed using a fluorescent Zeiss Axioplan 2 Imaging microscope coupled with a Hamamatsu C4742-95 digital camera, by switching between FITC and Rhodamine filter sets at x20 and x40 and x100 magnifications. Each image was then analyzed with Fiji-ImageJ 1.47 program (<http://rsbweb.nih.gov/ij> ; Schindelin et al., 2012). Phospho-ERK1/2 and/or PKC $\gamma$  immunoreactive neurons were counted according to their location in the different laminae of the MDH from 7 different sections, each taken at a given rostrocaudal plane within MDH. Intervals of 400  $\mu$ m between planes ensured that cells were counted only once. The delineation of the MDH was based upon the Paxinos and Watson atlas (1997) and our own myeloarchitectural atlas as determined by our previous work (Peirs et al., 2014). The data are expressed as the sum of the total number of labeled cells counted from all 7 sections that were analyzed in each animal. Pictures were optimized for visual quality using Fiji-ImageJ 1.47 program at the end of analysis.

SigmaStat (version 2.03 for Windows, Jandel Scientific, Erkrath, Germany) was used for analyzing the data throughout the study. Data on CFA-induced mechanical allodynia was assessed using Friedman Repeated Measures (RM) analysis of variance (ANOVA) on ranks with post-hoc Student-Newman-Keuls test (non-normally distributed data). Data on the effect of KIG31-1 upon CFA-induced mechanical allodynia were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post hoc test. Data on phospho-ERK1/2 immunoreactive were analyzed using either one-way ANOVA (normally distributed data) or a Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks followed by a Newman-Keuls *post hoc* test (non-normally distributed data). The level of significance was set at  $P < 0.05$ . Results are presented as mean  $\pm$  SEM.

## RESULTS

### **Subcutaneous injection of CFA into the vibrissa pad induces a static, but not dynamic, mechanical allodynia.**

We first assessed the responses to mechanical stimuli applied on the vibrissa pad with the 6-g von Frey filament and air puff after a subcutaneous injection of CFA (25  $\mu$ l) into the vibrissa pad. Mechanical stimulation with the 6-g von Frey filament evoked an aversive response that was already significant at the first measurement (+ 10 min after injection) and progressively increased, reaching the most aversive response categories within about 1 h after injection (Friedman RM ANOVA on ranks with post-hoc Student-Newman-Keuls test,  $P < 0.001$ ,  $n = 5$ ) (Fig. 1). Allodynia scores to 6-g von Frey filament stimulation remained elevated for at least 2 weeks (see Fig. 6 right for after 3 days). Importantly, CFA concomitantly produced only minor changes in response to air puff stimulation: allodynia scores that were slightly elevated only at the first measurements (+ 10 and 16 min after injection; Friedman RM ANOVA on ranks with post-hoc Student-Newman-Keuls test,  $P < 0.05$ ,  $n = 5/\text{group}$ ),

returned to pre-injection levels within 40 min after injection (Fig. 1). This indicates that subcutaneous injection of CFA induces a persistent, selectively static mechanical allodynia.

### **Laminae I-III<sub>o</sub> MDH circuits are associated with the expression of CFA-induced static mechanical allodynia**

ERK1/2 has been reported to be quickly phosphorylated after noxious stimuli in neurons of spinal DH (Ji et al., 2009). But phospho-ERK1/2 signal can also be induced by tactile stimulation following inflammation or nerve injury (Ji et al., 2009). Therefore, we used phospho-ERK1/2 immunoreactivity as an anatomical marker to visualize MDH neurons that were activated by punctate mechanical stimulation (6-g von Frey filament) of the upper lip following subcutaneous injection of CFA into the vibrissa pad. Neither mechanical stimulation following saline injection nor CFA injection, alone, induced ERK1/2 phosphorylation in either the ipsilateral and contralateral MDH (Fig. 2). On the other hand, mechanical stimulation after CFA injection produced a strong increase in ERK1/2 phosphorylation within the ipsilateral MDH. Such mechanical stimulation-evoked ERK phosphorylation occurred within both superficial laminae I-II<sub>o</sub> (Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks followed by a Newman-Keuls *post hoc* test,  $P < 0.001$ ,  $n = 5$ ) and deeper laminae II<sub>i</sub>-III<sub>o</sub> (Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks followed by a Newman-Keuls *post hoc* test,  $P < 0.001$  and  $P < 0.01$  compared with saline + stimulation and CFA alone, respectively;  $n = 5$ ) (Fig. 2). Surprisingly, ERK1/2 phosphorylation also increased following mechanical stimulation in CFA-treated rats within contralateral MDH, but such increase was small and only in the most superficial laminae I-II<sub>o</sub> (Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks followed by a Newman-Keuls *post hoc* test,  $P < 0.05$ ,  $n = 5$ ). These results indicate that the expression of static mechanical allodynia in the CFA model of pain is associated with the

activation of a neuronal network within superficial MDH encompassing laminae I to III<sub>o</sub> interneurons.

Sensory information from the vibrissa pad flows to the ipsilateral MDH via the V2 trigeminal branch. To further confirm that MDH neuronal circuits associated with static mechanical allodynia are actually engaged by afferents from the vibrissa pad, we examined whether stimulation-evoked neuronal activation after CFA injection was located within the corresponding projection area in MDH. ERK phosphorylation produced by punctate mechanical stimulation in CFA-treated rats mostly occurred within the ipsilateral V2 projection area (Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks followed by a Newman-Keuls *post hoc* test,  $P < 0.001$  compared CFA-stimulated group with both vehicle-stimulated and CFA groups;  $n = 5$ ) (Fig. 3). There was also a small ERK1/2 phosphorylation within the neighboring ipsilateral V1 and V3 projection areas (Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks followed by a Newman-Keuls *post hoc* test,  $P < 0.05$  compared CFA-stimulated group with both vehicle-stimulated and CFA groups;  $n = 5$ ). On the other hand, there was no ERK1/2 phosphorylation within the controlateral MDH (Fig. 3). In the rostrocaudal direction, stimulation-induced ERK1/2 phosphorylation in CFA-treated rats was located mainly within the -800 to -2000  $\mu\text{m}$  levels (relative to the most caudal tip of the subnucleus interpolaris/MDH transition region) of the ipsilateral MDH (Fig. 4). These results are consistent with the conclusion that neuronal circuits underlying static mechanical allodynia are engaged by afferents that transmit non-nociceptive information from the vibrissa pad.

### **Lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$ interneurons are involved in the expression of CFA-induced static mechanical allodynia**

That genetic impairment of PKC $\gamma$  prevents nerve injury-induced cutaneous hypersensitivity to punctate mechanical stimuli (Malmberg et al., 1997; Martin et al., 2001; Zou et al., 2011)



suggests that activation of PKC $\gamma$  is a prerequisite for the expression of static mechanical allodynia. To investigate if activation of PKC $\gamma$  is also required for inflammation-induced static mechanical allodynia, we first examined the phospho-ERK1/2 signal in PKC $\gamma$ -immunoreactive interneurons after mechanical stimulation applied on the vibrissa pad with the 6-g von Frey filament (Fig. 5). Using dual immunocytochemical labeling, we found that  $22 \pm 3\%$  ( $n = 5$ ) phospho-ERK1/2-immunoreactive cells within laminae II<sub>i</sub>-III<sub>o</sub> of the ipsilateral MDH were also PKC $\gamma$  immunoreactive. Altogether, these results indicate that the expression of CFA-induced facial static mechanical allodynia is associated with the activation of neuronal circuits within the superficial MDH including lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  neurons.

**Activation of PKC $\gamma$  contributes to the induction but not the maintenance of CFA-induced static mechanical allodynia.**

To directly test whether activation of PKC $\gamma$  is necessary for the expression of inflammation-induced static mechanical allodynia, we examined the effect of the intracisternal application of the selective PKC $\gamma$  antagonist, KIG31-1 (100 pmoles in 5  $\mu$ l) on CFA-induced static mechanical allodynia.

In a first series of experiments, KIG31-1 was applied 30 min before the subcutaneous injection of CFA. KIG31-1 then completely prevented CFA-induced static mechanical allodynia (two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test,  $P < 0.001$ ,  $n = 6$ /group) (Fig. 6, left).

In a second series of experiments, we tested the effect of the same KIG31-1 application on the persistent inflammatory static mechanical allodynia; that is, 3 days after the subcutaneous injection of CFA into the vibrissa pad. Surprisingly, then, KIG31-1 had no effect on the static mechanical allodynia: allodynia scores remained at their highest level, similar to those of Tat carrier-treated rats ( $n = 5$ /group) (Fig. 6, right).

## DISCUSSION

These experiments were designed to investigate the involvement of PKC $\gamma$  in inflammatory static mechanical allodynia. Subcutaneous injection of CFA into the vibrissa pad of rats induces a persistent static, but not dynamic, mechanical allodynia. Monitoring neuronal activity within MDH with phospho-ERK1/2 immunoreactivity shows that the expression of inflammatory static mechanical allodynia is associated with the activation of both laminae I-II<sub>o</sub> and II<sub>i</sub>-III<sub>o</sub> neurons, including lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$ -expressing interneurons. The selective PKC $\gamma$  antagonist, KIG31-1 prevents CFA-induced static mechanical allodynia only when it is applied before CFA injection.

CFA is a model of persistent inflammatory pain widely used for the evaluation of the pharmacological action of analgesic drugs (for review see Zhang and Ren, 2011; Krzyzanowska and Avendaño, 2012). Subcutaneous injection of CFA is known to produce both thermal hyperalgesia and mechanical allodynia, lasting for at least 2 weeks. However, the actual type of mechanical allodynia has never been determined. Indeed, only the sensitivity to static mechanical stimuli is usually assessed with von Frey filaments (Zhang and Ren, 2011; Krzyzanowska and Avendaño, 2012) or noxious heat stimulation (Yashpal et al., 1995). Here, using dynamic (air puff or lightly stroking with a paint brush) as well as static mechanical stimuli (von Frey filaments), we show that subcutaneous injection of CFA produces a selectively static mechanical allodynia.

Intracisternal application of the selective PKC $\gamma$  antagonist, KIG31-1, 30 min before CFA injection, prevented static mechanical allodynia. It is noteworthy that previous results on the role of PKC $\gamma$  into CFA-induced mechanical allodynia are rather controversial. Western blot analysis of phosphorylated PKC $\gamma$  (phospho-PKC $\gamma$ ), the active form of PKC $\gamma$  (for review see Sossin, 2007), indicates that CFA injection into the hind limb leads to a rapid (10 min

after CFA injection) and enduring (for at least 3 days) increase in phospho-PKC $\gamma$  within the lumbar SDH of mice (Honore et al., 2000; Cheng et al., 2008; Weyerbacher et al., 2010) but, surprisingly, not of rats (Igwe and Chronwall, 2001). It has to be noted, however, that, in rats, CFA inflammation was shown to significantly enhance PKC $\gamma$ -immunolabeling within ipsilateral lumbar SDH (Martin et al., 1999). Finally, in mice, CFA-induced mechanical allodynia is not altered by genetic deletion of PKC $\gamma$  (Zhao et al., 2011). Therefore, the present results clearly establish that activation of PKC $\gamma$  within MDH is necessary for CFA-induced static mechanical allodynia. We recently showed that activation of PKC $\gamma$  within MDH is sufficient for inducing mechanical allodynia (Pham Dang et al., *subm.*). Though evidence in rats is controversial (see above), it is nevertheless possible that CFA inflammation leads to an increased activation of PKC $\gamma$  and, in turn, to the development of static mechanical allodynia. Then compensatory mechanisms during development might account for the lack of effect of the genetic deletion of PKC $\gamma$  on CFA-induced mechanical allodynia. For instance, other PKC isoforms, such as the PKC $\beta$ II isozyme (Igwe and Chronwall, 2001), are likely involved in the transmission of nociceptive messages in sustained inflammatory pain.

Phospho-ERK1/2 immuno-labeling reveals that the expression of CFA-induced static mechanical allodynia is associated with the activation of interneurons within lamina I-III<sub>o</sub> of the MDH. Phospho-ERK1/2 immunoreactive neurons in inflamed-stimulated rats were located within lamina I-II<sub>o</sub> and lamina II<sub>i</sub>-III and included many lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$ -immunoreactive neurons. Moreover, phospho-ERK1/2 immunoreactivity was highly topographically relevant as it was restricted to the projection area of V2 afferents within the ipsilateral MDH. Such pattern of neuronal activation is similar to that associated with both static mechanical allodynia following intracisternal injection of a phorbol-ester (Pham Dang et al., *subm.*) and dynamic mechanical allodynia produced by either nerve injury (Bester et al., 2000) or intracisternal injection of a glycine receptor antagonist (Miraucourt et al., 2007;

2009) or phorbol ester (Pham Dang et al., *subm.*). Touch-sensing, low-threshold mechanoreceptors (LTMRs), including all heavily myelinated A $\beta$ -fiber as well as A $\delta$ - and C-fiber LTMRs, terminate in deep SDH/MDH, between laminae II<sub>i</sub> and V (Seal et al., 2009; Todd et al., 2010; Li et al., 2011). To elicit pain, LTMRs need to gain access to the pain transmission circuitry of the superficial SDH/MDH. There is now clear evidence for a dorsally-directed flow of information within SDH/MDH (Schoffneger et al., 2008; for review see Braz et al., 2014). Thus, it has been shown that LTMR inputs can engage lamina I nociceptive neurons (i) in neuropathic rats expressing static mechanical allodynia (Keller et al., 2007), (ii) in rats expressing dynamic mechanical allodynia after local glycinergic disinhibition (Miraucourt et al., 2007), and (iii) in SDH slices after combined GABA<sub>A</sub>ergic and glycinergic disinhibition (Torsney and MacDermott, 2006). Such local dorsally-directed circuits begin in lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  interneurons that receive inputs from myelinated LTMRs (Neumann et al., 2008; Lu et al., 2013; Peirs et al., 2014). Our results are thus consistent with the conclusion that dorsally-directed local circuits are associated with CFA-induced static mechanical allodynia: LTMRs signaling mechanical sensitivity to innocuous punctate stimuli directly activate lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  interneurons and these interneurons in turn engage lamina I nociceptive neurons through lamina II<sub>o</sub> interneurons.

A most intriguing question raised by our data is why PKC $\gamma$  antagonist prevents mechanical allodynia when it is applied shortly before CFA injection, but does not suppress cutaneous mechanical hypersensitivity when applied 3 days after. PKC $\gamma$  might be involved in the induction but not the maintenance of MDH neuronal plasticity associated with static mechanical allodynia. Peripheral activity, inflammation and neural injury result in an enhancement in the function of neurons and circuits in nociceptive pathways caused by increases in membrane excitability and synaptic efficacy as well as to reduced inhibition; such plasticity of pain pathways, ultimately contributing to persistent pain states, is referred to as

central sensitization (for review see Latremoliere and Woolf, 2009). It is long known that selective inhibition of postsynaptic PKC blocks the induction of long-term potentiation (LTP), the most intensively studied cellular model for memory induction (Reymann et al., 1988; Malenka et al., 1989; Malinow et al., 1989). However, PKC $\gamma$  does not seem to be part of the molecular machinery that produces LTP but rather a key regulatory component (Abeliovich et al., 1993; for review see Malenka and Nicoll, 1999). Only the atypical PKC isozyme  $\zeta$ , PKM $\zeta$ , might be involved in spinal persistent nociceptive processing, specifically, the manifestation of chronic pain states following peripheral inflammation (Marchand et al., 2011). Therefore, accordingly, the PKC $\gamma$  antagonist would prevent the induction of plastic processes leading to static mechanical allodynia but not reverse the neuronal changes underlying it. However, it is not sure that CFA-induced plasticity processes are over after 3 days. ERK1/2 plays critical roles in regulating neural plasticity and pain sensitization after tissue and nerve injury (for review see Ji et al., 2009). CFA-induced activations of PKC $\gamma$  and ERK1/2 within SDH are both NMDA receptor-dependent (Ji et al., 1999; Cheng et al., 2008; Park et al., 2009; Weyerbacher et al., 2010). Following injection of CFA into the hind paw, phospho-ERK1/2 can be only transiently expressed in SDH (peaking at 10 min and reverting to baseline levels by 2 days), despite the presence of on-going peripheral inflammation, heat hyperalgesia and mechanical allodynia (Ji et al., 2002; Gao and Ji, 2010). But there also reports of much longer phospho-ERK1/2 expression (4-7 days: Adwanikar et al., 2004; Yang et al., 2007; Weyerbacher et al., 2010; Zhang et al., 2014), suggesting that CFA-induced plasticity processes, including activation of PKC $\gamma$ , last for more than 3 days after CFA injection. Yet, another possibility to account for the lack of effect of KIG31-1, 3 days after CFA injection, is that it cannot inhibit the active form of PKC $\gamma$ . PKC $\gamma$  is known to be translocated from the cytosol to plasma membranes when activated by Ca<sup>2+</sup> and diacylglycerol (Sakai et al., 1997; Oancea et al., 1998). KIG31-1 competes with activated

PKC $\gamma$  for binding to the isoenzyme-specific docking proteins, receptors for activated C kinase (RACK). This strategy prevents PKC $\gamma$  translocation in an isoenzyme specific manner (Mochly-Rosen and Gordon, 1998; Churchill et al., 2009). Thus KIG31-1 can inhibit PKC $\gamma$  before but not after it is translocated. Finally, CFA induces the activation of several signaling cascades, including different PKC isoforms (see above (Igwe and Chronwall, 2001), that might contribute to the transmission of nociceptive messages in sustained inflammatory pain at different delays after CFA injection.

These results suggest that neuropathic and inflammatory mechanical allodynia are transmitted through the same dorsally-directed circuits that involve lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  interneurons. It has to be noted however, that genetic deletion of PKC $\gamma$ , whereas it produces a clear impairment of neuropathic mechanical allodynia (Malmberg et al., 1997; Zhao et al., 2011), has no effect on CFA-induced mechanical allodynia (Zhao et al., 2011). Therefore the role of PKC $\gamma$  might not be exactly the same in the development and maintenance of neuropathic and inflammatory mechanical allodynia.

In conclusion, our results indicate that inflammatory static mechanical allodynia requires the activation of PKC $\gamma$  and is associated with the activation of a dorsally-directed neuronal pathway within superficial MDH. PKC $\gamma$  interneurons are involved in the initiation but not maintenance of static mechanical allodynia in persistent orofacial inflammatory pain.

## References

- Abeliovich A, Paylor R, Chen C, Kim JJ, Wehner JM, Tonegawa S. PKC gamma mutant mice exhibit mild deficits in spatial and contextual learning. *Cell* 75:1263-71, 1993.
- Adwanikar H1, Karim F, Gereau RW 4th. Inflammation persistently enhances nocifensive behaviors mediated by spinal group I mGluRs through sustained ERK activation. *Pain* 111:125-35, 2004.
- Bester H, Beggs S, Woolf CJ. Changes in tactile stimuli-induced behavior and c-Fos expression in the superficial dorsal horn and in parabrachial nuclei after sciatic nerve crush. *J Comp Neurol* 428:45-61, 2000.
- Braz J, Solorzano C, Wang X, Basbaum AI. Transmitting pain and itch messages: a contemporary view of the spinal cord circuits that generate gate control. *Neuron* 82:522-36, 2014.
- Célérier E, Simonnet G, Maldonado R. Prevention of fentanyl-induced delayed pronociceptive effects in mice lacking the protein kinase Cgamma gene. *Neuropharmacology* 46:264-72, 2004.
- Chen L, Wright LR, Chen CH, Oliver SF, Wender PA, Mochly-Rosen D. Molecular transporters for peptides: delivery of a cardioprotective epsilonPKC agonist peptide into cells and intact ischemic heart using a transport system, R(7). *Chem Biol* 8:1123-1129, 2001.
- Cheng HT, Suzuki M, Hegarty DM, Xu Q, Weyerbacher AR, South SM, Inturrisi CE. Inflammatory pain-induced signaling events following a conditional deletion of the N-methyl-D-aspartate receptor in spinal cord dorsal horn. *Neuroscience* 155:948-58, 2008.
- Churchill EN, Qvit N, Mochly-Rosen D. Rationally designed peptide regulators of protein kinase C. *Trends Endocrinol Metab* 20:25-33, 2009.

- Coderre TJ. Contribution of protein kinase C to central sensitization and persistent pain following tissue injury. *Neurosci Lett* 140:181-4, 1992.
- Gao YJ, Ji RR. 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* 115:505-14, 2010.
- Honore P, Rogers SD, Schwei MJ, Salak-Johnson JL, Luger NM, Sabino MC, Clohisy DR, Mantyh PW. Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons. *Neuroscience* 98:585-98, 2000.
- Igwe OJ, Chronwall BM. Hyperalgesia induced by peripheral inflammation is mediated by protein kinase C betaII isozyme in the rat spinal cord. *Neuroscience*. 2001;104:875-90.
- Ji RR, Baba H, Brenner GJ, Woolf CJ. Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nat Neurosci* 2:1114-9, 1999.
- Ji RR, Befort K, Brenner GJ, Woolf CJ. ERK MAP kinase activation in superficial spinal cord neurons induces prodynorphin and NK-1 upregulation and contributes to persistent inflammatory pain hypersensitivity. *J Neurosci* 22:478-85, 2002.
- Ji RR, Gereau RW, Malcangio M, Strichartz GR. MAP kinase and pain. *Brain Res Rev* 60:135-148, 2009.
- Keller F, Beggs S, Salter MW, De Koninck Y. Transformation of the output of spinal lamina I neurons after nerveinjury and microglia stimulation underlying neuropathic pain. *Molecular Pain* 3:27, 2007.
- Krzyzanowska A, Avendaño C. Behavioral testing in rodent models of orofacial neuropathic and inflammatory pain. *Brain Behav* 2:678-97, 2012.
- Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 10:895-926, 2009.



- Li L, Rutlin M, Abaira VE, Cassidy C, Kus L, Gong S, Jankowski MP, Luo W, Heintz N, Koerber HR, Woodbury CJ, Ginty DD. The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons. *Cell* 147:1615-1627, 2011.
- Lu Y, Dong H, Gao Y, Gong Y, Ren Y, Gu N, Zhou S, Xia N, Sun YY, Ji RR, Xiong L. A feed-forward spinal cord glycinergic neural circuit gates mechanical allodynia. *J Clin Invest* 123:4050-4062, 2013.
- Malenka RC, Nicoll RA. Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* 285:1870-4, 1999.
- Malenka RC<sup>1</sup>, Kauer JA, Perkel DJ, Mauk MD, Kelly PT, Nicoll RA, Waxham MN. An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature* 340(6234):554-557, 1989.
- Malinow R<sup>1</sup>, Schulman H, Tsien RW. Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* 245(4920):862-866, 1989.
- Malmberg AB, Chen C, Tonegawa S, Basbaum AI. Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC $\gamma$ . *Science* 278:279-283, 1997.
- Marchand F, D'Mello R, Yip PK, Calvo M, Muller E, Pezet S, Dickenson AH, McMahon SB. Specific involvement of atypical PKC $\zeta$ /PKM $\zeta$  in spinal persistent nociceptive processing following peripheral inflammation in rat. *Mol Pain* 7:86, 2011.
- Martin WJ, Liu H, Wang H, Malmberg AB, Basbaum AI. Inflammation-induced up-regulation of protein kinase C $\gamma$  immunoreactivity in rat spinal cord correlates with enhanced nociceptive processing. *Neuroscience* 88:1267-74, 1999.
- Martin WJ, Malmberg AB, Basbaum AI. PKC $\gamma$  contributes to a subset of the NMDA-dependent spinal circuits that underlie injury-induced persistent pain. *J Neurosci* 21:5321-5327, 2001.

- Miraucourt LS, Dallel R, Voisin DL. Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through PKC $\gamma$  interneurons. *PLoS One* 2:e1116, 2007.
- Miraucourt LS, Moisset X, Dallel R, Voisin DL. Glycine inhibitory dysfunction induces a selectively dynamic, morphine-resistant, and neurokinin 1 receptor- independent mechanical allodynia. *J Neurosci* 29:2519-2527, 2009.
- Mochly-Rosen D, Das K, Grimes KV. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nat Rev Drug Discov* 11:937-57, 2012.
- Mochly-Rosen D, Gordon AS. Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB J* 12:35-42, 1998.
- Neumann S, Braz JM, Skinner K, Llewellyn-Smith IJ, Basbaum AI. Innocuous, not noxious, input activates PKC $\gamma$  interneurons of the spinal dorsal horn via myelinated afferent fibers. *J Neurosci* 28:7936-7944, 2008.
- Oancea E, Teruel MN, Quest AF, Meyer T. Green fluorescent protein (GFP)-tagged cysteine-rich domains from protein kinase C as fluorescent indicators for diacylglycerol signaling in living cells. *J Cell Biol* 140:485-98, 1998.
- Park JS, Voitenko N, Petralia RS, Guan X, Xu JT, Steinberg JP, Takamiya K, Sotnik A, Kopach O, Huganir RL, Tao YX. Persistent inflammation induces GluR2 internalization via NMDA receptor-triggered PKC activation in dorsal horn neurons. *J Neurosci* 29:3206-19, 2009.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press, 1997.
- Peirs C, Patil S, Bouali-Benazzouz R, Artola A, Landry M, Dallel R. Protein kinase C  $\gamma$  interneurons in the rat medullary dorsal horn: distribution and synaptic inputs to these neurons, and subcellular localization of the enzyme. *J Comp Neurol* 522:93-413, 2014.

- Peng YB, Lin Q, Willis WD. Involvement of protein kinase C in responses of rat dorsal horn neurons to mechanical stimuli and periaqueductal gray descending inhibition. *Exp Brain Res* 114:561-7, 1997.
- Pham Dang N, Descheemaeker A, Dallel R, Artola A. Activation of the medullary dorsal horn PKC $\gamma$  interneurons produces static as well as dynamic mechanical hypersensitivity. (Submitted) 2014.
- Ren K. An improved method for assessing mechanical allodynia in the rat. *Physiol. Behav* 67:711-716, 1999.
- Reymann KG, Brödemann R, Kase H, Matthies H. Inhibitors of calmodulin and protein kinase C block different phases of hippocampal long-term potentiation. *Brain Res.*, 461: 388–392, 1988.
- Sakai N1, Sasaki K, Ikegaki N, Shirai Y, Ono Y, Saito N. Direct visualization of the translocation of the gamma-subspecies of protein kinase C in living cells using fusion proteins with green fluorescent protein. *J Cell Biol.* 139(6):1465-1476, 1997.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676-682, 2012.
- Schoffnegger D1, Ruscheweyh R, Sandkühler J. Spread of excitation across modality borders in spinal dorsal horn of neuropathic rats. *Pain* 135:300-10, 2008.
- Seal, RP, Wang X, Guan Y, Raja SN, Woodbury CJ, Basbaum AI, Edwards RH. Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature* 462:651-655, 2009.
- Sossin WS. Isoform specificity of protein kinase Cs in synaptic plasticity. *Learn Mem* 14:236-46, 2007.

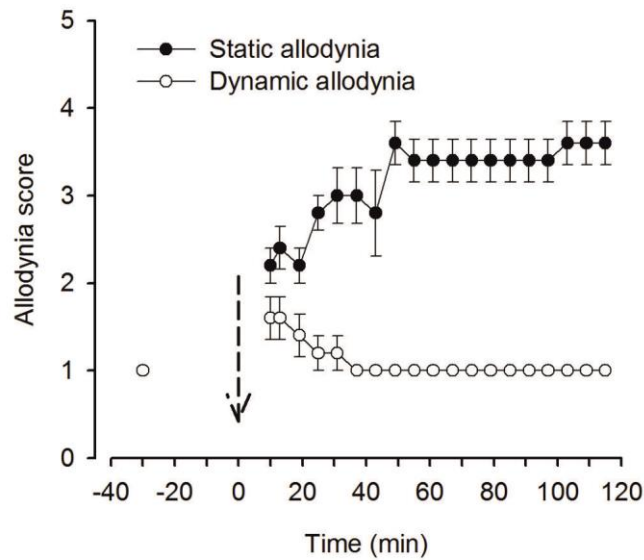
- Sweitzer SM, Wong SM, Peters MC, Mochly-Rosen D, Yeomans DC, Kendig JJ. Protein kinase C epsilon and gamma: involvement in formalin-induced nociception in neonatal rats. *J Pharmacol Exp Ther* 309:616-25, 2004.
- Todd AJ. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci* 11:823-836, 2010.
- Torsney C, MacDermott AB. Disinhibition opens the gate to pathological pain signaling in superficial neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord. *J Neurosci* 26:1833-1843, 2006.
- Vos BP, Strassman AM, Maciewicz RJ. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *J Neurosci* 14:2708-2723, 1994.
- Wajima Z, Hua XY, Yaksh TL. Inhibition of spinal protein kinase C blocks substance P-mediated hyperalgesia. *Brain Res* 877:314-21, 2008.
- Weyerbacher AR, Xu Q, Tamasdan C, Shin SJ, Inturrisi CE. N-Methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) independent maintenance of inflammatory pain. *Pain* 148:237-46, 2010.
- Yang YR, He Y, Zhang Y, Li Y, Li Y, Han Y, Zhu H, Wang Y. Activation of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) in primary sensory and dorsal horn neurons by peripheral inflammation contributes to heat hyperalgesia. *Pain* 127:109-20, 2007.
- Yashpal K, Pitcher GM, Parent A, Quirion R,Coderre TJ. Noxious thermal and chemical stimulation induce increases in 3H-phorbol 12,13-dibutyrate binding in spinal cord dorsal horn as well as persistent pain and hyperalgesia, which is reduced by inhibition of protein kinase C. *J Neurosci* 15:3263-72, 1995.
- Zhang RX, Ren KE. Animal models of inflammatory pain. In: *Neuromethods*, Vol. 49, .2011, p. 23-40.

Zhang X, Zhang H, Shao H, Xue Q, Yu B. ERK MAP kinase activation in spinal cord regulates phosphorylation of Cdk5 at serine 159 and contributes to peripheral inflammation induced pain/hypersensitivity. PLoS One 9:e8778, 2014.

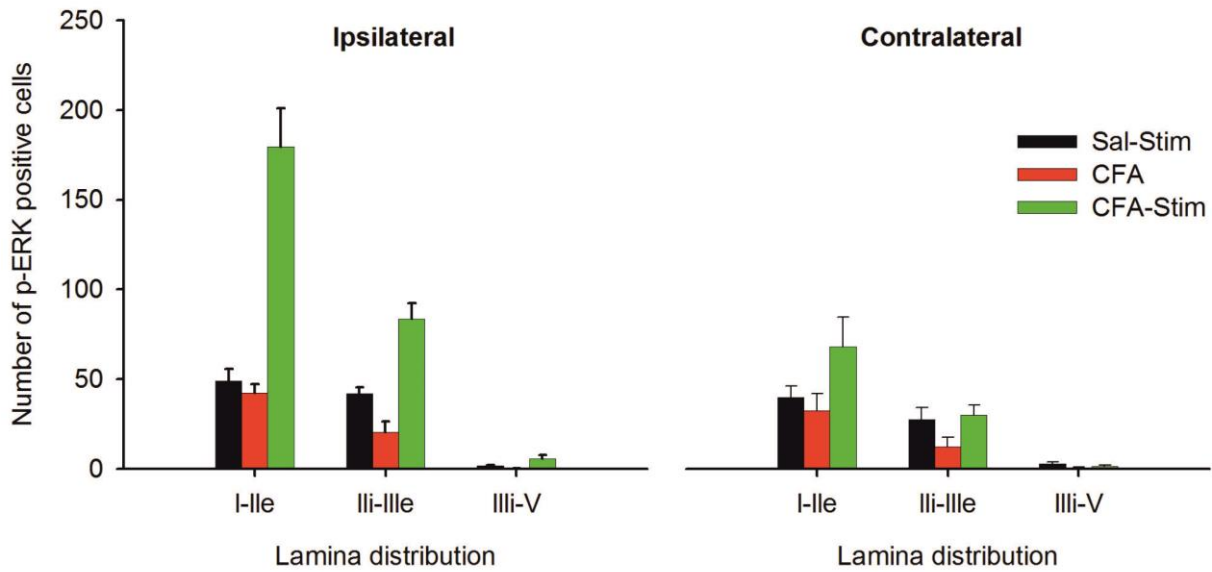
Zhao C, Leitges M, Gereau RW 4th. Isozyme-specific effects of protein kinase C in pain modulation. Anesthesiology. 2011;115:1261-70.

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain 16:109-110, 1983.

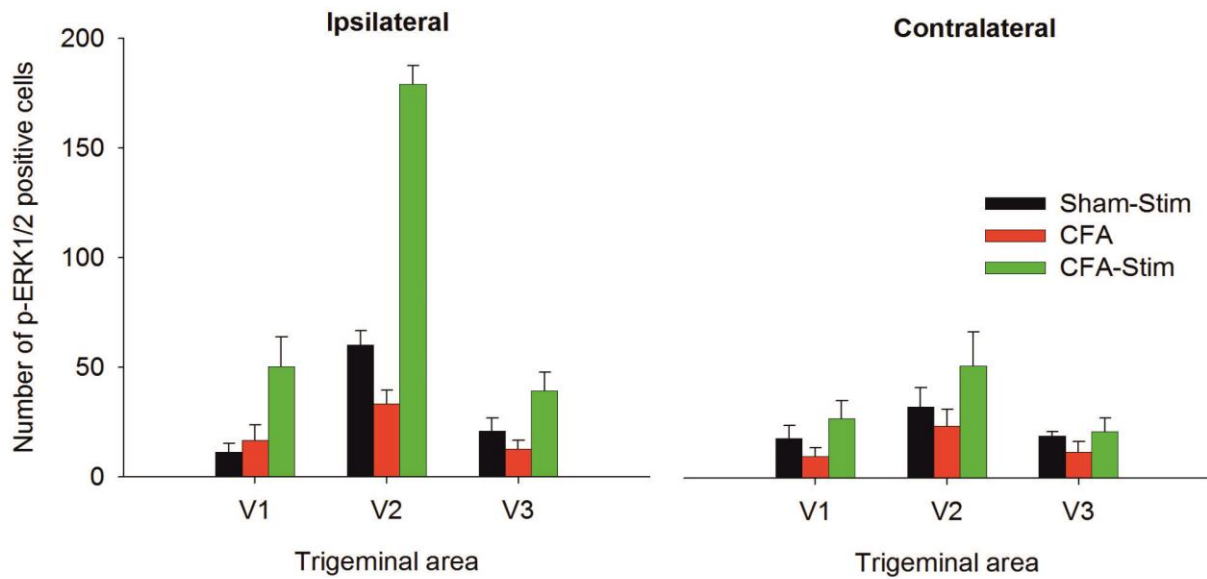
Zou W, Song Z, Guo Q, Liu C, Zhang Z, Zhang Y. Intrathecal lentiviral-mediated RNA interference targeting PKC $\gamma$  attenuates chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. Hum Gene Ther 22:465-475, 2011.



**Figure 1. Subcutaneous injection of CFA induces a static, but not dynamic, mechanical allodynia.** Time courses of changes in behavioral responses (allodynic score) evoked by static (6-g von Frey filament) and dynamic mechanical stimuli (air puff) applied on the vibrissa pad in CFA-treated rats ( $n = 5/\text{group}$ ). CFA induces a static, but not dynamic, mechanical allodynia. Results are presented as mean  $\pm$  SEM. For statistical analysis a Friedman RM ANOVA on ranks with post-hoc Student-Newman-Keuls test were applied; \*  $P = 0,05$ ; \*\*  $P = 0,01$ ; \*\*\*  $P = 0,001$ .

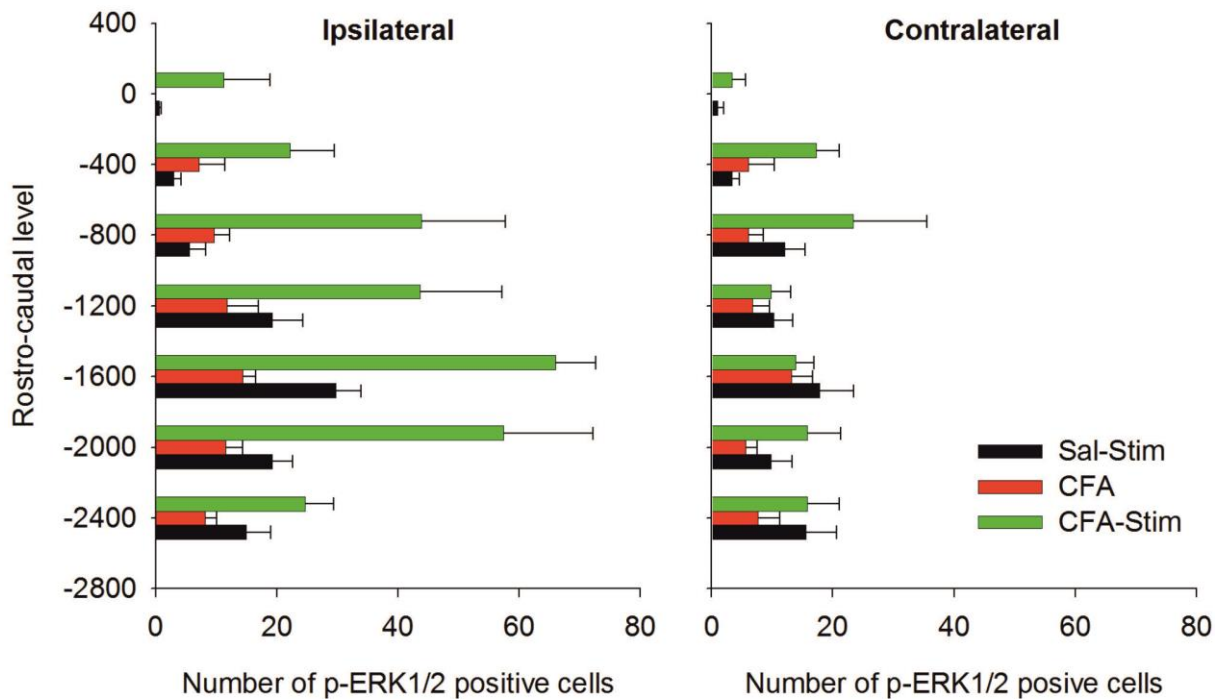


**Figure 2. Facial static mechanical stimulation of CFA-treated rats produces a large increase in neuronal activation within superficial MDH.** Bar histogram of the number of phospho-ERK1/2 immunoreactive cells within laminae I-outer II (II<sub>o</sub>), laminae inner II (II<sub>i</sub>)-outer III (III<sub>o</sub>) and laminae inner-III (III<sub>i</sub>)-V within ipsilateral and contralateral MDH, 2 h after either subcutaneous saline or CFA, with or without static mechanical stimulation (6-g von Frey filament) applied on the vibrissa pad (n = 5/group). Compared with saline and mechanical stimulation or CFA alone, mechanical stimulation leads to a large increase in phospho-ERK1/2 immunoreactive cells in both laminae I-II<sub>o</sub> and II<sub>i</sub>-III<sub>o</sub> when it is applied after CFA injection, and this increase only occurs on the ipsilateral side. Results are presented as mean  $\pm$  SEM. For statistical analysis, a one-way ANOVA and Newman-Keuls post-hoc test were applied; \*  $P = 0,05$ ; \*\*  $P = 0,01$ ; \*\*\*  $P = 0,001$ .

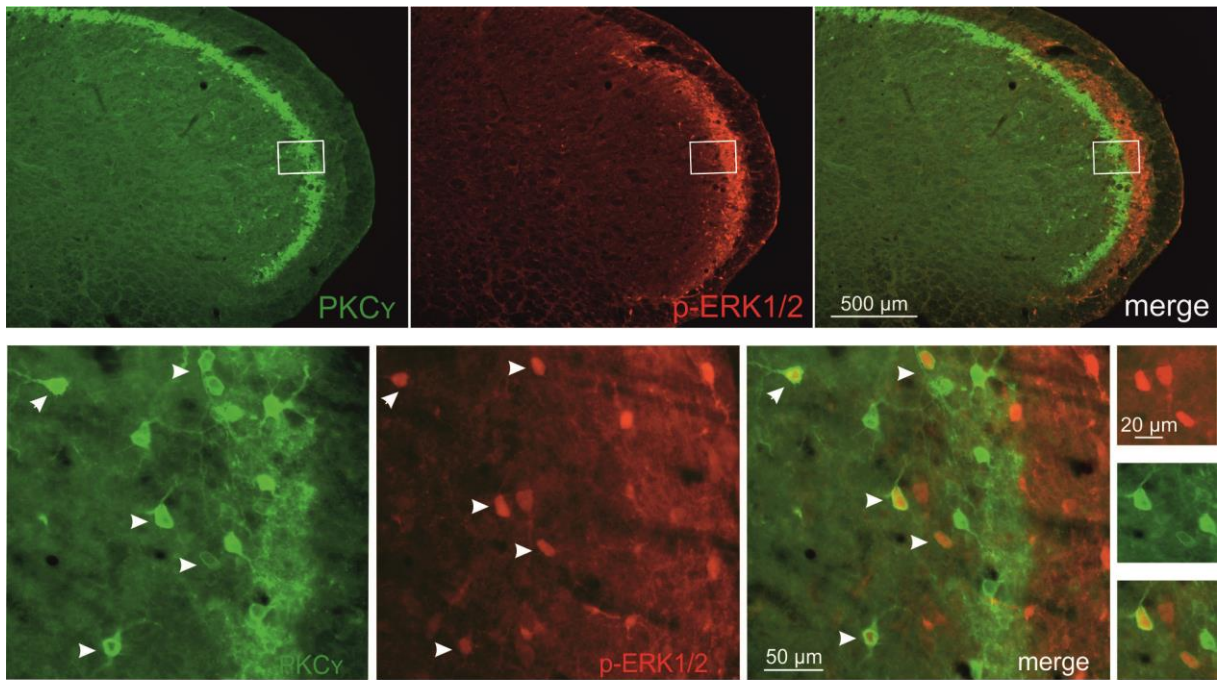


**Figure 3. Neuronal activation within the superficial MDH of CFA-treated rats is restricted to the ipsilateral V2 area, where stimulated afferents terminate.** Bar histogram of the number of phospho-ERK1/2 immunoreactive neurons within the MDH areas where V1, V2 and V3 primary afferents terminate 2 h after either subcutaneous saline or CFA, with or without static mechanical stimulation (6-g von Frey filament) applied on the vibrissa pad (n = 5/group). Note that mechanical stimulation leads to a large increase in phospho-ERK1/2 immunoreactive cells only in CFA-treated rats and within the ipsilateral V2 area, where stimulated afferents terminate. Results are presented as mean  $\pm$  SEM. For statistical analysis, a Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks followed by a Newman-Keuls *post hoc* test were applied; \*  $P = 0,05$ ; \*\*  $P = 0,01$ ; \*\*\*  $P = 0,001$ .

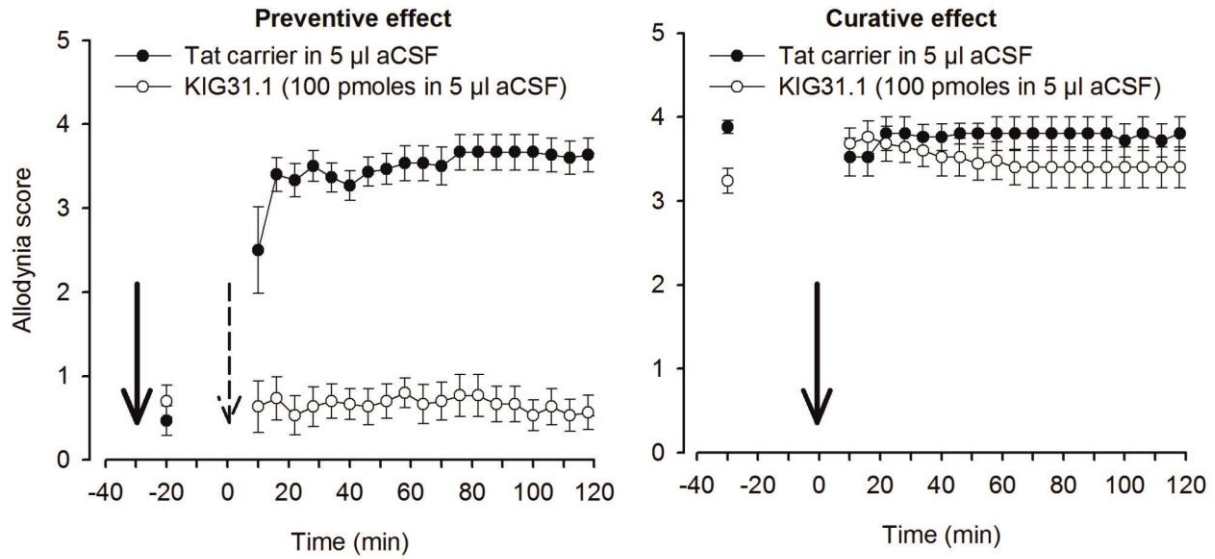




**Figure 4. Rostro-caudal distribution within ipsilateral and contralateral MDH of neuronal activation in stimulated CFA-treated rats.** Bar histogram of the number of phospho-ERK1/2 immunoreactive neurons within levels 0 to -2400 relative to the most caudal tip of the subnucleus interpolaris/MDH transition region 2 h after either subcutaneous vehicle or CFA, with or without static mechanical stimulation (6-g von Frey filament) applied on the vibrissa pad (n = 5/group). Note that mechanical stimulation leads to a large increase in phospho-ERK1/2 immunoreactive cells only in CFA-treated rats and within levels -800 to -2000 where stimulated afferents terminate. Results are presented as mean  $\pm$  SEM. For statistical analysis, a Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks followed by a Newman-Keuls *post hoc* test were applied; \*  $P = 0,05$ ; \*\*  $P = 0,01$ ; \*\*\*  $P = 0,001$ .



**Figure 5: PKC  $\gamma$ -immunoreactive interneurons in lamina II<sub>i</sub> are activated by static mechanical stimuli in CFA-treated rats.** Top: Fluorescence images of phospho-ERK1/2-immunoreactivity (red), PKC  $\gamma$ -immunoreactivity (green), and merge of the whole MDH (frontal plane) in rats after subcutaneous CFA and static mechanical stimuli (6 g von Frey filament) applied on the vibrissa pad. Bottom: Phospho-ERK1/2-immunoreactive cells (red), PKC $\gamma$ -immunoreactive interneurons (green) and double labeled neurons (white arrows) within lamina II<sub>i</sub> of the MDH. Bottom right: Insets showing double labeled neurons.



**Figure 6: The PKC $\gamma$  antagonist, KIG31-1, suppresses CFA-induced static mechanical allodynia when injected before but not after CFA.** Time courses of changes in behavioral responses (allodynic score) evoked by static (6-g von Frey filament) applied on the vibrissa pad. Left: Rats received an intracisternal injection of Tat-carrier (100 pmole) or KIG31-1 (100 pmole) 30 min before a subcutaneous one of CFA. Right: Rats received an intracisternal injection of Tat-carrier (100 pmole) or KIG31-1 (100 pmole) 3 days after they had been treated with a subcutaneous injection of CFA on the vibrissa pad (n = 5-6/group). Results are presented as mean  $\pm$  SEM. For statistical analysis, a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post hoc test were applied; \*  $P = 0,05$ ; \*\*  $P = 0,01$ ; \*\*\*  $P = 0,001$ .

**CHAPITRE IV:**  
**DISCUSSION GENERALE**  
**ET**  
**CONCLUSION**

## DISCUSSION ET CONCLUSION

### 1. DISCUSSION

Ces resultats montrent que :

- **L'ACTIVATION DE LA PKC $\gamma$  DANS LE SOUS-NOYAU CAUDAL EST SUFFISANTE POUR LE DEVELOPPEMENT D'UNE ALLODYNIE MECANIQUE DE LA FACE.**

En effet :

- l'injection intracisternale de PDBu induit simultanément une allodynie mécanique statique et dynamique de la face ;
- l'immunoréactivité phospho-ERK1/2 révèle que l'expression de cette allodynie mécanique, qu'elle soit statique ou dynamique, s'accompagne de la même activation d'interneurones des couches I-II<sub>e</sub> et II<sub>i</sub>-III<sub>e</sub>, dont des interneurones PKC $\gamma$  de la couche II<sub>i</sub> ;
- Ces deux effets, comportemental et anatomique, de l'application de PDBu sont bien dus à l'activation sélective de la PKC $\gamma$  car ils sont bloqués par l'application simultanée de KIG31-1.

Ces résultats révèlent que l'activation isolée de la PKC $\gamma$  dans le sous-noyau caudal est suffisante pour provoquer l'apparition d'une allodynie mécanique, à la fois statique et dynamique, en l'absence donc de toutes autres manipulations expérimentales : désinhibition synaptique dans le sous-noyau caudal, lésion nerveuse ou inflammatoire périphérique.

- **L'ACTIVATION DE LA PKC $\gamma$  EST NECESSAIRE AU DEVELOPPEMENT D'UNE ALLODYNIE MECANIQUE D'ORIGINE INFLAMMATOIRE.**

En effet :

- l'injection sous-cutanée de CFA au niveau de la zone d'insertion des vibrisses induit une allodynie persistante spécifiquement statique ;
- l'expression de cette allodynie mécanique statique s'accompagne de la même activation d'interneurones des couches I-II<sub>e</sub> et II<sub>i</sub>-III<sub>e</sub>, dont des interneurones PKC $\gamma$  de la couche II<sub>i</sub> que ci-dessus.

- le développement de cette allodynie statique est bien due à l'activation de la PKC $\gamma$  car elle est prévenue par l'application intracisternale de KIG31-1, avant l'injection de CFA .
- Cependant, cette même application intracisternale de KIG31-1, 3 jours après l'injection de CFA, n'a aucun effet sur l'allodynie mécanique une fois établie.

Ces résultats révèlent que l'allodynie persistante à la suite d'une inflammation provoquée par l'injection sous-cutanée de CFA est spécifiquement statique. Le développement de cette allodynie est dû à des mécanismes centraux impliquant la PKC $\gamma$ . Par contre, son maintien semble être indépendant de cette enzyme.

### 1.1. LA PKC $\gamma$ EST IMPLIQUEE DANS LE DEVELOPPEMENT DE L'ALLODYNIE MECANIQUE STATIQUE INFLAMMATOIRE

Le CFA est un modèle de douleur inflammatoire persistante très utilisé pour l'évaluation de l'action pharmacologique des médicaments antalgiques (voir les revues de Zhang et Ren, 2011; Krzyzanowska et Avendaño, 2012). L'injection sous-cutanée de CFA a des effets bien connus, hyperalgésie thermique et allodynie mécanique, qui durent au moins 2 semaines. Cependant on ne connaissait pas jusqu'à maintenant le type de l'allodynie mécanique. En effet, seule la sensibilité mécanique aux filaments de von Frey était testée (voir par exemple : Zhang and Ren, 2011; Krzyzanowska and Avendaño, 2012). Ici, en utilisant des stimuli mécaniques à la fois dynamiques (courant d'air ou léger frottement avec un pinceau) et statiques (von Frey filaments), nous démontrons que l'allodynie mécanique produite par l'injection sous-cutanée de CFA est spécifiquement statique.

L'application intracisternale de KIG31-1, 30 min avant l'injection de CFA, prévient l'allodynie mécanique statique. Or les résultats déjà obtenus sur le rôle de la PKC $\gamma$  dans l'allodynie mécanique induite par une injection de CFA sont plutôt controversés. D'une part, l'analyse par Western blot de la PKC $\gamma$  phosphorylée (phospho-PKC $\gamma$ ), la forme active de la PKC $\gamma$  (voir revue de Sossin, 2007), indique qu'une injection de CFA dans la patte postérieure produit une augmentation rapide (10 min après injection) et persistante (pendant au moins 3 jours) de phospho-PKC $\gamma$  dans la corne dorsale de la moelle lombaire chez la souris (Honore et al., 2000; Cheng et al., 2008; Weyerbacher et al., 2010) mais pas chez le rat (Igwe and Chronwall, 2001). Pourtant, chez ce même rat, on retrouve une augmentation importante de l'immunomarquage PKC $\gamma$  dans la corne dorsale de la moelle lombaire après inflammation par le CFA (Martin et al., 1999). D'autre part, l'inactivation génétique de la PKC $\gamma$  chez la souris

ne modifie pas l'allodynie mécanique induite par le CFA (Zhao et al., 2011). Nos résultats indiquent clairement que l'activation de la PKC $\gamma$  est nécessaire pour le développement de l'allodynie mécanique statique après injection de CFA chez le rat. Bien que les résultats obtenus précédemment chez le rat soient controversés, il est possible que l'inflammation périphérique à la suite de l'injection de CFA provoque une augmentation de l'activation de la PKC $\gamma$ , une telle activation pouvant par elle-même conduire au développement d'une allodynie mécanique (voir plus loin). Notons cependant que les effets de l'inactivation génétique de la PKC $\gamma$  sont différents chez les rats neuropathiques et chez les rats CFA : elle inhibe l'allodynie mécanique chez les premiers (Malmberg et al., 1997; Zhao et al., 2011) mais pas chez les seconds (Zhao et al., 2011). Cela suggère que le rôle de la PKC $\gamma$  dans le développement des allodynies mécaniques, neuropathique et inflammatoire, n'est pas exactement le même. Des mécanismes de compensation au cours du développement pourrait expliquer l'inefficacité de l'inactivation génétique de la PKC $\gamma$  sur l'allodynie mécanique inflammatoire. Par exemple, d'autres isoformes de la PKC, comme la PKC $\beta$ II (Igwe et Chronwall, 2001), peuvent contribuer à la transmission des messages douloureux dans les états de douleur inflammatoire.

*Ces résultats suggèrent que l'activation de la PKC $\gamma$  dans la corne dorsale de la moelle/sous-noyau caudal est impliquée dans l'expression de l'allodynie mécanique à la suite d'une inflammation périphérique comme après une lésion nerveuse (Malmberg et al., 1997; Zhao et al., 2011; Zou et al., 2011). Ils indiquent aussi que les mécanismes responsables de cette allodynie sont centraux.*

## 1.2. DES CIRCUITS IDENTIQUES DANS LE SOUS-NOYAU CAUDAL SONT ASSOCIES AUX ALLODYNIES MECANIQUES, STATIQUE OU DYNAMIQUE.

Dans cette étude, nous avons utilisé la phosphorylation de la protéine ERK1/2 pour révéler les circuits neuronaux dans le sous-noyau caudal associés à l'expression de l'allodynie mécanique. Quelque soit le type d'allodynie mécanique, statique ou dynamique (après injection intracisternale de PDBu), ou sa cause (allodynie mécanique statique provoquée par l'injection intracisternale de PDBu ou sous-cutanée de CFA), la stimulation cutanée (filament de von Frey ou frottement avec un pinceau, en fonction du type d'allodynie) provoque toujours la même apparition de phospho-ERK1/2 dans des interneurons des couches I-II<sub>c</sub> et II<sub>i</sub>-III<sub>c</sub>, dont des interneurons exprimant la PKC $\gamma$  dans la couche II<sub>i</sub>. Cette organisation de

l'activité neuronale est tout à fait similaire à celle décrite pour l'allodynie mécanique dynamique observée à la suite d'une injection intracisternale de strychnine, l'antagoniste des récepteurs glycinergique (Miraucourt et al., 2007; 2009). Il est maintenant bien établi qu'il existe de voies excitatrices polysynaptiques, intrinsèques à la corne dorsale de la moelle/sous-noyau caudal qui permettent aux informations véhiculées par les afférences tactiles (ou LTMR) d'accéder aux neurones de la couche I et donc aux voies de transmission de la douleur vers le cerveau. On a ainsi montré que l'activation des fibres LTMRs peut exciter des neurones nociceptifs de la couche I (i) chez des rats neuropathiques exprimant une allodynie mécanique statique (Keller et al., 2007), (ii) chez des rats exprimant une allodynie mécanique dynamique à la suite de la désinhibition glycinergique du sous-noyau caudal (Miraucourt et al., 2007), et (iii) dans des tranches de corne dorsale de la moelle après une désinhibition à la fois glycinergique et GABA<sub>A</sub>ergique (Torsney and MacDermott, 2006). Ces circuits locaux, dirigés vers la superficie débutent vraisemblablement avec les interneurons PKC $\gamma$  de la couche II<sub>i</sub> sur lesquels des afférences myélinisées de type A, dont des afférences A $\beta$  font synapse (Neumann et al., 2008; Lu et al., 2013; Peirs et al., 2014). L'ensemble de ces résultats suggèrent que les LTMRs convoyant la sensibilité mécanique à la pression (allodynie mécanique statique) ou au frottement (de type A $\beta$  ; allodynie mécanique dynamique) activent directement les interneurons PKC $\gamma$  de la couche II<sub>i</sub>, ces interneurons activant les neurones nociceptifs de la couche I par l'intermédiaire d'interneurones de la couche II<sub>e</sub>. Un tel circuit a récemment été mis en évidence pour les afférences A $\beta$  (Lu et al., 2013).

*Nos résultats suggèrent que les mêmes circuits polysynaptiques, intrinsèques à la corne dorsale de la moelle/sous-noyau caudal, depuis les interneurons PKC $\gamma$  de la couche II<sub>i</sub> jusqu'aux neurones de la couche I, sont associés avec l'expression d'une allodynie mécanique, quelque soit son type, statique ou dynamique, et sa cause.*

### 1.3. L'ACTIVATION DE LA PKC $\gamma$ DANS LE SOUS-NOYAU CAUDAL EST SUFFISANTE POUR LE DEVELOPPEMENT D'UNE ALLODYNIE MECANIQUE DE LA FACE.

Il est maintenant bien établi que l'activation de la PKC, c'est-à-dire de l'ensemble de ses isoformes, dans la corne dorsale de la moelle induit une hypersensibilité douloureuse. L'application locale (intrathécale) de phorbol ester provoque à la fois une allodynie et une hyperalgésie à la pression mécanique appliquée à l'aide de filament de von Frey (Palecek et al., 1999; Sluka and Audette, 2006) et une hyperalgésie au chaud (Kamei and Zushida, 2001;



Niikura et al., 2008). Cette hypersensibilité mécanique et thermique est associée à une augmentation de l'activité de fond des neurones nociceptifs et de leurs réponses aux stimuli cutanés mécaniques (Palecek et al., 1994; Lin et al., 1996a; Peng et al., 1997). Notons ici que seules les réponses à des stimulations mécaniques non-douloureuses, c'est-à-dire le frottement et la pression mais pas le pincement, sont augmentées (Palecek et al., 1994; Lin et al., 1996a; Peng et al., 1997). Enfin, les phorbol esters facilitent la transmission synaptique excitatrice dans la corne dorsale de la moelle, en particulier au niveau de la première synapse sensorielle (Gerber et al., 1989; Palecek et al., 1999; Sikand and Premkumar, 2007; Yang et al., 2013) et, simultanément, réduisent la transmission synaptique inhibitrice (Lin et al., 1996a; Peng et al., 1997). Il faut cependant noter que les phorbol esters réduisent les réponses postsynaptiques aux deux neurotransmetteurs inhibiteurs, glycine et GABA (Lin et al., 1996b), tout en facilitant en même temps la libération presynaptique de GABA (Vergnano et al., 2007). L'ensemble de ces résultats indique clairement que l'activation de la PKC dans la corne dorsale de la moelle conduit au développement d'une sensibilisation centrale et une hypersensibilité douloureuse. Cependant, cette activation n'est pas spécifique de l'isoforme  $\gamma$  de la PKC (pour revue voir Mochly-Rosen, 2012). Il est donc impossible d'attribuer un effet donné à une isoforme de la PKC. En combinant les applications intracisternales de PDBu et de l'antagoniste sélectif de la PKC $\gamma$ , KIG31-1, notre approche contourne cet obstacle : tous les effets déclenchés par le PDBu mais prévenus par le KIG31-1 sont vraisemblablement dus à l'activation sélective de l'isoforme  $\gamma$  de la PKC $\gamma$  dans le sous-noyau caudal, isoforme spécifiquement contenues dans cette population de neurone de la couche II<sub>i</sub> (Polgar et al. 1999; Peirs et al., 2014).

*Nos résultats suggèrent que l'activation de la PKC $\gamma$  au niveau de la corne dorsale de la moelle/sous-noyau caudal est suffisante pour que se développe une allodynie mécanique. Cette allodynie est à la fois statique et dynamique, suggérant que, non seulement les circuits responsables de ces deux allodynies (voir ci-dessus), mais aussi l'ensemble des mécanismes mis en jeu sont identiques.*

#### 1.4. LES ALLODYNIES MECANIQUES, STATIQUE ET DYNAMIQUE : DES MECANISMES IDENTIQUES ?

La conclusion ci-dessus est surprenante. En effet, on sait que chaque allodynie peut se manifester seule chez un patient (Ochoa and Yarnitsky, 1993) ou se développer indépendamment l'une de l'autre dans des modèles animaux de douleur (Field et al., 1999a;

Sasaki et al., 1993). De plus, les voies des allodynies mécaniques, statique et dynamique, ne sont pas totalement identiques. D'une part, elles sont sous des contrôles inhibiteurs différents: une désinhibition GABA<sub>A</sub>ergique induit une allodynie mécanique sélectivement statique (Roberts et al., 1986; Miraucourt et al., 2009) alors qu'une désinhibition glycinergique produit une allodynie dynamique (Miraucourt et al., 2007; 2009). D'autre part, l'allodynie statique est sélectivement sensible à la morphine (Field et al., 1999a,b; Gonzalez et al., 2000; Catheline et al., 2001; Miraucourt et al., 2009) et l'amitriptyline (Field et al., 1999b), alors que l'allodynie dynamique l'est à l'amimexiletine and ketamine hydrochloride (Sasaki et al., 2008).

Cependant, on sait aussi que les deux allodynies mécaniques sont signalées par des afférences primaires différentes: l'allodynie statique par des afférences A $\delta$  (Treede and Cole, 1993; Ochoa and Yarnitsky, 1993; Field et al., 1999; Seal et al., 2009) et l'allodynie dynamique par des afférences A $\beta$  (Campbell et al., 1988). Il est donc possible que les voies des deux allodynies mécaniques soient différentes jusqu'à la première synapse sur les interneurones PKC $\gamma$  de la couche II<sub>i</sub> mais communes de ces interneurones jusqu'aux neurones nociceptifs de projection de la couche I. La modulation différente des allodynies mécaniques, statique et dynamique, pourrait être simplement due aux propriétés différentes des afférences A $\beta$ - or A $\delta$ -LTMRs et de leurs synapses sur les interneurones PKC $\gamma$ . Par exemple, on sait déjà que les inputs excitateurs A $\beta$  sur les interneurones PKC $\gamma$  sont contrôlés sélectivement par un circuit 'feed-forward' inhibiteur glycinergique (Lu et al., 2013).

*Ces résultats suggèrent qu'une fois la PKC $\gamma$  activée, n'importe quel input LTMR sur les interneurones PKC $\gamma$  de la couche II<sub>i</sub> peut activer les neurones nociceptifs de la couche I par l'intermédiaire d'un circuit polysynaptique et déclencher une douleur. Que l'activation de la PKC $\gamma$  soit suffisante pour que se manifeste une allodynie mécanique confirme que les interneurones PKC $\gamma$  de la couche II<sub>i</sub> jouent un rôle clé, de 'gate control', dans les circuits de la corne dorsale de la moelle/sous-noyau caudal mis en jeu lors de l'allodynie mécanique, statique aussi bien que dynamique.*

#### 1.5. QUEL ROLE POUR LA PKC $\gamma$ DANS L'ALLODYNIE MECANIQUE INFLAMMATOIRE ?

L'application de l'antagoniste PKC $\gamma$  prévient le développement de l'allodynie mécanique statique après injection de CFA mais ne la supprime pas une fois installée. La PKC $\gamma$  pourrait donc être impliquée dans l'induction mais non dans le maintien des changements neuronaux, ou plasticité, dans le sous-noyau caudal associés avec l'allodynie

mécanique. Une activation des afférences nociceptives, une inflammation, une lésion nerveuse produit une potentialisation des fonctions des neurones et des circuits des voies de la nociception par le biais d'une augmentation de l'excitabilité membranaire et de l'efficacité synaptique ; cette plasticité des voies de la nociception, contribuant à l'installation d'états douloureux persistants, est appelée sensibilisation centrale (voir revue dans Latremoliere and Woolf, 2009). Il est bien connu que l'inhibition de la PKC postsynaptique bloque l'induction de la LTP dans l'hippocampe (Reymann et al., 1988 ; Malenka et al., 1989; Malinow et al., 1989). Cependant, la PKC $\gamma$  ne semble pas faire partie des mécanismes moléculaires responsables de la potentialisation elle-même mais semble plutôt réguler son induction (Abeliovich et al., 1993; voir revue dans Malenka and Nicoll, 1999). Cette fonction régulatrice expliquerait pourquoi un antagoniste PKC $\gamma$ , appliqué avant l'injection de CFA, prévient le développement d'une allodynie mécanique mais ne peut pas la supprimer une fois établie, lorsqu'il est injecté 3 jours après.

Cependant, il n'est pas sûr qu'il n'y ait plus de plasticité dans le sous-noyau caudal 3 jours après l'injection sous-cutanée de CFA. ERK1/2 joue un rôle clé dans la régulation de la plasticité neuronale et de la sensibilisation douloureuse (voir revue dans Ji et al., 2009). Et l'activation de la PKC $\gamma$  comme celle de ERK1/2 dans la corne dorsale de la moelle dépendent bien des récepteurs NMDA (Ji et al., 1999; Cheng et al., 2008; Park et al., 2009; Weyerbacher et al., 2010). Or après une injection de CFA dans la patte arrière de rat, l'expression de phospho-ERK1/2 dans la corne dorsale de la moelle peut n'être que transitoire (avec un retour au niveau basal en 2 jours : Ji et al., 2002; Gao and Ji, 2010), comme être beaucoup plus longue (4-7 jours: Adwanikar et al., 2004; Yang et al., 2007; Weyerbacher et al., 2010; Zhang et al., 2014). Cela signifie que les processus de plasticité neuronal et synaptique déclenchés par l'injection de CFA, incluant l'activation de la PKC $\gamma$ , peuvent durer beaucoup plus longtemps que 3 jours après l'injection de CFA. Une autre possibilité donc pour expliquer l'absence d'effet du KIG31-1, 3 jours après l'injection de CFA, est que cette antagoniste ne peut pas inhiber la forme active de PKC $\gamma$ . Lorsqu'elle est activée par le Ca<sup>2+</sup> et le diacylglycerol, la PKC $\gamma$  migre du cytosol vers la membrane plasmique (Sakai et al., 1997; Oancea et al., 1998). Or le KIG31-1 inhibe la PKC $\gamma$  en entrant en compétition avec la PKC $\gamma$  active pour son site de fixation membranaire sur les 'docking' protéines spécifiques, ('receptors for activated C kinase' ou RACK) (Mochly-Rosen et Gordon, 1998; Churchill et al., 2009). Le KIG31-1 ne peut donc plus inhiber la PKC $\gamma$  une fois qu'elle est activée et a migré sur la membrane.

Enfin, CFA active plusieurs cascades métaboliques, dont plusieurs isoformes de la PKC (Igwe and Chronwall, 2001), qui pourraient contribuer aux phénomènes de plasticité à différents délais après l'injection de CFA.

*Nos résultats suggèrent que la PKC $\gamma$  dans les interneurons PKC $\gamma$  de la couche II<sub>i</sub> de la corne dorsale de la moelle/sous-noyau caudal est impliquée dans l'induction mais pas dans le maintien de l'allodynie mécanique statique, tout au moins dans ce modèle d'allodynie mécanique inflammatoire persistante.*

## 2. IMPLICATIONS CLINIQUES

La traumatologie occupe une part importante de l'activité du chirurgien maxillo-facial. A l'examen clinique, les troubles de la sensibilité dans le territoire du nerf trijumeau font partie des signes cliniques à rechercher. Nous savons de façon empirique qu'elle est fréquente. Cependant nous ne connaissons pas l'évolution de ce déficit.

Dans la littérature, il existe peu d'information sur la prévalence de la douleur neuropathique post-traumatique et sur ses caractéristiques phénotypiques (Jaaskelainen et al., 2005). Benoliel *et al.* (2005) rapporte 1 cas après fracture de la mandibule et Jaaskelainen *et al.* (2005) 13% de douleurs chroniques après chirurgie orthognatique. Pourtant, en considérant le nombre d'actes réalisés par les dentistes, l'incidence des douleurs chroniques dans le territoire du nerf trijumeau est soit étonnamment bas ou largement sous-estimé. Néanmoins, un certain nombre de patients développent des douleurs chroniques pour des lésions minimales du nerf trijumeau, comme le traitement endocanalair (Polycarpou et al., 2005), la pose d'implants (Rodriguez-Lozano et al., 2010) ou après des traumatismes sévères comme les fractures du massif facial (Benoliel et al., 2005). L'hypo- ou l'anesthésie sont des symptômes fréquents et bien définis dans le territoire du nerf trijumeau. Après la pose d'implants, le déficit sensitif est évalué entre 1-8% (Gregg et al., 2000; Walton et al., 2000) et après la chirurgie orthognatique, il concerne 5 à 70% des patients (Cheung et al., 2002). Par contre l'incidence des douleurs chroniques n'est pas claire : elle semble souvent groupée avec l'hypo- et l'anesthésie sous le terme de troubles sensitifs, elle semble néanmoins varier entre 3 et 5% (Benoliel et al., 2005; Jaaskelainen et al., 2005).

Afin de répondre à ces différentes questions, nous avons cherché à définir la prévalence et les facteurs de risques de développer des troubles sensitifs, aussi bien de type déficitaire (hypoesthésie et anesthésie) que positifs (allodynie, hyperalgésie, ...). Ces résultats ont été rapportés dans le travail de thèse pour le diplôme de Doctorat en Médecine dont le titre est:

“les séquelles sensitives en traumatologie maxillo-faciale : prévalence et facteurs de risques étude rétrospective sur 401 dossiers”. Nous avons ainsi constaté qu’entre 1998 et 2008, 401 patients ont été pris en charge dans le service de chirurgie Maxillo-Faciale et Stomatologie, Chirurgie plastique de la Face du CHU de Clermont-Ferrand, pour fractures de la mandibule et/ou de la région orbito-maxillo-zygomatique. Sur l’ensemble des patients traumatisés, 174 (43%) avaient une hypoesthésie post-traumatique immédiate, 106 d’entre eux ont gardé ce déficit sensitif au-delà de 6 mois de suivi, parmi eux 19 patients avaient en plus développé des douleurs avec allodynie mécanique.

### 3. CONCLUSION

Nos résultats indiquent que l’activation de la PKC $\gamma$  dans les interneurons de la couche II<sub>i</sub> de la corne dorsale de la moelle/sous-noyau caudal est impliquée dans le développement de l’allodynie mécanique après une lésion inflammatoire périphérique comme après une lésion nerveuse. Cette activation est suffisante pour que se développent les deux types d’allodynie mécanique, statique et dynamique. Ces interneurons PKC $\gamma$  de la couche II<sub>i</sub> joueraient le rôle de ‘gate control’ pour un circuit polysynaptique excitateur, intrinsèque à la corne dorsale de la moelle/sous-noyau caudal, permettant aux informations véhiculées par les afférences tactiles d’accéder aux neurones de la couche I et donc aux voies de transmission de la douleur vers le cerveau. Cette activation de la PKC $\gamma$  faciliterait l’induction de cette plasticité dans la corne dorsale de la moelle/sous-noyau caudal et le développement de l’allodynie.

Le traitement de l’allodynie mécanique reste très difficile. Et ce symptôme douloureux reste donc très invalidant pour les patients. Nos résultats suggèrent qu’un antagoniste PKC $\gamma$  pourrait être un bon médicament de l’allodynie mécanique. Cependant, le caractère ubiquitaire de cette enzyme rend l’administration systémique d’un anti PKC $\gamma$  problématique. Une solution serait de pouvoir inhiber sélectivement ces neurones PKC $\gamma$  de la corne dorsale de la moelle/sous-noyau caudal. Cela justifie la recherche sur ces cellules notamment dans notre laboratoire.

Une autre voie thérapeutique est d’identifier les facteurs de risque de cette allodynie mécanique pour éviter que les patients ne la développent.

## REFERENCES

- Abdallah K, Artola A, Monconduit L, Dallel R, Luccarini P. Bilateral descending hypothalamic projections to the spinal trigeminal nucleus caudalis in rats. *PloS One*. 2013;8(8):e73022.
- Abeliovich A, Chen C, Goda Y, Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S. Modified hippocampal long-term potentiation in PKC gamma-mutant mice. *Cell*. 31 déc 1993;75(7):1253-62.
- Adwanikar H1, Karim F, Gereau RW 4th. Inflammation persistently enhances nocifensive behaviors mediated by spinal group I mGluRs through sustained ERK activation. *Pain* 111:125-35, 2004.
- Akinori M. Subspecies of protein kinase C in the rat spinal cord. *Prog Neurobiol*. avr 1998;54(5):499-530.
- Andrew D, Krout KE, Craig AD (Bud). Differentiation of lamina I spinomedullary and spinothalamic neurons in the cat. *J Comp Neurol*. 2003;458(3):257-71.
- Arnadóttir J, O'Hagan R, Chen Y, Goodman MB, Chalfie M. The DEG/ENaC protein MEC-10 regulates the transduction channel complex in *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 31 août 2011;31(35):12695-704.
- Attal N, Perrot S, Fermanian J, Bouhassira D. The neuropathic components of chronic low back pain: a prospective multicenter study using the DN4 Questionnaire. *J Pain Off J Am Pain Soc*. oct 2011;12(10):1080-7.
- Baba H, Doubell TP, Woolf CJ. Peripheral inflammation facilitates Abeta fiber-mediated synaptic input to the substantia gelatinosa of the adult rat spinal cord. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 15 janv 1999;19(2):859-67.
- Baron R, Binder A, Wasner G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurol*. août 2010;9(8):807-19.
- Basbaum A, Jessell T. The perception of pain. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, editors. *Principles of Neural Science*. 4th ed. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division; 2000
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 16 oct 2009;139(2):267-84.
- Basbaum AI, Bráz JM. Chapter 7, Transgenic Mouse Models for the Tracing of « Pain » Pathways. In: Kruger L, Light AR, éditeurs. *Translational Pain Research: From Mouse to Man*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2010
- Benn SC, Woolf CJ. Adult neuron survival strategies--slamming on the brakes. *Nat Rev Neurosci*. sept 2004;5(9):686-700.
- Benoliel R, Birenboim R, Regev E, Eliav E. Neurosensory changes in the infraorbital nerve following zygomatic fractures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. juin 2005;99(6):657-65.
- Bereiter DA, Cioffi JL, Bereiter DF, Zardeneta G, Milam SB. Local blockade of integrins in the temporomandibular joint region reduces Fos-positive neurons in trigeminal subnucleus caudalis of female rats produced by jaw movement. *Pain*. nov 2006;125(1-2):65-73.
- Bereiter DA, Hargreaves KM, Hu JW. Trigeminal mechanisms of nociception: peripheral and brainstem organisation. In: Bushnell M.C., ed. *The senses, a comprehensive reference*. San Diego (CA): Academic Press; 2008:435-460.
- Bester H, Beggs S, Woolf CJ. Changes in tactile stimuli-induced behavior and c-Fos expression in the superficial dorsal horn and in parabrachial nuclei after sciatic nerve crush. *J Comp Neurol*. 4 déc 2000;428(1):45-61.

- Bianchi L. Mechanotransduction: touch and feel at the molecular level as modeled in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Neurobiol*. déc 2007;36(3):254-71.
- Bliss TV1, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 1993 Jan 7;361(6407):31-9.
- Bouhassira D, Attal N. Douleurs Neuropathiques. Edition Arnette Groupe Liaison S.A. 2007.
- Bowles WR, Withrow JC, Lepinski AM, Hargreaves KM. Tissue levels of immunoreactive substance P are increased in patients with irreversible pulpitis. *J Endod*. avr 2003;29(4):265-7.
- Boyer N, Dallel R, Artola A, Monconduit L. General trigeminospinal central sensitization and impaired descending pain inhibitory controls contribute to migraine progression. *Pain*. 12 mars 2014.
- Brännström M. Sensitivity of dentine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. avr 1966;21(4):517-26.
- Braz J, Solorzano C, Wang X, Basbaum AI. Transmitting pain and itch messages: a contemporary view of the spinal cord circuits that generate gate control. *Neuron* 82:522-36, 2014.
- Byers MR, Närhi MV. Dental injury models: experimental tools for understanding neuroinflammatory interactions and polymodal nociceptor functions. *Crit Rev Oral Biol Med Off Publ Am Assoc Oral Biol*. 1999;10(1):4-39.
- Campbell JN, Raja SN, Meyer RA, Mackinnon SE. Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury. *Pain* 32:89-94, 1998.
- Castrillon EE, Ernberg M, Cairns BE, Wang K, Sessle BJ, Arendt-Nielsen L, et al. Interstitial glutamate concentration is elevated in the masseter muscle of myofascial temporomandibular disorder patients. *J Orofac Pain*. 2010;24(4):350-60.
- Catheline G, Le Guen S, Besson JM. Intravenous morphine does not modify dorsal horn touch-evoked allodynia in the mononeuropathic rat: a Fos study. *Pain* 92:389-398, 2001.
- Célérier E, Simonnet G, Maldonado R. Prevention of fentanyl-induced delayed pronociceptive effects in mice lacking the protein kinase Cgamma gene. *Neuropharmacology* 46:264-72, 2004.
- Chao T, Pham K, Steward O, Gupta R. Chronic nerve compression injury induces a phenotypic switch of neurons within the dorsal root ganglia. *J Comp Neurol*. 10 janv 2008;506(2):180-93.
- Chebbi R, Boyer N, Monconduit L, Artola A, Luccarini P, Dallel R. The nucleus raphe magnus OFF-cells are involved in diffuse noxious inhibitory controls. *Exp Neurol*. juin 2014;256:39-45.
- Chen L, Huang LY. Protein kinase C reduces Mg<sup>2+</sup> block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature*. 9 avr 1992;356(6369):521-3.
- Chen L, Wright LR, Chen CH, Oliver SF, Wender PA, Mochly-Rosen D. Molecular transporters for peptides: delivery of a cardioprotective epsilonPKC agonist peptide into cells and intact ischemic heart using a transport system, R(7). *Chem Biol* 8:1123-1129, 2001.
- Chen Q, Chu H, Wang X, Chen J, Li J, Cui Y. [Expression of plasma membrane Ca<sup>2+</sup>(+)-ATPase isoform 2 in spiral ganglion cells of newborn rats]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. févr 2010;45(2):128-32.
- Cheng HT, Suzuki M, Hegarty DM, Xu Q, Weyerbacher AR, South SM, Ohata M, Inturrisi CE. Inflammatory pain-induced signaling events following a conditional deletion of the N-methyl-D-aspartate receptor in spinal cord dorsal horn. *Neuroscience* 155:948-58, 2008.
- Cheung LK, Lo J. The long-term clinical morbidity of mandibular step osteotomy. *Int J Adult Orthodon Orthognath Surg*. 2002;17(4):283-90

- Chiang C-Y, Dostrovsky JO, Iwata K, Sessle BJ. Role of glia in orofacial pain. *Neurosci Rev J Bringing Neurobiol Neurol Psychiatry*. juin 2011;17(3):303-20.
- Churchill EN, Qvit N, Mochly-Rosen D. Rationally designed peptide regulators of protein kinase C. *Trends Endocrinol Metab* 20:25-33, 2009.
- Coderre TJ. Contribution of protein kinase C to central sensitization and persistent pain following tissue injury. *Neurosci Lett* 140:181-4, 1992.
- Coull JAM, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, et al. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*. 15 déc 2005;438(7070):1017-21.
- Coull JAM, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sîk A, et al. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature*. 21 août 2003;424(6951):938-42.
- Craig AD. Distribution of trigeminothalamic and spinothalamic lamina I terminations in the macaque monkey. *J Comp Neurol*. 13 sept 2004;477(2):119-48.
- Cumberbatch MJ, Herrero JF, Headley PM. Exposure of rat spinal neurones to NMDA, AMPA and kainate produces only short-term enhancements of responses to noxious and non-noxious stimuli. *Neurosci Lett*. 7 nov 1994;181(1-2):98-102.
- Dai Y, Iwata K, Fukuoka T, Kondo E, Tokunaga A, Yamanaka H, et al. Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in primary afferent neurons by noxious stimuli and its involvement in peripheral sensitization. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1 sept 2002;22(17):7737-45.
- Dallel R, Duale C, Luccarini P, Molat JL. Stimulus-function, wind-up and modulation by diffuse noxious inhibitory controls of responses of convergent neurons of the spinal trigeminal nucleus oralis. *Eur J Neurosci*. janv 1999;11(1):31-40.
- Dallel R, Villanueva L, Woda A, Voisin D. [Neurobiology of trigeminal pain]. *Médecine Sci MS*. mai 2003;19(5):567-74.
- Dallel R, Voisin D. Physiologie et physiopathologie des douleurs orofaciales. *Bull. Acad. Natle Chir.Dent.*, 2007; 50.
- Djoughri L, Lawson SN. Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res Brain Res Rev*. oct 2004;46(2):131-45.
- Drew LJ, Wood JN, Cesare P. Distinct mechanosensitive properties of capsaicin-sensitive and -insensitive sensory neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 15 juin 2002;22(12):RC228.
- Dubin AE, Schmidt M, Mathur J, Petrus MJ, Xiao B, Coste B, et al. Inflammatory signals enhance piezo2-mediated mechanosensitive currents. *Cell Rep*. 27 sept 2012;2(3):511-7.
- Ducros A. [Genetics of migraine]. *Rev Neurol (Paris)*. mai 2013;169(5):360-71.
- Dworkin RH, Backonja M, Rowbotham MC, Allen RR, Argoff CR, Bennett GJ, et al. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Arch Neurol*. nov 2003;60(11):1524-34.
- Eriksson J, Jablonski A, Persson A-K, Hao J-X, Kouya PF, Wiesenfeld-Hallin Z, et al. Behavioral changes and trigeminal ganglion sodium channel regulation in an orofacial neuropathic pain model. *Pain*. 15 déc 2005;119(1-3):82-94.
- Feng J, Zhang Z, Li W, Shen X, Song W, Yang C, et al. Missense mutations in the MEFV gene are associated with fibromyalgia syndrome and correlate with elevated IL-1beta plasma levels. *PloS One*. 2009;4(12):e8480.
- Feng Y, Simpson TL. Nociceptive sensation and sensitivity evoked from human cornea and conjunctiva stimulated by CO<sub>2</sub>. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. févr 2003;44(2):529-32.



- Field MJ, Bramwell S, Hughes J, Singh L. Detection of static and dynamic components of mechanical allodynia in rat models of neuropathic pain: are they signalled by distinct primary sensory neurones? *Pain*. nov 1999;83(2):303-11.
- Field MJ, McCleary S, Hughes J, Singh L. Gabapentin and pregabalin, but not morphine and amitriptyline, block both static and dynamic components of mechanical allodynia induced by streptozocin in the rat. *Pain* 80:391-398, 1999b.
- Fields H. State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci*. juill 2004;5(7):565-75.
- Fields, HL.; Basbaum, AI.; Heinricher, MM. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: McMahon, SB.; Koltzenburg, M., editors. *Textbook of Pain*. Elsevier; 2006.
- Fukushima T, Kerr FW. Organization of trigeminothalamic tracts and other thalamic afferent systems of the brainstem in the rat: presence of gelatinosa neurons with thalamic connections. *J Comp Neurol*. 1 janv 1979;183(1):169-84.
- Gao YJ, Ji RR. 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* 115:505-14, 2010.
- Garcia-Larrea L, Magnin M. [Pathophysiology of neuropathic pain: review of experimental models and proposed mechanisms]. *Presse Médicale Paris Fr* 1983. févr 2008;37(2 Pt 2):315-40.
- Gerard MW. Afferent impulses of the trigeminal nerve. The intramedullary course of the painful thermal and tactile impulses. *Arch Neurol Psychiatr* 1923; 9: 306-38.
- Gerber G, Kangrga I, Ryu PD, Larew JS, Randic M. Multiple effects of phorbol esters in the rat spinal dorsal horn. *J Neurosci* 90:3606-17, 1989.
- Gonzalez MI, Field MJ, Hughes J, Singh L. Evaluation of selective NK(1) receptor antagonist CI-1021 in animal models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther*. août 2000;294(2):444-50.
- Gregg JM. Neuropathic complications of mandibular implant surgery: review and case presentations. *Ann R Australas Coll Dent Surg*. oct 2000;15:176-80.
- Grémeau-Richard C, Dubray C, Aublet-Cuvelier B, Ughetto S, Woda A. Effect of lingual nerve block on burning mouth syndrome (stomatodynia): a randomized crossover trial. *Pain*. avr 2010;149(1):27-32.
- Han ZS, Zhang ET, Craig AD. Nociceptive and thermoreceptive lamina I neurons are anatomically distinct. *Nat Neurosci*. juill 1998;1(3):218-25.
- Hargreaves KM. Orofacial pain. *Pain*. mars 2011;152(3 Suppl):S25-32.
- Henneberger C, Papouin T, Oliet SHR, Rusakov DA. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature*. 14 janv 2010;463(7278):232-6.
- Honda K, Kitagawa J, Sessle BJ, Kondo M, Tsuboi Y, Yonehara Y, et al. Mechanisms involved in an increment of multimodal excitability of medullary and upper cervical dorsal horn neurons following cutaneous capsaicin treatment. *Mol Pain*. 2008;4:59.
- Honore P, Rogers SD, Schwei MJ, Salak-Johnson JL, Luger NM, Sabino MC, Clohisey DR, Mantyh PW. Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons. *Neuroscience* 98:585-98, 2000
- Hosobuchi Y, Adams JE, Linchitz R. Pain relief by electrical stimulation of the central gray matter in humans and its reversal by naloxone. *Science*. 8 juill 1977;197(4299):183-6.
- Hu GY, Hvalby O, Walaas SI, Albert KA, Skjeflo P, Andersen P, Greengard P Protein kinase C injection into hippocampal pyramidal cells elicits features of long term potentiation. *Nature*. 1987 Jul 30-Aug 5;328(6129):426-9.

- Hylden JL, Hayashi H, Dubner R, Bennett GJ. Physiology and morphology of the lamina I spinomesencephalic projection. *J Comp Neurol*. 22 mai 1986;247(4):505-15.
- Iggo A. Cutaneous mechanoreceptors with afferent C fibres. *J Physiol*. juill 1960;152:337-53.
- Igwe OJ, Chronwall BM. Hyperalgesia induced by peripheral inflammation is mediated by protein kinase C betaII isozyme in the rat spinal cord. *Neuroscience*. 2001;104:875-90.
- Ikeda H1, Heinke B, Ruscheweyh R, Sandkühler J. Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia. *Science*. 2003 Feb 21;299(5610):1237-40.
- Iwata K, Imamura Y, Honda K, Shinoda M. Physiological mechanisms of neuropathic pain: the orofacial region. *Int Rev Neurobiol*. 2011;97:227-50.
- Iwata K, Tashiro A, Tsuboi Y, Imai T, Sumino R, Morimoto T, et al. Medullary dorsal horn neuronal activity in rats with persistent temporomandibular joint and perioral inflammation. *J Neurophysiol*. sept 1999;82(3):1244-53.
- Jääskeläinen SK, Teerijoki-Oksa T, Forssell H. Neurophysiologic and quantitative sensory testing in the diagnosis of trigeminal neuropathy and neuropathic pain. *Pain*. oct 2005;117(3):349-57.
- Jääskeläinen SK. The utility of clinical neurophysiological and quantitative sensory testing for trigeminal neuropathy. *J Orofac Pain*. 2004;18(4):355-9.
- Jaber L, Swaim WD, Dionne RA. Immunohistochemical localization of mu-opioid receptors in human dental pulp. *J Endod*. févr 2003;29(2):108-10.
- Ji RR, Baba H, Brenner GJ, Woolf CJ. Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nat Neurosci* 2:1114-9, 1999.
- Ji RR, Befort K, Brenner GJ, Woolf CJ. ERK MAP kinase activation in superficial spinal cord neurons induces prodynorphin and NK-1 upregulation and contributes to persistent inflammatory pain hypersensitivity. *J Neurosci* 22:478-85, 2002.
- Ji RR, Gereau RW, Malcangio M, Strichartz GR. MAP kinase and pain. *Brain Res Rev* 60:135-148, 2009.
- Juhl, Gitte I. et al. « Central Sensitization Phenomena after Third Molar Surgery: A Quantitative Sensory Testing Study ». *European Journal of Pain*. 2008: 116-127.
- Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001;413:203-210
- Kamei J, Zushida K. The role of spinal cholecystokinin B receptors in thermal allodynia and hyperalgesia in diabetic mice. *Brain Res* 892:370-5, 2001.
- Keller F, Beggs S, Salter MW, De Koninck Y. Transformation of the output of spinal lamina I neurons after nerve injury and microglia stimulation underlying neuropathic pain. *Molecular Pain* 3:27, 2007.
- Kerr FW. The fine structure of the subnucleus caudalis of the trigeminal nerve. *Brain Res*. 13 oct 1970;23(2):129-45.
- Khan A, Hargreaves KM. Animal models of orofacial pain. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2010;617:93-104.
- Kitagawa J, Takeda M, Suzuki I, Kadoi J, Tsuboi Y, Honda K, et al. Mechanisms involved in modulation of trigeminal primary afferent activity in rats with peripheral mononeuropathy. *Eur J Neurosci*. oct 2006;24(7):1976-86.
- Kose A, Ito A, Saito N, Tanaka C. Electron microscopic localization of gamma- and beta II-subspecies of protein kinase C in rat hippocampus. *Brain Res*. 4 juin 1990;518(1-2):209-17.
- Krout KE, Loewy AD. Periaqueductal gray matter projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *J Comp Neurol*. 14 août 2000;424(1):111-41.
- Krzyzanowska A, Avendaño C. Behavioral testing in rodent models of orofacial neuropathic and inflammatory pain. *Brain Behav* 2:678-97, 2012.

- Lam DK, Sessle BJ, Hu JW. Glutamate and capsaicin effects on trigeminal nociception I: Activation and peripheral sensitization of deep craniofacial nociceptive afferents. *Brain Res.* 28 janv 2009;1251:130-9.
- Lam DK, Sessle BJ, Hu JW. Surgical incision can alter capsaicin-induced central sensitization in rat brainstem nociceptive neurons. *Neuroscience.* 15 oct 2008;156(3):737-47.
- Lapirot O, Chebbi R, Monconduit L, Artola A, Dallel R, Luccarini P. NK1 receptor-expressing spinoparabrachial neurons trigger diffuse noxious inhibitory controls through lateral parabrachial activation in the male rat. *Pain.* avr 2009;142(3):245-54.
- Lapirot O, Melin C, Modolo A, Nicolas C, Messaoudi Y, Monconduit L, et al. Tonic and phasic descending dopaminergic controls of nociceptive transmission in the medullary dorsal horn. *Pain.* août 2011;152(8):1821-31.
- Larsson M. Ionotropic glutamate receptors in spinal nociceptive processing. *Mol Neurobiol.* déc 2009;40(3):260-88.
- Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 10:895-926, 2009.
- Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. *Pain.* juin 1979;6(3):283-304.
- Le Bars D, Willer J-C. *Physiologie de la douleur.* EMC Anesthésie-Réanimation. 2004;36-020-A-10
- Lennartsson B. Number and distribution of muscle spindles in the masticatory muscles of the rat. *J Anat.* mars 1980;130(Pt 2):279-88.
- Leston JM. Anatomie fonctionnelle du nerf trijumeau. *Neurochirurgie.* avr 2009;55(2):99-112.
- Lewin GR, Moshourab R. Mechanosensation and pain. *J Neurobiol.* oct 2004;61(1):30-44.
- Li H-F, Mochly-Rosen D, Kendig JJ. Protein kinase C $\gamma$  mediates ethanol withdrawal hyper-responsiveness of NMDA receptor currents in spinal cord motor neurons. *Br J Pharmacol.* févr 2005;144(3):301-7.
- Li L, Rutlin M, Abaira VE, Cassidy C, Kus L, Gong S, et al. The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons. *Cell.* 23 déc 2011;147(7):1615-27.
- Light AR, Trevino DL, Perl ER. Morphological features of functionally defined neurons in the marginal zone and substantia gelatinosa of the spinal dorsal horn. *J Comp Neurol.* 15 juill 1979;186(2):151-71.
- Lin Q, Peng YB, Willis WD. Inhibition of primate spinothalamic tract neurons by spinal glycine and GABA is reduced during central sensitization. *J Neurophysiol* 76:1005-1, 1996.
- Lin Q, Peng YB, Willis WD. Possible role of protein kinase C in the sensitization of primate spinothalamic tract neurons. *J Neurosci* 16:3026-34, 1996.
- Liu X-D, Wang J-J, Sun L, Chen L-W, Rao Z-R, Duan L, et al. Involvement of medullary dorsal horn glial cell activation in mediation of masseter mechanical allodynia induced by experimental tooth movement. *Arch Oral Biol.* déc 2009;54(12):1143-50.
- Liu Y, Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Fukuoka T, Tokunaga A, et al. Activation of extracellular signal-regulated protein kinase in dorsal horn neurons in the rat neuropathic intermittent claudication model. *Pain.* mai 2004;109(1-2):64-72.
- Lu Y, Dong H, Gao Y, Gong Y, Ren Y, Gu N, Zhou S, Xia N, Sun YY, Ji RR, Xiong L. A feed-forward spinal cord glycinergic neural circuit gates mechanical allodynia. *J Clin Invest* 123:4050-4062, 2013.
- Macfarlane TV, Blinkhorn AS, Davies RM, Ryan P, Worthington HV, Macfarlane GJ. Orofacial pain: just another chronic pain? Results from a population-based survey. *Pain.* oct 2002;99(3):453-8.

- Malenka RC, Nicoll RA. Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* 285:1870-4, 1999.
- Malenka RC1, Kauer JA, Perkel DJ, Mauk MD, Kelly PT, Nicoll RA, Waxham MN. An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature* 340(6234):554-557, 1989.
- Malenka RC1, Nicoll RA. Long-term potentiation--a decade of progress? *Science*. 1999 Sep 17;285(5435):1870-4.
- Malinow R1, Schulman H, Tsien RW. Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* 245(4920):862-866, 1989.
- Malmberg AB, Chen C, Tonegawa S, Basbaum AI. Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKCgamma. *Science*. 10 oct 1997;278(5336):279-83.
- Mantzourani M, Sharma D. Dentine sensitivity: Past, present and future. *J Dent*. juill 2013;41, Supplement 4:S3-17.
- Marchand JE, Wurm WH, Kato T, Kream RM. Altered tachykinin expression by dorsal root ganglion neurons in a rat model of neuropathic pain. *Pain*. août 1994;58(2):219-31.
- Martin WJ, Liu H, Wang H, Malmberg AB, Basbaum AI. Inflammation-induced up-regulation of protein kinase Cgamma immunoreactivity in rat spinal cord correlates with enhanced nociceptive processing. *Neuroscience* 88:1267-74, 1999.
- Martin WJ, Malmberg AB, Basbaum AI. PKCgamma contributes to a subset of the NMDA-dependent spinal circuits that underlie injury-induced persistent pain. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 15 juill 2001;21(14):5321-7.
- Matsuzawa-Yanagida K, Narita M, Nakajima M, Kuzumaki N, Niikura K, Nozaki H, et al. Usefulness of antidepressants for improving the neuropathic pain-like state and pain-induced anxiety through actions at different brain sites. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. juill 2008;33(8):1952-65.
- Matthews B. and Sessle B.J. Peripheral mechanisms of orofacial pain. In: Sessle BJ, Lavigne G, Dubner R, Lund JP (Eds.), *Orofacial Pain*, 2nd Edition. Quintessence, Chicago, 2008, pp. 27-43.
- Mayer DJ, Liebeskind JC. Pain reduction by focal electrical stimulation of the brain: an anatomical and behavioral analysis. *Brain Res*. 15 mars 1974;68(1):73-93.
- Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science*. 19 nov 1965;150(3699):971-9.
- Mengel MKC, Jyväsjärvi E, Kniffki K-D. Evidence for slowly conducting afferent fibres innervating both tooth pulp and periodontal ligament in the cat. *Pain*. mai 1996;65(2-3):181-8.
- Merskey, H., Bogduk, N. (Eds.). *Classification of Chronic Pain*. IASP Task Force on Taxonomy. *Classification of Chronic Pain: Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms* Seattle: IASP Press; 1994.
- Michaud, Kaleb, et Frederick Wolfe. « Comorbidities in Rheumatoid Arthritis ». *Best practice & research. Clinical rheumatology* 21.5 (2007): 885-906. NCBI PubMed. Web.
- Milligan ED, Watkins LR. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*. janv 2009;10(1):23-36.
- Miraucourt LS, Dallel R, Voisin DL. Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through PKCgamma interneurons. *PloS One*. 2007;2(11):e1116.
- Miraucourt LS, Moisset X, Dallel R, Voisin DL. Glycine inhibitory dysfunction induces a selectively dynamic, morphine-resistant, and neurokinin 1 receptor-independent mechanical allodynia. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 25 févr 2009;29(8):2519-27.
- Miraucourt LS, Peirs C, Dallel R, Voisin DL Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through astrocyte-derived D-serine. *Pain*. 2011 Jun;152(6):1340-8.

- Miyamoto M, Tsuboi Y, Takamiya K, Haganir RL, Kondo M, Shinoda M, et al. Involvement of GluR2 and GluR3 subunit C-termini in the trigeminal spinal subnucleus caudalis and C1-C2 neurons in trigeminal neuropathic pain. *Neurosci Lett*. 10 mars 2011;491(1):8-12.
- Mochly-Rosen D, Das K, Grimes KV. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nat Rev Drug Discov* 11:937-57, 2012.
- Mochly-Rosen D, Gordon AS. Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. janv 1998;12(1):35-42.
- Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1 août 2002;22(15):6724-31.
- Moreira THV, Gover TD, Weinreich D. Electrophysiological Properties and Chemosensitivity of Acutely Dissociated Trigeminal Somata Innervating the Cornea. *Neuroscience*. 7 sept 2007;148(3):766-74.
- Morgan JR, Gebhart GF. Characterization of a model of chronic orofacial hyperalgesia in the rat: contribution of NA(V) 1.8. *J Pain Off J Am Pain Soc*. juin 2008;9(6):522-31.
- Mori M, Kose A, Tsujino T, Tanaka C. Immunocytochemical localization of protein kinase C subspecies in the rat spinal cord: light and electron microscopic study. *J Comp Neurol*. 8 sept 1990;299(2):167-77.
- Nakagawa K, Takeda M, Tsuboi Y, Kondo M, Kitagawa J, Matsumoto S, et al. Alteration of primary afferent activity following inferior alveolar nerve transection in rats. *Mol Pain*. 2010;6:9.
- Nakajima A, Tsuboi Y, Suzuki I, Honda K, Shinoda M, Kondo M, et al. PKC $\gamma$  in Vc and C1/C2 is involved in trigeminal neuropathic pain. *J Dent Res*. juin 2011;90(6):777-81.
- Narita M, Aoki T, Ozaki S, Yajima Y, Suzuki T. Involvement of protein kinase C $\gamma$  isoform in morphine-induced reinforcing effects. *Neuroscience*. 2001;103(2):309-14.
- Narita M, Mizoguchi H, Narita M, Nagase H, Suzuki T, Tseng LF. Involvement of spinal protein kinase C $\gamma$  in the attenuation of opioid  $\mu$ -receptor-mediated G-protein activation after chronic intrathecal administration of [D-Ala<sup>2</sup>,N-MePhe<sup>4</sup>,Gly-OI<sup>5</sup>]enkephalin. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1 juin 2001;21(11):3715-20.
- Nassar MA, Stirling LC, Forlani G, Baker MD, Matthews EA, Dickenson AH, et al. Nociceptor-specific gene deletion reveals a major role for Nav1.7 (PN1) in acute and inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 24 août 2004;101(34):12706-11.
- Neumann S, Braz JM, Skinner K, Llewellyn-Smith IJ, Basbaum AI. Innocuous, not noxious, input activates PKC $\gamma$  interneurons of the spinal dorsal horn via myelinated afferent fibers. *J Neurosci* 28:7936-7944, 2008.
- Nichols ML, Allen BJ, Rogers SD, Ghilardi JR, Honore P, Luger NM, et al. Transmission of chronic nociception by spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science*. 19 nov 1999;286(5444):1558-61.
- Niikura K, Kobayashi Y, Okutsu D, Furuya M, Kawano K, Maitani Y, Suzuki T, Narita M. Implication of spinal protein kinase C $\gamma$  isoform in activation of the mouse brain by intrathecal injection of the protein kinase C activator phorbol 12,13-dibutyrate using functional magnetic resonance imaging analysis. *Neurosci Lett* 433:6-10, 2008.
- Niikura K, Narita M, Okutsu D, Tsurukawa Y, Nanjo K, Kurahashi K, Kobayashi Y, Suzuki T. Implication of endogenous beta-endorphin in the inhibition of the morphine-induced rewarding effect by the direct activation of spinal protein kinase C in mice. *Neurosci Lett* 433:54-8, 2008.

- O'Hagan R, Chalfie M, Goodman MB. The MEC-4 DEG/ENaC channel of *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons transduces mechanical signals. *Nat Neurosci.* janv 2005;8(1):43-50.
- Oancea E, Teruel MN, Quest AF, Meyer T. Green fluorescent protein (GFP)-tagged cysteine-rich domains from protein kinase C as fluorescent indicators for diacylglycerol signaling in living cells. *J Cell Biol* 140:485-98, 1998.
- Ochoa JL, Yarnitsky D. Mechanical hyperalgesias in neuropathic pain patients: dynamic and static subtypes. *Ann Neurol.* mai 1993;33(5):465-72.
- Olausson H, Lamarre Y, Backlund H, Morin C, Wallin BG, Starck G, et al. Unmyelinated tactile afferents signal touch and project to insular cortex. *Nat Neurosci.* sept 2002;5(9):900-4.
- Oliet SHR, Mothet J-P. Molecular determinants of D-serine-mediated gliotransmission: from release to function. *Glia.* 15 nov 2006;54(7):726-37.
- Palecek J, Palecková V, Dougherty PM, Willis WD. The effect of phorbol esters on the responses of primate spinothalamic neurons to mechanical and thermal stimuli. *J Neurophysiol* 71:529-37, 1994.
- Palecek J, Paleckova V, Willis WD. The effect of phorbol esters on spinal cord amino acid concentrations and responsiveness of rats to mechanical and thermal stimuli. *Pain* 80:597-60, 1999.
- Park JS, Voitenko N, Petralia RS, Guan X, Xu JT, Steinberg JP, Takamiya K, Sotnik A, Kopach O, Haganir RL, Tao YX. Persistent inflammation induces GluR2 internalization via NMDA receptor-triggered PKC activation in dorsal horn neurons. *J Neurosci* 29:3206-19, 2009.
- Park SJ, Zhang S, Chiang CY, Hu JW, Dostrovsky JO, Sessle BJ. Central sensitization induced in thalamic nociceptive neurons by tooth pulp stimulation is dependent on the functional integrity of trigeminal brainstem subnucleus caudalis but not subnucleus oralis. *Brain Res.* 27 sept 2006;1112(1):134-45.
- Patapoutian, Ardem et al. « ThermoTRP Channels and beyond: Mechanisms of Temperature Sensation ». *Nature Reviews. Neuroscience* 4.7 (2003): 529-539.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* New York: Academic Press, 1997.
- Peirs C, Patil S, Bouali-Benazzouz R, Artola A, Landry M, Dallel R. Protein kinase C gamma interneurons in the rat medullary dorsal horn: distribution and synaptic inputs to these neurons, and subcellular localization of the enzyme. *J Comp Neurol* 522:93-413, 2014.
- Peng YB, Lin Q, Willis WD. Involvement of protein kinase C in responses of rat dorsal horn neurons to mechanical stimuli and periaqueductal gray descending inhibition. *Exp Brain Res* 114:561-7, 1997.
- Peyron P. *Physiologie de la douleur.* EMC - Neurologie 2007:1-14 [Article 17-003-F-10].
- Pham Dang N, Descheemaeker A, Dallel R, Artola A. Activation of the medullary dorsal horn PKC $\gamma$  interneurons produces static as well as dynamic mechanical hypersensitivity. (Submitted) 2014.
- Pitcher GM, Henry JL. Nociceptive response to innocuous mechanical stimulation is mediated via myelinated afferents and NK-1 receptor activation in a rat model of neuropathic pain. *Exp Neurol.* avr 2004;186(2):173-97.
- Polgár E, Fowler JH, McGill MM, Todd AJ. The types of neuron which contain protein kinase C gamma in rat spinal cord. *Brain Res.* 26 juin 1999;833(1):71-80.
- Polgár E, Hughes DI, Arham AZ, Todd AJ. Loss of neurons from laminae I-III of the spinal dorsal horn is not required for development of tactile allodynia in the spared nerve injury model of neuropathic pain. *J Neurosci.* 2005 Jul 13;25(28):6658-66.

- Polycarpou N, Ng Y-L, Canavan D, Moles DR, Gulabivala K. Prevalence of persistent pain after endodontic treatment and factors affecting its occurrence in cases with complete radiographic healing. *Int Endod J.* mars 2005;38(3):169-78.
- Randić M, Jiang MC, Cerne R Long-term potentiation and long-term depression of primary afferent neurotransmission in the rat spinal cord. *J Neurosci.* 1993 Dec;13(12):5228-41.
- Raphaël B, Lebeau J, Bettega G. Développement et croissance de la mandibule dans son environnement. *Ann Chir Plast Esthét* 2001 ; 46 : 478-94
- Ren K. An improved method for assessing mechanical allodynia in the rat. *Physiol. Behav* 67:711-716, 1999.
- Reymann KG, Brödemann R, Kase H, Matthies H. Inhibitors of calmodulin and protein kinase C block different phases of hippocampal long-term potentiation. *Brain Res.*, 461: 388-392, 1988.
- Reynolds DV. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science.* 25 avr 1969;164(3878):444-5.
- Roberts LA, Beyer C, Komisaruk BR. Nociceptive responses to altered GABAergic activity at the spinal cord. *Life Sci* 39:1667-1674, 1986
- Rodríguez-Lozano FJ, Sanchez-Pérez A, Moya-Villaescusa MJ, Rodríguez-Lozano A, Sáez-Yuguero MR. Neuropathic orofacial pain after dental implant placement: review of the literature and case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*avr 2010;109(4):e8-12.
- Rózsa AJ, Beuerman RW. Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit. *Pain.*oct 1982;14(2):105-20.
- Saito N, Shirai Y. Protein kinase C gamma (PKC gamma): function of neuron specific isotype. *J Biochem (Tokyo).*nov 2002;132(5):683-7.
- Sakai N, Sasaki K, Ikegaki N, Shirai Y, Ono Y, Saito N. Direct visualization of the translocation of the gamma-subspecies of protein kinase C in living cells using fusion proteins with green fluorescent protein. *J Cell Biol.* 15 déc 1997;139(6):1465-76.
- Sakai N, Tsubokawa H, Matsuzaki M, Kajimoto T, Takahashi E, Ren Y, et al. Propagation of gammaPKC translocation along the dendrites of Purkinje cell in gammaPKC-GFP transgenic mice. *Genes Cells Devoted Mol Cell Mech.* oct 2004;9(10):945-57.
- Sandkühler J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev.* avr 2009;89(2):707-58.
- Sasaki A, Serizawa K, Andoh T, Shiraki K, Takahata H, Kuraishi Y. Pharmacological differences between static and dynamic allodynia in mice with herpetic or postherpetic pain. *J Pharmacol Sci* 108:266-273, 2008.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676-682, 2012.
- Schmidt R, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Torebjörk E, Handwerker H. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* janv 1995;15(1 Pt 1):333-41.
- Schoffnegger D, Ruscheweyh R, Sandkühler J. Spread of excitation across modality borders in spinal dorsal horn of neuropathic rats. *PAIN.*avr 2008;135(3):300-10.
- Seal RP, Wang X, Guan Y, Raja SN, Woodbury CJ, Basbaum AI, et al. Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature.* 3 déc 2009;462(7273):651-5.

- Sessle BJ. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Crit Rev Oral Biol Med Off Publ Am Assoc Oral Biol.* 2000;11(1):57-91.
- Sessle BJ. Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain. *Int Rev Neurobiol.* 2011;97:179-206.
- Shehab SAS, Spike RC, Todd AJ. Evidence against cholera toxin B subunit as a reliable tracer for sprouting of primary afferents following peripheral nerve injury. *Brain Res.* 28 févr 2003;964(2):218-27.
- Sherrington CS. *The integrative action of the nervous system.* New Haven, CT: Yale University Press; 1906.
- Shigetani Y, Howard S, Guidato S, Furushima K, Abe T, Itasaki N. Wnt3 promotes coalescence of cells of neural crest and placode origins in the trigeminal region during head development. *Dev Biol.* 2008;319(2):346-58.
- Shinoda M, Kawashima K, Ozaki N, Asai H, Nagamine K, Sugiura Y. P2X3 receptor mediates heat hyperalgesia in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *J Pain Off J Am Pain Soc.* juill 2007;8(7):588-97.
- Shumilla JA, Liron T, Mochly-Rosen D, Kendig JJ, Sweitzer SM. Ethanol withdrawal-associated allodynia and hyperalgesia: age-dependent regulation by protein kinase C epsilon and gamma isoenzymes. *J Pain Off J Am Pain Soc.* août 2005;6(8):535-49.
- Sikand P, Premkumar LS. Potentiation of glutamatergic synaptic transmission by protein kinase C-mediated sensitization of TRPV1 at the first sensory synapse. *J Physiol* 581:631-4, 2007.
- Simone DA, Kajander KC. Responses of cutaneous A-fiber nociceptors to noxious cold. *J Neurophysiol.* avr 1997;77(4):2049-60.
- Sluka KA, Audette KM. Activation of protein kinase C in the spinal cord produces mechanical hyperalgesia by activating glutamate receptors, but does not mediate chronic muscle-induced hyperalgesia. *Mol Pain* 2:13, 2006.
- Sossin WS. Isoform specificity of protein kinase Cs in synaptic plasticity. *Learn Mem* 14:236-46, 2007.
- Strassman AM, Weissner W, Williams M, Ali S, Levy D. Axon diameters and intradural trajectories of the dural innervation in the rat. *J Comp Neurol.* 31 mai 2004;473(3):364-76.
- Sunakawa M, Chiang CY, Sessle BJ, Hu JW. Jaw electromyographic activity induced by the application of algescic chemicals to the rat tooth pulp. *Pain.* avr 1999;80(3):493-501.
- Suzuki I, Tsuboi Y, Shinoda M, Shibuta K, Honda K, Katagiri A, et al. Involvement of ERK phosphorylation of trigeminal spinal subnucleus caudalis neurons in thermal hypersensitivity in rats with infraorbital nerve injury. *PloS One.* 2013;8(2):e57278.
- Suzuki R, Morcuende S, Webber M, Hunt SP, Dickenson AH. Superficial NK1-expressing neurons control spinal excitability through activation of descending pathways. *Nat Neurosci.* déc 2002;5(12):1319-26.
- Suzuki R, Rahman W, Rygh LJ, Webber M, Hunt SP, Dickenson AH. Spinal-supraspinal serotonergic circuits regulating neuropathic pain and its treatment with gabapentin. *Pain.* oct 2005;117(3):292-303.
- Sweitzer SM, Wong SME, Tjolsen A, Allen CP, Mochly-Rosen D, Kendig JJ. Exaggerated nociceptive responses on morphine withdrawal: roles of protein kinase C epsilon and gamma. *Pain.* juill 2004;110(1-2):281-9.
- Tal M, Devor M. Chapter 8: Anatomy and neurophysiology of orofacial pain. *Orofacial pain and Headhack.* Editor: Mosby Elsevier. 2008.



- Tanaka C, Saito N. Localization of subspecies of protein kinase C in the mammalian central nervous system. *Neurochem Int.* déc 1992;21(4):499-512.
- Teodoro FC, Tronco Júnior MF, Zampronio AR, Martini AC, Rae GA, Chichorro JG. Peripheral substance P and neurokinin-1 receptors have a role in inflammatory and neuropathic orofacial pain models. *Neuropeptides.* juin 2013;47(3):199-206.
- Toda K, Ishii N, Nakamura Y. Characteristics of mucosal nociceptors in the rat oral cavity: an in vitro study. *Neurosci Lett.* 1997;228(2):95-8.
- Todd AJ. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci.* déc 2010;11(12):823-36.
- Torsney C, MacDermott AB. Disinhibition opens the gate to pathological pain signaling in superficial neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord. *J Neurosci* 26:1833-1843, 2006.
- Torsney C, MacDermott AB. Disinhibition opens the gate to pathological pain signaling in superficial neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord. *J Neurosci* 26:1833-1843, 2006.
- Treede RD, Kenshalo DR, Gracely RH, Jones AK. The cortical representation of pain. *Pain.* févr 1999;79(2-3):105-11.
- Tsai CM, Chiang CY, Yu XM, Sessle BJ. Involvement of trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) in craniofacial nociceptive reflex activity. *Pain.* mai 1999;81(1-2):115-28.
- Tsuboi Y, Iwata K, Dostrovsky JO, Chiang CY, Sessle BJ, Hu JW. Modulation of astroglial glutamine synthetase activity affects nociceptive behaviour and central sensitization of medullary dorsal horn nociceptive neurons in a rat model of chronic pulpitis. *Eur J Neurosci.* juill 2011;34(2):292-302.
- Tsuboi Y, Takeda M, Tanimoto T, Ikeda M, Matsumoto S, Kitagawa J, et al. Alteration of the second branch of the trigeminal nerve activity following inferior alveolar nerve transection in rats. *Pain.* oct 2004;111(3):323-34.
- Urban LA, Fox AJ. NK1 receptor antagonists--are they really without effect in the pain clinic? *Trends Pharmacol Sci.* déc 2000;21(12):462-4; author reply 465.
- Vardeh, Daniel et al. « COX2 in CNS Neural Cells Mediates Mechanical Inflammatory Pain Hypersensitivity in Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 119.2 (2009): 287-294.
- Vassal F, Créac'h C, Convers P, Laurent B, Garcia-Larrea L, Peyron R. Modulation of laser-evoked potentials and pain perception by transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS): A placebo-controlled study in healthy volunteers. *Clin Neurophysiol.* 2013;124(9):1861-1867.
- Vergnano AM, Schlichter R, Poisbeau P. PKC activation sets an upper limit to the functional plasticity of GABAergic transmission induced by endogenous neurosteroids. *Eur J Neurosci* 26:1173-82, 2007.
- Villanueva L, Bouhassira D, Le Bars D. The medullary subnucleus reticularis dorsalis (SRD) as a key link in both the transmission and modulation of pain signals. *Pain.* oct 1996;67(2-3):231-40.
- Villanueva L, Nathan PW. Multiple pain pathways. In: Devor M, Rowbotham MC, Wiesendfeld-Hallin Z, eds. *Proceedings of the 9th World Congress on Pain.* Seattle: IASP Press, 2000 :371-86.
- Von Korff M, Dunn KM. Chronic pain reconsidered. *Pain.* 31 août 2008;138(2):267-76.
- Vos BP, Strassman AM, Maciewicz RJ. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *J Neurosci* 14:2708-2723, 1994.

- Wajima Z, Hua XY, Yaksh TL. Inhibition of spinal protein kinase C blocks substance P-mediated hyperalgesia. *Brain Res* 877:314-21, 2008.
- Walton JN. Altered sensation associated with implants in the anterior mandible: a prospective study. *J Prosthet Dent*.avr 2000;83(4):443-9.
- Waxman SG. Painful Na-channelopathies: an expanding universe. *Trends Mol Med*. juill 2013;19(7):406-9.
- Weyerbacher AR, Xu Q, Tamasdan C, Shin SJ, Inturrisi CE. N-Methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) independent maintenance of inflammatory pain.*Pain* 148:237-46, 2010.
- Willer JC, Bouhassira D, Le Bars D. Bases neurophysiologiques du phénomène de contre-irritation: les contrôles inhibiteurs diffus induits par stimulations nociceptives. *Neurophysiol Clin Neurophysiol*. oct 1999;29(5):379-400.
- Woda A, Molat JL, Luccarini P. Low doses of N-methyl-D-aspartate antagonists in superficial laminae of medulla oblongata facilitate wind-up of convergent neurones. *Neuroscience*. 2001;107(2):317-27.
- Woda A, Navez ML, Picard P, Gremeau C, Pichard-Leandri E. A possible therapeutic solution for stomatodynia (burning mouth syndrome).*J Orofac Pain*. 1998;12(4):272-8.
- Woolf CJ, Thompson SW. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain*. mars 1991;44(3):293-9.
- Woolf CJ. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity.*Nature*. 15 déc 1983;306(5944):686-8.
- Woolf, Clifford J, et Qiufu Ma. « Nociceptors--Noxious Stimulus Detectors ». *Neuron*55.3 (2007): 353-364.
- Xie YF, Zhang S, Chiang CY, Hu JW, Dostrovsky JO, Sessle BJ. Involvement of glia in central sensitization in trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn). *Brain Behav Immun*. juill 2007;21(5):634-41.
- Yamamoto M, Ueda R, Takahashi K, Saigo K, Uemura T. Control of axonal sprouting and dendrite branching by the Nrg-Ank complex at the neuron-glia interface. *Curr Biol CB*. 22 août 2006;16(16):1678-83.
- Yamazaki Y, Ren K, Shimada M, Iwata K. Modulation of paratrigeminal nociceptive neurons following temporomandibular joint inflammation in rats. *Exp Neurol*. déc 2008;214(2):209-18.
- Yang YR, He Y, Zhang Y, Li Y, Li Y, Han Y, Zhu H, Wang Y. Activation of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) in primary sensory and dorsal horn neurons by peripheral inflammation contributes to heat hyperalgesia. *Pain* 127:109-20, 2007.
- Yashpal K, Pitcher GM, Parent A, Quirion R, Coderre TJ. Noxious thermal and chemical stimulation induce increases in 3H-phorbol 12,13-dibutyrate binding in spinal cord dorsal horn as well as persistent pain and hyperalgesia, which is reduced by inhibition of protein kinase C. *J Neurosci* 15:3263-72, 1995.
- Yilmaz Z, Renton T, Yiangou Y, Zakrzewska J, Chessell IP, Bountra C, et al. Burning mouth syndrome as a trigeminal small fibre neuropathy: Increased heat and capsaicin receptor TRPV1 in nerve fibres correlates with pain score. *J Clin Neurosci Off J Neurosurg Soc Australas*. sept 2007;14(9):864-71.
- Young RF. Effect of trigeminal tractotomy on dental sensation in humans. *J Neurosurg*.juin 1982;56(6):812-8.
- Zhang RX, Ren KE. Animal models of inflammatory pain. In: *Neuromethods*, Vol. 49, .2011, p. 23-40.

- Zhang X, Zhang H, Shao H, Xue Q, Yu B. ERK MAP kinase activation in spinal cord regulates phosphorylation of Cdk5 at serine 159 and contributes to peripheral inflammation induced pain/hypersensitivity. *PLoS One* 9:e8778, 2014.
- Zhao C, Leitges M, Gereau RW. Isozyme-specific effects of protein kinase C in pain modulation. *Anesthesiology*.déc 2011;115(6):1261-70.
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109-110, 1983.
- Zou W, Song Z, Guo Q, Liu C, Zhang Z, Zhang Y. Intrathecal lentiviral-mediated RNA interference targeting PKC $\gamma$  attenuates chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Hum Gene Ther* 22:465-475, 2011

## RESUME

### **Protéine kinase C $\gamma$ et hypersensibilité mécanique trigéminal chez le rat**

Les syndromes douloureux chroniques, inflammatoires ou neuropathiques, se caractérisent par une hypersensibilité douloureuse, sous forme de douleurs spontanées et d'allodynie et d'hyperalgésie. L'isoforme  $\gamma$  de la protéine kinase C (PKC $\gamma$ ), concentrée dans un type spécifique d'interneurones de la couche II interne (II<sub>i</sub>) de la corne dorsale de la moelle ou du sous-noyau caudal du trigémeau (Sp5C) est impliquée dans des mécanismes centraux de l'allodynie mécanique, une condition dans laquelle le toucher provoque une douleur. Nous avons utilisé des techniques comportementales et immunohistochimiques dans le système trigéminal.

Le rôle de la PKC $\gamma$  dans le développement de l'allodynie mécanique est bien établi après lésion nerveuse périphérique. Par contre, il l'est beaucoup moins dans l'allodynie d'origine inflammatoire. Nous avons testé l'hypothèse que l'allodynie mécanique persistante à la suite d'une inflammation périphérique provoquée par l'adjuvant complet de Freund ('complete Freund's adjuvant' ou CFA) est bien due à une activation de la PKC $\gamma$ . L'injection sous-cutanée de CFA au niveau de la zone d'insertion des vibrisses induit une allodynie persistante spécifiquement statique. L'immunomarquage phospho-ERK1/2 montre que l'expression de cette allodynie s'accompagne d'une activation d'interneurones des couches I-II<sub>e</sub> et II<sub>i</sub>-III<sub>e</sub>, dont des interneurones PKC $\gamma$  de la couche II<sub>i</sub>. Cette allodynie statique est supprimée par l'application intracisternale de l'antagoniste PKC $\gamma$ , KIG31-1, avant l'injection de CFA, mais pas 3 jours après l'injection de CFA. Ainsi, comme pour l'allodynie mécanique neuropathique, l'activation de la PKC $\gamma$  est nécessaire au développement de l'allodynie mécanique inflammatoire.

Nous avons aussi examiné si l'activation de la PKC $\gamma$  est suffisante pour le développement de l'allodynie mécanique. L'injection intracisternale de phorbol ester, 12,13-dibutyrate (PDBu), un activateur de la PKC $\gamma$ , induit simultanément une allodynie mécanique statique et dynamique de la face. L'immunoréactivité phospho-ERK1/2 révèle que l'expression de ces deux allodynies mécaniques s'accompagne de la même activation d'interneurones des couches I-II<sub>e</sub> et II<sub>i</sub>-III<sub>e</sub>, dont des interneurones PKC $\gamma$  de la couche II<sub>i</sub>. Les effets de l'application de PDBu sont bloqués par l'application simultanée de KIG31-1.

L'activation de la PKC $\gamma$  seule est suffisante pour que se développe une allodynie mécanique, à la fois statique et dynamique. On sait que les interneurones PKC $\gamma$  de la couche II<sub>i</sub> sont directement activés par des afférences myélinisées mécaniques non nociceptives. Le niveau d'activation de la PKC $\gamma$  contrôlerait la transmission de cette information vers les neurones de projection de la couche I, et donc la transformation du toucher en douleur.

### **MOTS CLES :**

Interneurone, PKC $\gamma$ , allodynie mécanique, douleur, caudalis, douleur inflammatoire orofaciale.

## SUMMARY

### **Protein kinase C $\gamma$ and trigeminal mechanical hypersensitivity in rats**

Inflammatory and neuropathic chronic pain syndromes are characterized by pain hypersensitivity, manifest as spontaneous pain, allodynia and hyperalgesia. The  $\gamma$  isoform of protein kinase C (PKC $\gamma$ ), which is concentrated in a specific class of interneurons within inner lamina II (II<sub>i</sub>) of the spinal (SDH) and medullary (MDH) dorsal horns, has been implicated in the central mechanisms underlying mechanical allodynia, a condition wherein touch produces pain. We used behavioral and immunohistochemical techniques in the trigeminal system.

Whereas there is clear evidence for the involvement of PKC $\gamma$  in neuropathic mechanical allodynia, that for the involvement of PKC $\gamma$  in inflammatory mechanical allodynia is still controversial. We investigated the involvement of PKC $\gamma$  into the persistent mechanical allodynia induced by complete Freund's adjuvant (CFA) inflammation. Subcutaneous injection of CFA into the vibrissa pad of rats induced a persistent selectively static mechanical allodynia. Monitoring neuronal activity within medullary dorsal horn (MDH) with phospho-ERK1/2 immunoreactivity showed that activation of both laminae I-II<sub>o</sub> and II<sub>i</sub>-III<sub>o</sub> neurons, including lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$ -expressing interneurons, was associated with the expression of static mechanical allodynia. Intracisternal injection of the selective PKC $\gamma$  antagonist, KIG31-1, prevented CFA-induced static mechanical allodynia only when it was injected before, but not 3 days after, CFA injection. These results show that, as for neuropathic mechanical allodynia, PKC $\gamma$  activation is necessary for inflammatory mechanical allodynia.

We also examined whether PKC $\gamma$  activation in naïve animals is sufficient for the establishment of mechanical allodynia. Intracisternal injection of the phorbol ester, 12,13-dibutyrate (PDBu), concomitantly induced static and dynamic facial mechanical allodynia. Monitoring neuronal activity within MDH with phospho-ERK1/2 immunoreactivity revealed that the same activation of both laminae I-II<sub>o</sub> and II<sub>i</sub>-III<sub>o</sub> neurons, including lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$ -expressing interneurons, was associated with the manifestation of both mechanical allodynia. PDBu-induced mechanical allodynia and associated neuronal activations were all prevented by intracisternal KIG31-1.

Our findings reveal that PKC $\gamma$  activation is sufficient for the development of static and dynamic mechanical allodynia. Lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  interneurons have been shown to be directly activated by low-threshold mechanical inputs carried by myelinated afferents. The level of PKC $\gamma$  activation might thus gate the transmission of innocuous mechanical inputs to lamina I, nociceptive output neurons, thus turning touch into pain.

### **KEYWORDS:**

Interneuron, PKC $\gamma$ , mechanical allodynia, pain, dorsal horn, orofacial inflammatory pain.