



**HAL**  
open science

# Contribution des canaux calciques de type T supra-spinaux à la douleur neuropathique : rôle du canal Cav3.2 exprimé dans le noyau prétectal antérieur

Sophie Fayad

► **To cite this version:**

Sophie Fayad. Contribution des canaux calciques de type T supra-spinaux à la douleur neuropathique : rôle du canal Cav3.2 exprimé dans le noyau prétectal antérieur. Neurosciences. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS102 . tel-02978832

**HAL Id: tel-02978832**

**<https://theses.hal.science/tel-02978832>**

Submitted on 26 Oct 2020

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

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



Thèse de Doctorat de Biologie de Sorbonne Université  
Spécialité Neurosciences  
Ecole doctorale Cerveau, Cognition et Comportement (ED3C)

**Contribution des canaux calciques de type T supra-spinaux  
à la douleur neuropathique**  
*Rôle du canal Cav3.2 exprimé dans le Noyau Prétectal Antérieur.*

Présentée par Sophie FAYAD  
Pour obtenir le grade de Docteur de Sorbonne Université

Thèse réalisée sous la direction du Pr. Régis LAMBERT  
*Laboratoire Neurosciences Paris Seine*  
*Equipe Réseaux de Neurones et Rythmes Physiopathologiques*

Soutenue le 10 Octobre 2019 devant le jury composé de :

Dr. Eric LINGUEGLIA	Rapporteur
Pr. Pierre VEINANTE	Rapporteur
Dr. Emmanuel BOURINET	Examineur
Dr. Sophie PEZET	Examinatrice
Pr. Ann LOHOF	Examinatrice
Pr. Régis LAMBERT	Directeur de thèse



## RESUME

---

Les troubles du système somatosensoriel causent la majorité des douleurs chroniques, affectant 1.5 milliards d'individus dans le monde. Les thérapies actuelles ont une efficacité limitée et/ou de nombreux effets indésirables. Ceci résulte en partie de la méconnaissance des mécanismes moléculaires de la douleur chronique. L'identification de nouvelles cibles pour développer des analgésiques innovants est donc un enjeu sociétal important. Les canaux ioniques, contrôlant l'excitabilité cellulaire dans les voies somatosensorielles, constituent une piste de recherche privilégiée. Parmi eux, l'isoforme Cav3.2 des canaux calciques à bas seuil d'activation, dits de type T, apparaît comme un candidat intéressant. En effet, son rôle crucial dans la perception douloureuse aiguë et neuropathique est établi aux niveaux périphérique et spinal. Cependant, la douleur est un phénomène complexe présentant des aspects sensoriel mais aussi affectif et cognitif, impliquant un grand nombre de structures supra-spinales qui constituent la « *pain matrix* ». Pratiquement aucune donnée sur le rôle du canal Cav3.2 dans le traitement supra-spinal des informations douloureuses n'existe actuellement. Nous avons entrepris de clarifier cette question grâce à un modèle murin : la lignée *knock-in* Cav3.2-eGFPflox (KI), chez laquelle le canal Cav3.2 peut être localisé, grâce à l'insertion d'une GFP dans une boucle extracellulaire, et spécifiquement délété par la Cre.

Nous avons dans un premier temps cartographié l'expression de ce canal dans les structures de la « *pain matrix* » par immunohistochimie. Outre le marquage observé dans les neurones du noyau réticulé du thalamus et dans certains neurones corticaux des aires insulaire, cingulaire antérieure et somatosensorielle, nous avons observé un marquage important dans le noyau prétectal antérieur (APN), presque exclusivement dans les neurones à parvalbumine (PV). L'APN est un carrefour de connectivité ascendante et descendante du système somatosensoriel et son implication dans la perception douloureuse est établie, bien que sa fonction exacte reste mal connue. Pour étudier l'impact du canal Cav3.2 exprimé dans l'APN sur la perception somatosensorielle basale et neuropathique, nous avons eu recours à des tests de sensibilité tactile thermique, et de motricité, avant et après lésion du nerf sciatique (SNI), chez des souris KI ayant subi une délétion du canal Cav3.2 dans cette région, par injection virale. Nous avons montré que cette délétion ne modifie pas la sensibilité basale mais réduit significativement le développement de l'allodynie mécanique induit par SNI. Un dimorphisme sexuel a été observé pour l'hyperalgie thermique, dont l'installation est atténuée uniquement chez les mâles. À l'aide de marquages antérogrades et rétrogrades, nous avons ensuite déterminé que les neurones PV de l'APN qui co-expriment en très grande majorité le canal Cav3.2, projettent non seulement vers le noyau thalamique postérieur et la zona incerta, mais envoient aussi des projections descendantes vers le bulbe rachidien. Ces résultats suggèrent que les réponses comportementales observées suite à la délétion du canal Cav3.2 dans l'APN pourraient mettre en jeu un contrôle descendant et/ou ascendant du traitement somatosensoriel. Grâce à des enregistrements en tranches complétés par une analyse de RT-PCR multiplex sur cellule unique, nous avons également établi que ces neurones PV de l'APN présentent un profil de décharge de type « *fast spiking* » et sont majoritairement GABAergiques. De plus, l'isoforme Cav3.2 est exclusivement exprimée dans cette population majoritaire de neurones GABAergiques où elle est fréquemment co-exprimée avec l'isoforme Cav3.1, voire Cav3.3, des canaux T.

L'ensemble de nos résultats suggère que l'APN exerce un contrôle inhibiteur ascendant et/ou descendant du système somatosensoriel. L'excitabilité de ce réseau inhibiteur dépendrait de façon critique de l'activité du canal calcique de type-T Cav3.2 lors de la mise en place et/ou du maintien de la douleur neuropathique.



## REMERCIEMENTS

---

Bien que la thèse soit souvent décrite comme une expérience douloureuse, ce ne fut pas le cas. Malgré les difficultés certaines, j'en ai apprécié chaque étape, et ce n'est pas seule que j'ai pu les surmonter. Cette expérience m'a appris que pour s'épanouir dans un projet professionnel, peu importe la thématique, seul l'entourage compte.

Je remercie le Dr. Hervé Chneiweiss de m'avoir accueillie au sein de l'unité Neurosciences Paris Seine pour me permettre de réaliser cette thèse.

Je remercie également les membres du jury d'avoir bien voulu examiner mon travail : Eric Lingueglia et Pierre Veinante en tant que rapporteur, ainsi qu'Emmanuel Bourinet, Ann Lohof et Sophie Pezet. Emmanuel, merci de m'avoir aussi accueillie au sein de ton équipe pour mon apprentissage des techniques comportementales et de m'avoir suivie pendant ces quelques années de collaborations, toujours avec enthousiasme. Merci également à Sophie Laffray et Antoine Fruquière pour le temps consacré à m'enseigner les tests de comportement et pour leur rigueur exemplaire. Merci également à Guillaume Ourties, Christophe Mallet et Alain Eschalier pour leurs avis, conseils et pour notre collaboration.

Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse, le Pr. Régis Lambert ainsi que le Dr. Nathalie Leresche de m'avoir accueillie au sein de leur équipe. Leur accompagnement quotidien et leur complémentarité furent indispensables à l'accomplissement de ce travail. Il ne me fallut que deux cours magistraux pour savoir que je souhaitais effectuer une thèse sous la direction de Régis. Je n'en fus pas déçue. Merci d'avoir constamment fait preuve d'optimisme, de patience, d'écoute et d'avoir su me canaliser (même si « c'est normal »). Nathalie, merci de m'avoir accordé ta confiance. Tu es toujours montrée disponible et de bon conseil, sans compter ton temps, tant sur la Science que sur le reste. Ton dévouement et ton attention furent pour moi un exemple et un très grand soutien.

Je souhaite également remercier tous les membres, passés et présents, de l'équipe RNRP. Merci à Thomas Bessaih de m'avoir encadrée pendant mon stage de master, pour nos longues et enrichissantes discussions et de m'avoir poussée avec persévérance à donner le meilleur de moi-même. Merci à Katia Boutourlinksy de m'avoir formée avec patience et bienveillance pendant mes débuts au laboratoire. Merci à Marco Diana et Eric Schwartz pour leur écoute attentive, leurs conseils et leur aide tout au long de notre collaboration. Merci à Sarah A.G. avec qui j'ai partagé plus qu'un bureau. Ta bonne humeur et ton écoute m'ont aidée à tenir dans les moments difficiles. Kasia, ton arrivée au labo fut une bouffée d'oxygène. Merci pour ta bonne humeur, pour ton oreille attentive et d'avoir pris soin de moi. Merci aussi à Maud pour ton passage parmi nous et pour l'intérêt que tu as témoigné envers ce projet. Merci enfin à Michaël, de m'avoir soutenue dès le master. J'ai énormément apprécié travailler avec toi sur ce premier projet et nos discussions scientifiques et personnelles m'ont beaucoup apporté.

Merci à Bruno et Benjamin de m'avoir initiée à la *single cell* et de vous être toujours montrés disponibles au cours de notre collaboration. Merci également à Coralie Fouquet de m'avoir appris la technique de clarification avec autant de soin et d'entrain. Merci à Marie-Laure Nieppon et Morgane Belle d'avoir pris tout le temps nécessaire pour m'aider dans les acquisitions et le post-traitement sur l'ultra-microscope de l'Institut de la Vision. Merci

également à Sylvia Soares, Fatiha Nothias et Stéphanie Daumas, qui m'ont permis d'ouvrir quelques verrous et de diversifier mon projet. Merci aux membres des plateformes d'animalerie, Odile Favière, Priscilla Roussel et Caroline Devanand ; d'imagerie : France Lam, Jean-François Gilles et Susanne Bolte ; et du service de gestion, notamment Tatiana Christine et Sylvie Faivre-Weber, qui m'ont accompagnée pendant ces quatre années et sans qui ce travail n'aurait pas été possible.

Merci également à tous les membres du laboratoire NPS : à Sylvie Faivre-Weber et à Bernadette Hanneke qui sont pour moi l'âme de ce laboratoire ; à Sandrine pour tes conseils et ta disponibilité malgré le peu de temps dont tu disposes ; merci à Juliette et Gabrielle, pour leur écoute et leur bonne humeur constante, merci au collègue Benjamin, merci à Sarah M. pour notre complicité, à Elise pour son *chill* rassurant, à Claire pour son dynamisme, à Pierre pour son écoute, à Steve parce que c'est Steve !, à Ludo et Régine, à tous les autres membres du B5. L'ambiance joyeuse et détendue que vous y imposez me manquera beaucoup. Merci aussi aux « collègues » des autres étages et du Master, Josquin, Anne-Claire, Julie, Maxime, Hervé, Cuong, Anna, Aurélie, Célia, et tous les autres.

Merci à Marie-Hélène et Philippe Justo qui m'ont suivie pendant plusieurs années et m'ont accueillie, une énième fois, chez eux pour les derniers instants de rédaction de ce manuscrit. Les « vacances studieuses » que vous m'avez offertes ont beaucoup allégé cette tâche.

Un merci particulier au *special crew*, Marie, Sibylle, Audrey, Astrid, Thibaut et Hugo. Vous avez toujours été là, m'avez soutenue et motivée au-delà même de cette thèse. Les bons moments passés avec vous, et ceux à venir, comptent beaucoup pour moi et m'ont énormément aidée pendant ces 4 ans.

Je remercie tout particulièrement mes parents. Merci de m'avoir écoutée, sans jamais tout comprendre, de m'avoir soutenue sans condition et de m'avoir apporté un foyer uni et rassurant. Ces remerciements sont bien insignifiants à côté de ma reconnaissance.

Merci également à ma grande sœur, Dominique, d'avoir été là malgré la distance. Tu as toujours été un exemple pour moi et j'espère être à la hauteur. Enfin, Robin, merci d'être toujours présent et de m'avoir supportée (dans tous les sens du terme) pendant 7 ans !

# TABLE DES MATIERES

---

<b>Résumé</b> .....	3
<b>Remerciements</b> .....	5
<b>Table des Matières</b> .....	7
<b>Table des Illustrations</b> .....	11
<b>Liste des tableaux</b> .....	13
<b>Liste des Abréviations</b> .....	15
<b>Préface</b> .....	19
<b>INTRODUCTION</b> .....	21
<i>Chapitre I : La Douleur Neuropathique</i> .....	23
1. Définitions : douleur aiguë, chronique et neuropathique .....	24
2. Physiologie de la douleur.....	26
2.1. Système nerveux nociceptif périphérique.....	28
2.2. Système nerveux nociceptif spinal.....	29
2.2.1. Organisation spinale des projections périphériques.....	29
2.2.1. Voies ascendantes sensorielles ódiscriminatives de la douleur .....	30
2.2.2. Voies ascendantes affectives-motivationnelles de la douleur .....	32
2.3. Système nerveux nociceptif supra-spinal .....	33
2.3.1. La « pain matrix » .....	33
2.3.2. Contrôle descendant de la douleur .....	35
3. Physiopathologie de la douleur neuropathique .....	37
3.1. Modèles de douleur neuropathique .....	38
3.2. Mécanismes de la neuropathie .....	40
3.2.1. Sensibilisation périphérique.....	40
3.2.2. Sensibilisation spinale .....	41
3.2.3. Modifications supra-spinales .....	42
3.3. Canaux ioniques et neuropathie .....	44
<i>Chapitre II : Les Canaux Calciques de Type T</i> .....	47
1. Découverte des canaux calciques de type T .....	48
2. Propriétés des canaux calciques de type T .....	50
2.1. Structure des canaux calciques de type T.....	50
2.2. Propriétés biophysiques des canaux calciques de type T.....	52

3.	Localisations et rôles physiologiques des canaux T.....	54
3.1.	Rôle des canaux T dans la décharge en bouffée .....	54
3.1.	Rôle des canaux T dans l'intégration dendritique .....	56
3.2.	Rôle des canaux T dans la libération synaptique dendritique et axonale .....	57
3.3.	Rôle des canaux T dans la décharge tonique .....	58
3.4.	Rôle des canaux T dans la plasticité à long-terme .....	59
4.	Rôle des canaux T dans la perception douloureuse.....	61
4.1.	Rôle des isoformes des canaux T dans la perception douloureuse .....	63
4.1.1.	Rôle du Cav3.2 dans la perception douloureuse.....	63
4.1.2.	Localisation des canaux Cav3.2 impliqués dans la perception douloureuse 65	
4.1.3.	Expression périphérique et spinale du canal Cav3.2.....	66
	<i>Chapitre III : Le Noyau Prétectal Antérieur</i> .....	69
1.	Organisation du prétectum.....	70
2.	Organisation du noyau prétectal antérieur .....	72
2.1.	Anatomie de l $\alpha$ APN .....	72
2.2.	Connectivité anatomique de l $\alpha$ APN.....	72
2.2.1.	Connexions anatomiques avec le système visuel et oculomoteur .....	73
2.2.2.	Connexions anatomiques avec le système somatosensoriel .....	74
2.2.3.	Autres connexions de l $\alpha$ APN avec des structures thalamiques et associées	75
2.3.	Connectivité fonctionnelle de l $\alpha$ APN .....	76
2.3.1.	Connectivité intra-cérébrale de l $\alpha$ APN .....	76
2.3.2.	Connectivité spinale de l $\alpha$ APN.....	78
3.	Rôle de l $\alpha$ APN dans la somesthésie et l $\alpha$ antinociception.....	79
3.1.	Découverte de l $\alpha$ implication de l $\alpha$ APN dans la nociception .....	79
3.2.	Rôle de l $\alpha$ APN dans la perception de la douleur aiguë.....	80
3.2.1.	Effet antinociceptif de la stimulation de l $\alpha$ APN.....	80
3.2.2.	Mécanismes de l $\alpha$ antinociception médiée par l $\alpha$ APN.....	82
3.2.3.	Voies de l $\alpha$ antinociception médiée par l $\alpha$ APN .....	82
3.3.	Rôle de l $\alpha$ APN dans la douleur chronique .....	85
3.3.1.	Modèles de douleur chronique et persistante.....	85
3.3.2.	Mécanismes et voies de l $\alpha$ anti-hyperalgie chronique médiée par l $\alpha$ APN ....	85
3.3.3.	Douleur neuropathique .....	87
	<b>Problématique</b> .....	89

<b>MATERIELS &amp; METHODES</b> .....	93
1. Modèles animaux .....	94
2. Immunohistochimie.....	96
2.1. Préparation des tranches .....	96
2.2. Marquages immunohistochimiques.....	96
2.3. Acquisition et quantification.....	96
3. Chirurgies.....	98
3.1. Injections stéréotaxiques.....	98
3.1.1. Injections pour tests comportementaux.....	98
3.1.2. Injections pour traçage de voies.....	99
3.2. Ligature du nerf sciatique .....	100
4. Tests comportementaux .....	102
4.1. Test de Von Frey .....	102
4.2. Test de Hargreaves .....	104
4.3. Test du Rotarod.....	104
4.4. Test du couloir circulaire .....	104
4.5. Statistiques .....	105
5. Electrophysiologie.....	106
5.1. Electrophysiologie <i>in vitro</i> .....	106
5.1.1. Préparation des tranches .....	106
5.1.2. Enregistrements intracellulaires.....	106
5.2. RT-PCR multiplex sur cellule unique .....	107
5.2.1. Conception des amorces .....	107
5.2.2. Préparation des tranches et enregistrements intracellulaires .....	108
5.2.3. Reverse transcription et PCR.....	109
<b>RESULTATS</b> .....	111
1. Expression du canal Cav3.2 et de la PV dans les neurones de $\delta$ APN. ....	112
2. Impact comportemental de la délétion du canal Cav3.2 dans $\delta$ APN.....	114
2.1. Impact de la délétion du canal Cav3.2 dans $\delta$ APN sur la sensibilité mécanique	114
2.2. Impact de la délétion du canal Cav3.2 de $\delta$ APN sur l'analgésie par le stress..	117
2.3. Impact de la délétion du canal Cav3.2 dans $\delta$ APN sur la sensibilité à la chaleur	118
2.4. Impact de la délétion du canal Cav3.2 dans $\delta$ APN sur la locomotion.....	120

3.	Structures cibles des neurones PV-positifs de $\text{l}\alpha\text{APN}$ .....	122
3.1.	Traçages antérogrades .....	122
3.2.	Traçages rétrogrades.....	126
4.	Caractérisation des neurones PV+ de $\text{l}\alpha\text{APN}$ .....	128
4.1.	Modèle PVcre-Ai14 .....	128
4.2.	Caractérisation moléculaire des neurones PV+ de $\text{l}\alpha\text{APN}$ .....	130
4.3.	Caractérisation électrophysiologique <i>in vitro</i> des neurones PV+ de $\text{l}\alpha\text{APN}$ ....	133
5.	Conclusion .....	139
<b>DISCUSSION</b> .....		141
1.	Localisation du canal Cav3.2 dans le cerveau .....	143
1.1.	Expression de Cav3.2 dans $\text{l}\alpha\text{APN}$ .....	143
1.1.1.	Données immunohistochimiques .....	144
1.1.2.	Données de RT-PCR multiplex sur cellule unique .....	145
1.2.	Expression de Cav3.2 dans le thalamus et le cortex .....	146
2.	Caractérisation des neurones PV+ de $\text{l}\alpha\text{APN}$ .....	148
2.1.	Projections anatomiques.....	148
2.1.1.	Projections descendantes .....	148
2.1.2.	Projections ascendantes.....	149
2.2.	Caractérisation électrophysiologique .....	150
2.2.1.	In vitro .....	150
3.	Rôle du canal Cav3.2 de $\text{l}\alpha\text{APN}$ dans la mise en place de la neuropathie .....	153
3.1.	Impact comportemental de la délétion du Cav3.2 de $\text{l}\alpha\text{APN}$ .....	153
3.2.	Impact du SNI sur $\text{l}\alpha$ excitabilité et $\text{l}\alpha$ activité de $\text{l}\alpha\text{APN}$ .....	154
3.3.	Contribution du Cav3.2 de $\text{l}\alpha\text{APN}$ .....	158
4.	Conclusion .....	160
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....		163
<b>Annexes</b> .....		189
<b>Projet 2</b> :.....		195
Connectivité Interlaminaire du Cortex Somatosensoriel Primaire chez le Rongeur.....		195

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

---

Figure 1   Sensibilisation à la douleur .....	24
Figure 2   Circuit général de la nociception (adapté de .....	27
Figure 3   Potentiel d'action composite enregistré dans les fibres sensorielles périphériques .	28
Figure 4   Organisation des terminaisons centrales de neurones afférents primaires.....	29
Figure 5   Voies sensorielles-discriminatives principales de la douleur.....	31
Figure 6   Voies affectives-motivationnelles de la douleur .....	32
Figure 7   Schéma non exhaustif des structures cérébrales recevant les afférences nociceptives spinales .....	34
Figure 8   Diagramme des différents modèles neuropathiques de lésion physique du nerf sciatique .....	38
Figure 9   Différents types de canaux calciques voltage dépendants classés selon l'homologie des séquences de la sous unité 1 .....	49
Figure 10   Organisation structurale des canaux calciques voltage-dépendants. Les canaux calciques sont tous constitués d'une sous-unité 1 (d'après Dolphin, 2006).....	51
Figure 11   Propriétés biophysique des canaux calciques de type T .....	53
Figure 12   Distribution des ARNm des isoformes des canaux T dans le cerveau, obtenue par hybridation in situ et observée en autoradiographie, sur trois niveau de tranches coronales de cerveau de rat .....	55
Figure 13   Expression du canal Cav3.2-GFP au niveau supra-spinal (données personnelles). .....	67
Figure 14   Organisation du complexe prétectal chez le rat.....	71
Figure 15   Diagramme de la connectivité entre le thalamus, la ZI et l'APN.....	77
Figure 16   Effets antinociceptifs de la stimulation électrique de l'APN .....	80
Figure 17   Effet de l'injection de glutamate dans l'APN sur la réponse comportementale en test de tail-flick.....	81
Figure 18   Diagramme récapitulatif des projections fonctionnelles caractérisées de l'APN, potentiellement impliquées dans le contrôle de la perception douloureuse.....	84
Figure 19   Description de la lignée KI-Cav3.2-eGFP <sup>flox</sup> .....	95
Figure 20   Méthode chirurgicale de ligature du nerf sciatique .....	101
Figure 21   Chronologie du paradigme expérimental mené sur les cohortes comportementales. BL : mesures basales .....	103
Figure 22   Expression de Cav3.2-GFP et de la PV parmi les neurones de l'APN.....	113
Figure 23   La délétion du canal Cav3.2 dans l'APN atténue l'allodynie mécanique.....	115

Figure 24   La délétion du canal Cav3.2 dans la région de l'APN n'a pas d'impact sur l'analgésie induite par le stress .....	117
Figure 25   La délétion du canal Cav3.2 dans la région de l'APN atténue significativement l'hyperalgie thermique à la chaleur chez les mâles mais pas chez les femelles. ....	119
Figure 26   La délétion du canal Cav3.2 dans l'APN n'a pas d'impact sur la coordination motrice ou la locomotion spontanée des souris.....	121
Figure 27   Projections ascendantes des neurones PV+ de l'APN chez des souris PV-Cre. ...	123
Figure 28   Projections descendantes des neurones PV+ de l'APN chez des souris PV-Cre. ....	125
Figure 29   Marquage rétrograde des neurones de l'APN projetant vers le PO et la ZI chez des souris KI.....	127
Figure 30   Expression de la TdTomato et de la PV dans les neurones de l'APN de souris double hétérozygotes issues du croisement PV-Cre x Ai14, observée en microscopie confocale .....	129
Figure 31   RT-PCR multiplex sur cellule unique.....	131
Figure 32   Propriétés électrophysiologiques des neurones PV+ de l'APN <i>in vitro</i> . ....	134
Figure 33   Effet de la lésion SNI sur l'activité des neurones de l'APN contralatérale. ....	155
Figure 34   Schéma des changements d'activité dans les différents types de neurones de l'APN dans le syndrome de douleur centrale.....	157

## ANNEXES

Expression du canal Cav3.2-GFP et de la PV dans le nRT et le cortex. ....	190
Expression du canal Cav3.2-GFP et de la PV dans l'APN de souris issues du croisement KI x PVcre. ....	192
Expression du canal Cav3.2-GFP et de la PV dans le nRT de souris issues du croisement KI x PVcre .....	194

## LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau 1   Liste des anesthésiques utilisés .....	97
Tableau 2   Liste des anticorps primaires utilisés.....	97
Tableau 3   Liste des anticorps secondaires utilisés. ....	97
Tableau 4   Forces théoriques et réelles appliquées par les filaments de Von Frey.....	103
Tableau 5   Séquences des amorces pour la 1 <sup>ère</sup> PCR d'amplification .....	108
Tableau 6   Séquences des amorces pour la 2 <sup>e</sup> PCR de détection .....	108
Tableau 7   Liste des produits utilisés.....	109
Tableau 8   Pourcentages moyens de neurones de l <sup>o</sup> APN exprimant la GFP et/ou la PV, obtenus par comptages cellulaires à partir de co-marquages anti-GFP, anti-PV, anti-NeuN chez des souris KI.....	112
Tableau 9   Valeurs p issues des tests de comparaison des PWT SNI avec l <sup>o</sup> ensemble des PWT BL.....	116
Tableau 10   Valeurs p issues des tests de comparaison entre les PWT KI et KO.....	116
Tableau 11   Valeurs p issues des tests de comparaison entre les PWT pré et post-stress .....	117
Tableau 12   Valeurs p issues des tests de comparaison entre les PWT KI et KO.....	117
Tableau 13   Valeurs p issues des tests de comparaison des latences en SNI avec l <sup>o</sup> ensemble des latences de BL.....	119
Tableau 14   Valeurs p issues des tests de comparaison des latences de réponse KI et KO...	119
Tableau 15   Valeurs p issues des tests de comparaison des temps passés sur le rotarod entre souris KI et KO. ....	121
Tableau 16   Valeurs p issues des tests de comparaison des nombres de quarts de tour effectués en 120min dans les cyclotrons, entre souris KI et KO .....	121
Tableau 17   Pourcentages moyens de neurones de l <sup>o</sup> APN exprimant la PV et/ou la TdTomato obtenus par comptage cellulaires à l <sup>o</sup> aide d <sup>o</sup> un marquage anti-PV chez les souris double hétérozygotes PV-Cre-Ai14.....	129
Tableau 18   Répartitions des transcrits des 3 isoformes des canaux T, sondés par scRT-PCR dans les 6 cellules TdTomato+ enregistrées où les transcrits PV et Vglut2 ont été détectés .	132
Tableau 19   Répartitions des transcrits des 3 isoformes des canaux T, sondés par scRT-PCR dans les 17 cellules TdTomato+ enregistrées où les transcrits PV et GAD65/67 ont été détectés .....	132
Tableau 20   Comparaison des paramètres moyens décrivant les propriétés électrophysiologiques des neurones TdTomato+ réguliers et <i>stutterings</i> enregistrés dans l <sup>o</sup> APN de souris PVcre-Ai14.....	136

Tableau 21   Adaptation de l'amplitude des PA et de la fréquence des ISI lors des salves de décharge intermittente des neurones TdTomato+ <i>stutterings</i> enregistrés dans l'APN. ....	138
Tableau 22   Paramètres décrivant l'émission des PA des neurones TdTomato+ <i>réguliers</i> et <i>stutterings</i> enregistrés dans l'APN. ....	138

## ANNEXES

Tableau A   Pourcentages moyens de neurones du nRT exprimant la GFP et/ou la PV, obtenus par comptages cellulaires à partir de co-marquages anti-GFP, anti-PV, anti-NeuN chez des souris KI.....	191
Tableau B   Pourcentages moyens de neurones de la couche GFP+ du cortex exprimant la GFP et/ou la PV, obtenus par comptages cellulaires à partir de co-marquages anti-GFP, anti-PV, anti-NeuN chez des souris KI.....	191
Pourcentages moyens de neurones de la couche GFP+ du cortex exprimant la GFP et/ou la PV chez des souris issues du croisement KIxPVcre, obtenus par comptages cellulaires à partir de co-marquages anti-GFP, anti-PV, anti-NeuN. ....	193

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

<b>AAV</b>	Adeno-Associated Virus
<b>ACC</b>	Cortex Cingulaire Antérieur
<b>ACSF</b>	Artificial Cerebro-Spinal Fluid
<b>ADN</b>	Acide DésoxyRiboNucléique
<b>ADNc</b>	ADN codant
<b>AHP</b>	<i>After-Hyperpolarization Potential</i>
<b>AIS</b>	<i>Axon Initial Segment</i> , segment initial de l'axone
<b>ALF</b>	Antero-Lateral Funiculus
<b>APN</b>	Anterior Pretectal Nucleus
<b>APNc</b>	Anterior Pretectal Nucleus pars compacta
<b>APNd</b>	Anterior Pretectal Nucleus, région dorsale
<b>APNr</b>	Anterior Pretectal Nucleus pars reticulata
<b>APNv</b>	Anterior Pretectal Nucleus, région ventrale
<b>ARN</b>	Acide RiboNucléique
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>ASIC</b>	Acid Sensing Ion Channels
<b>BL</b>	<i>Baseline</i> ou Basal
<b>CCI</b>	Chronic Constriction Injury
<b>CL</b>	Noyau intralaminaire centro-latéral du thalamus
<b>Cre</b>	Cyclic Recombinase
	Enzyme catalysant la recombinaison d'ADN entre deux sites LoxP
<b>ColSup</b>	Colliculi Supérieurs
<b>CPSE</b>	Courant Post-Synaptique Excitateur
<b>CPSI</b>	Courant Post-Synaptique Inhibiteur
<b>Da</b>	Daltons, unité de poids moléculaire, équivalent à 1g/mol
<b>Dk</b>	Noyau de Darkschewitsch
<b>D-APV</b>	Acide D-2-Amino-5-Phosphonopentanoïque
	Antagoniste des récepteurs au glutamate NMDA
<b>DLF</b>	Dorso-Lateral Funiculus
<b>DPH</b>	Décharge Post-Hyperpolarisation
<b>DpMe</b>	<i>Deep Mesencephalon</i> , noyaux profonds du mésencéphal
<b>DRG</b>	<i>Dorsal Root Ganglion</i>
<b>DRN</b>	Noyau du Raphé Dorsal
<b>eGFP</b>	GFP écliptique
<b>Eth</b>	Noyau Ethmoïde du thalamus
<b>EWN</b>	Noyau d'Edinger Westphal
<b>GABA</b>	Acide Gamma Amino-Butyrique, neurotransmetteur inhibiteur du SNC
<b>GAD65/67</b>	Décarboxylase de l'Acide Glutamique, isoformes de 65 et 67kDa
	Enzyme catalysant la décarboxylation du glutamate en GABA
<b>GFP</b>	<i>Green Fluorescent Protein</i>
<b>Gi</b>	Noyau gigantocellularis
<b>HCN</b>	<i>Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated channels</i>
	Canaux responsables du courant I <sub>h</sub>
<b>HRP</b>	<i>Horseradish Peroxidase</i>
<b>hSyn</b>	<i>human-Synapsin</i> , promoteur d'expression neuronale ubiquitaire
<b>IASP</b>	<i>International Association for the Study of Pain</i>
<b>InC</b>	Noyau Interstitiel de Cajal
<b>ISI</b>	<i>Inter-Spike Interval</i>
<b>JOR</b>	<i>Jaw-Opening Reflex</i>

<b>KI</b>	<i>Knock-In</i> , souris KI-Cav3.2-eGFPflox
<b>KO</b>	<i>Knock-Out</i>
<b>Lc</b>	Locus coeruleus
<b>LD</b>	Noyau latéro-dorsal du thalamus
<b>LP</b>	Noyau latéro-postérieur du thalamus
<b>LPGi</b>	Noyau ParaGigantocellularis Latéral
<b>LTMR</b>	<i>Low Threshold MechanoReceptors</i>
<b>LTS</b>	<i>Low Threshold calcium Spike</i> , potentiel calcique à bas seuil
<b>NMDA</b>	<i>N-Methyl-D-Aspartic</i> , agoniste des récepteurs glutamatergiques NMDA
<b>Má</b>	Méga-Ohm, unité de résistance électrique
<b>mM</b>	milli-molaire, unité de concentration d'une espèce chimique en solution
<b>mOsm</b>	milli-osmole, unité de pression osmotique des ions en solution
<b>MPT</b>	Noyau Prétectal Médian
<b>mV</b>	milli-Volts, unité de potentiel électrique des membranes neuronales
<b>NAc</b>	Noyau Accumbens
<b>NGF</b>	<i>Nerve Growth Factor</i>
<b>Ni<sup>2+</sup></b>	Nickel
<b>NOT</b>	Noyau du Tractus Optique
<b>NPY</b>	Neuropeptide Y, marqueur d'interneurones inhibiteurs dans le SNC
<b>NRM</b>	Nucleus Raphe Magnus
<b>nRT</b>	noyau Réticulé du Thalamus
<b>OPT</b>	Noyau Prétectal Olivaire
<b>PA</b>	Potentiel d'Action
<b>PAG</b>	Substance Grise Périaqueducale
<b>PB</b>	Noyau ParaBrachial
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Saline
<b>PBSGT</b>	PBS + Gélatine
<b>PC</b>	noyau intralaminaire ParaCentral du thalamus
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PFA</b>	Paraformaldéhyde
<b>PFC</b>	Cortex Préfrontal
<b>PGi</b>	Noyau ParaGigantocellularis
<b>PO</b>	Noyau Postérieur du thalamus
<b>POm</b>	Noyau Postéro-Médian du thalamus
<b>PoT</b>	Noyau Postérieur Triangulaire du thalamus
<b>PPR</b>	Régions Parabrachiale Pontine
<b>PPSE</b>	Potentiel Post-Synaptique Excitateur
<b>PPSI</b>	Potentiel Post-Synaptique Inhibiteur
<b>PPT</b>	Posterior Pretectal Nucleus
<b>PPTg</b>	Noyau pédonculopontin tegmental
<b>PSNL</b>	Partial Spinal Nerve Ligation
<b>PV / PValb</b>	Parvalbumine
<b>PWT</b>	<i>Paw Withdrawal Threshold</i> Poids appliqué auquel il y a 50% de chances que l'animal retire sa patte
<b>RNase</b>	Ribonucléase Enzyme catalysant la dégradation de l'ARN en ribonucléotides
<b>RT-PCR</b>	<i>Reverse Transcriptase PCR</i> , transcription inverse suivie d'une PCR
<b>RtTg</b>	noyau Réticulo-Tegmental pontin
<b>RVM</b>	<i>Rostro-Ventral Medulla</i> , région rostro-ventrale du bulbe rachidien
<b>S1</b>	Cortex somatosensoriel primaire
<b>S2</b>	Cortex somatosensoriel secondaire
<b>SEM</b>	Erreur Standard à la Moyenne

<b>scRT-PCR</b>	<i>Single Cell RT-PCR</i>
<b>SNC</b>	Système Nerveux Central
<b>SNI</b>	<i>Spared Nerve Injury</i>
<b>SNL</b>	<i>Spinal Nerve Ligation</i>
<b>SNP</b>	Système Nerveux Périphérique
<b>SOM</b>	Somatostatine
<b>SP5</b>	Noyau sensoriel trigéminal 5
<b>TBS</b>	Tris Buffer Saline
<b>TBSTD</b>	Solution de perméabilisation et saturation contenant : TBS + Triton100X + Tween20 + Donkey Serum
<b>TC</b>	neurones Thalamo-Corticaux
<b>TTA-A2/P2</b>	Antagonistes spécifiques des canaux calciques de type T
<b>Vglut2</b>	Vesicular Glucose Transporter 2
<b>VIP</b>	Vasointestinal Peptide
<b>vLGN</b>	Corps Genouillé Latéral ventral
<b>vZI</b>	Zona Incerta ventrale
<b>VLM</b>	<i>Ventro-Lateral Medulla</i> , région ventro-latérale du bulbe rachidien
<b>VPL</b>	noyau Ventro-Postérieur Latéral du Thalamus
<b>VPM</b>	noyau Ventro-Postérieur Médian du Thalamus
<b>WGA-HRP</b>	Wheat-Germ Agglutinin HRP
<b>WMW</b>	test de Wilcoxon-Mann-Whitney
<b>WT</b>	<i>Wild Type</i>
<b>ZI</b>	Zona Incerta



## PREFACE

---

Ce manuscrit est consacré aux travaux qui ont constitué l'axe central de ma thèse, portant sur le rôle des canaux calciques de type T dans la douleur chronique. La douleur est un signal d'alarme essentiel au maintien de l'intégrité physique des individus. Des dérégulations des voies et mécanismes mis en jeu dans la perception douloureuse peuvent engendrer une altération de ce signal, menant sur le long-terme à des douleurs dites chroniques. Ces dernières constituent un défi majeur de par leur diversité, leur prévalence et le manque de solutions thérapeutiques adaptées. De plus, bien que les mécanismes sur lesquelles reposent ces pathologies douloureuses commencent à être élucidés, il reste encore beaucoup à découvrir. Parmi les cibles thérapeutiques potentiellement intéressantes, les canaux calciques de type T sont de bons candidats car ils sont exprimés tout au long des voies somatosensorielles et sont susceptibles d'affecter l'excitabilité cellulaire.

L'expérience de notre équipe dans l'étude du rôle de ces canaux dans le système nerveux central a motivé le développement d'une collaboration avec l'équipe d'Emmanuel Bourinet (Equipe : Dynamique Cellulaire des Canaux Calciques et Nociception, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier) visant à déterminer le rôle des canaux calciques de type T dans les circuits de la douleur neuropathique. Mon travail de thèse s'est inscrit dans cette collaboration et porte donc sur le rôle des canaux T exprimés au niveau supra-spinal dans la douleur neuropathique. Ce dernier est encore en préparation et fera l'objet d'une ou plusieurs publications.

Cependant, le début de mon travail de thèse a été consacré à l'achèvement de mon projet de Master 2 portant sur la connectivité interlaminaire corticale. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dont je suis seconde auteure (Quiquempoix et al., 2018). Ils sont brièvement présentés ci-dessous et figurent également en annexe à la fin de ce manuscrit. Chez les mammifères, la perception sensorielle consciente repose sur la coordination de l'activité des neurones corticaux. Le cortex est organisé en six couches à travers lesquelles l'information sensorielle, relayée depuis la périphérie par le thalamus, serait traitée de manière sérielle, selon un modèle canonique proposé en 1979. Ce traitement s'opèrerait depuis la couche granulaire (IV) vers les couches superficielles (II/III), puis vers les couches profondes (V/VI) constituant la sortie du cortex. Or le rôle de la connexion entre les couches superficielles et les couches profondes dans la perception sensorielle a récemment été remis en cause par des études soulignant l'importance des afférences directes du thalamus sur les couches profondes du cortex dans la réponse corticale à une stimulation sensorielle.

Mon travail, a donc consisté en l'étude *in vitro* de la connectivité fonctionnelle entre les couches superficielles et profondes du cortex à tonneaux de souris. Pour ce faire, j'ai eu recours à la manipulation optogénétique de l'activité des neurones des couches superficielles combinée à des enregistrements électrophysiologiques sur des tranches de cortex somatosensoriel. Mes résultats associés à ceux obtenus *in vivo* au sein de l'équipe ont permis de démontrer que l'activité des neurones des couches superficielles contrôle le gain des neurones des couches profondes.

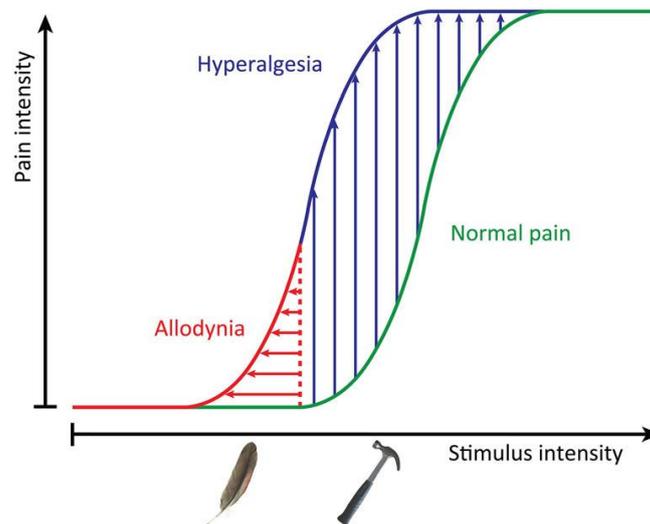
# **INTRODUCTION**



**CHAPITRE I :**  
**LA DOULEUR NEUROPATHIQUE**

## 1. Définitions : douleur aiguë, chronique et neuropathique

Selon l'International Association for the Study of Pain (IASP), la douleur est « une expérience sensorielle ou émotionnelle déplaisante associée à un dommage tissulaire concret ou potentiel, ou décrit comme tel ». Cette définition, adaptée de Merskey, 1986, suggère que la douleur est une expérience subjective qui n'est pas forcément associée à un stimulus externe. Par ailleurs, le terme « douleur » ne désigne pas l'activité nerveuse induite par un stimulus nociceptif, mais un état psychologique résultant de l'expérience de ce stimulus, associant les perceptions physique et émotionnelle de ce dernier. Les sensations douloureuses aiguës sont des signaux d'alarme censés préserver l'intégrité physique des individus. En cas de lésion tissulaire, une sensibilisation à la douleur survient dans la zone atteinte qui se traduit par un décalage des seuils de douleur. Ce phénomène peut ainsi provoquer une augmentation de la réponse douloureuse aux stimuli nociceptifs, correspondant à une hyperalgie, voire une douleur déclenchée par des stimuli normalement non nociceptifs, comme le toucher léger, correspondant à une allodynie (Figure 1, Lolignier et al., 2014).



**Figure 1 | Sensibilisation à la douleur (d'après Lolignier et al., 2014).**

L'intensité de la douleur augmente avec l'intensité du stimulus. Cette relation est représentée par une courbe sigmoïde. Dans un état douloureux, les seuils de sensibilité à la douleur sont décalés vers des intensités de stimulation inférieures, de sorte que des stimuli nociceptifs deviennent plus douloureux que la normale (hyperalgie) et que des stimuli non nociceptifs deviennent douloureux (allodynie).

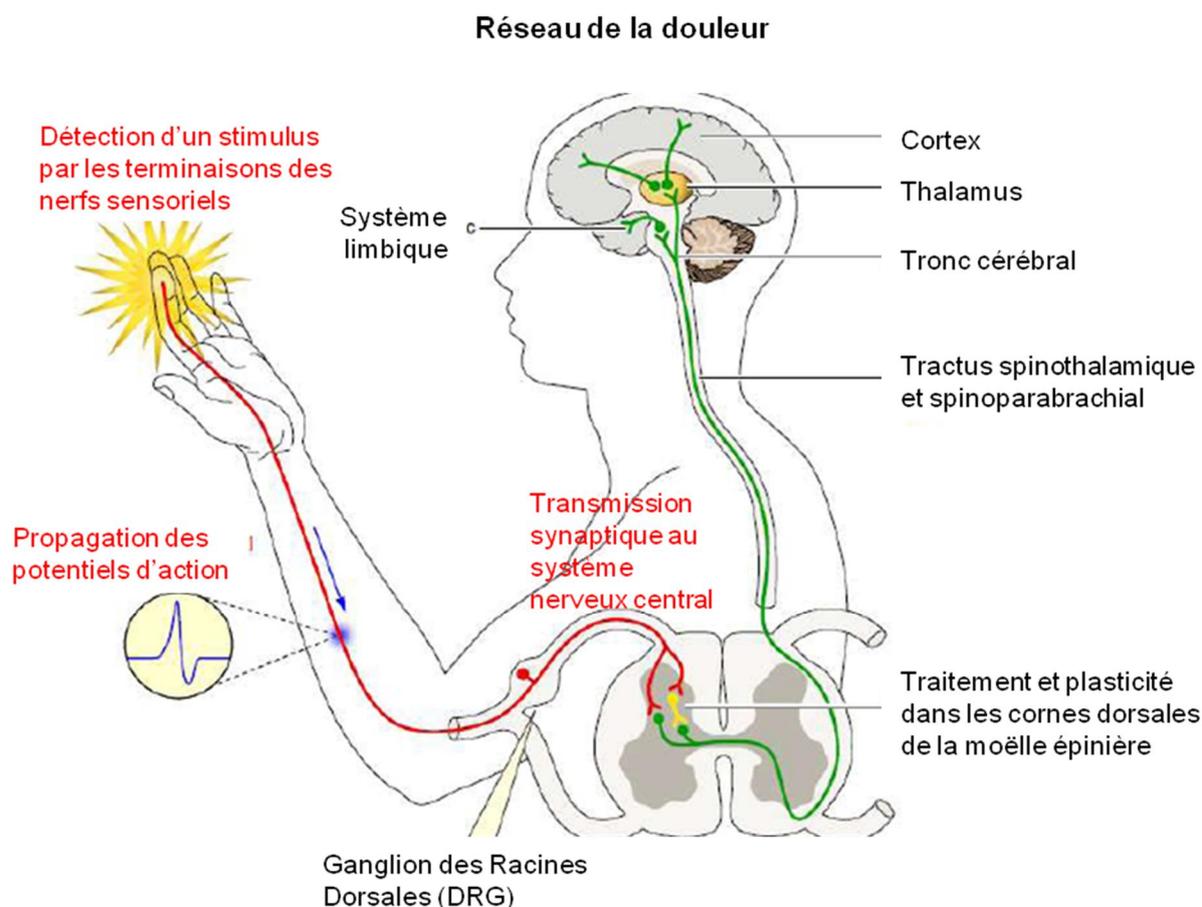
Cette douleur aiguë est essentielle à la protection de tissus lésés, en vue de leur guérison. Dans des cas extrêmes, la sensibilisation à la douleur peut persister au-delà du nécessaire. Des douleurs intenses, évoquées ou spontanées, purement délétères, peuvent alors survenir et même freiner le rétablissement. On parle alors de douleur persistante. Lorsque celle-ci perdure après le rétablissement de la lésion, il s'agit d'une douleur chronique, dont plusieurs types peuvent être définis en fonction de leur origine ou de leur symptomatologie. Les définitions et classifications évoluant rapidement, nous n'allons pas les détailler ici et porterons notre attention sur les douleurs chroniques de type neuropathique.

La douleur neuropathique a d'abord été définie par l'IASP, en 1994, comme étant une « *douleur initiée ou causée par une lésion ou un dysfonctionnement du système nerveux* ». En 2008, une nouvelle définition précise que la douleur neuropathique est liée à une lésion du système nerveux somatosensoriel, la distinguant de la douleur nociceptive issue de troubles neurologiques suite à une plasticité du système nociceptif (Treede et al., 2008). Aujourd'hui, l'IASP définit donc la douleur neuropathique comme une « *douleur causée par une lésion ou une maladie du système nerveux somatosensoriel* » (Jensen et al., 2011). Elle représenterait 21.7% des douleurs chroniques, atteignant donc plus de 300 millions d'individus dans le monde (Bouhassira et al., 2008). Cependant, les réponses thérapeutiques sont aujourd'hui insuffisantes. En effet, les analgésiques prescrits ont des effets trop faibles ou présentent des effets secondaires à risque lors d'une utilisation prolongée (Edlund et al., 2014; Nolano et al., 1999; Van Seventer et al., 2010). Il est donc nécessaire de mieux définir les mécanismes des douleurs neuropathiques pour trouver de nouvelles cibles thérapeutiques, afin de répondre à cet enjeu majeur de santé publique (Breivik et al., 2006).

### 2. Physiologie de la douleur

Avicenne (980-1037 après J.-C.) a remarqué la dissociation entre la perception de la douleur et celles du toucher et de la température, ce qui suggérait que la douleur était une sensation indépendante des autres. Pendant très longtemps, on ne savait pas si la douleur résultait de l'activité d'un système neural dédié ou non, principalement de par la difficulté à enregistrer les fibres sensorielles de petit diamètre. Leur enregistrement dans les années 50 à 60 montra leur activation par des stimuli douloureux et fut la première preuve d'un système nociceptif spécifique (Iggo, 1959, 1960; Perl, 2007). En 1968, un modèle tripartite fut proposé, consistant en une composante sensorielle-discriminative, une composante affective-motivationale, et une composante cognitive-évaluative de la douleur (Melzack, 1968). Celles-ci seraient traitées en partie indépendamment et en partie via des voies interactives. Aujourd'hui, on distingue en effet une voie sensorielle-discriminative, informant sur la localisation, l'intensité et la qualité du stimulus nociceptif, et une voie affective-motivationale informant sur sa nature déplaisante. Les substrats de la composante cognitive-évaluative de la douleur sont encore peu définis.

Les stimuli douloureux subissent un processus neural d'encodage appelé « nociception ». Ce processus ne résulte pas de la stimulation excessive de récepteurs sensoriels mais repose sur un système spécifique qui s'étend des récepteurs présents à la périphérie, aux centres cérébraux de la nociception (Figure 2). Les neurones sensoriels primaires du système nerveux périphérique (SNP), capables de détecter les stimuli nociceptifs et de les transmettre au système nerveux central (SNC), sont appelés nocicepteurs. Ces neurones de premier ordre projettent dans les cornes dorsales de la moëlle épinière où ils contactent les neurones de second ordre. Un premier traitement spinal de l'information nociceptive s'effectue dans le circuit complexe de la moëlle épinière. Puis les neurones spinaux de projection acheminent l'information vers les structures supra-spinales via des voies ascendantes. Les centres supra-spinaux formant la « *pain matrix* » intègrent cette information pour générer la perception consciente de la douleur. Certaines de ces structures, notamment dans le tronc cérébral, sont capables de moduler positivement ou négativement les afférences sensorielles périphériques et spinales par des voies descendantes.

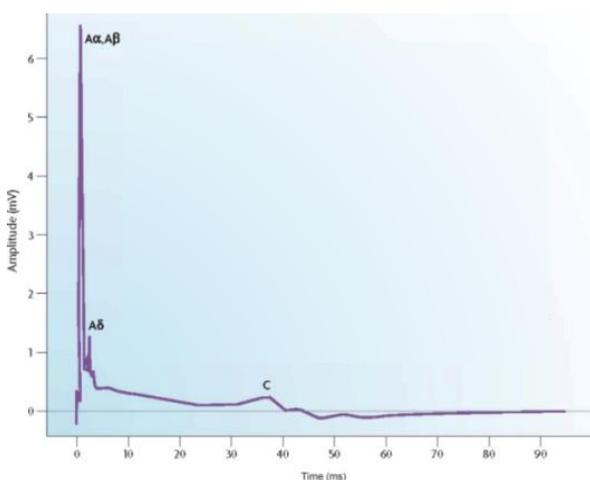


**Figure 2 | Circuit général de la nociception (adapté de Bourinet et al., 2014).**

Les nocicepteurs du système nerveux périphérique (SNP) détectent un stimulus nociceptif et le transduisent en potentiels d'action (PA). L'information nociceptive est ainsi transmise au système nerveux central (SNC) par les fibres afférentes primaires des nocicepteurs via les ganglions des racines dorsales (DRG, ou les ganglions trigéminaux pour les innervations de la face). Les neurones des DRG contactent au niveau spinal des interneurons (jaune) et des neurones de projection (vert) constituant un circuit complexe. Un premier traitement de l'information nociceptive se produit donc au niveau spinal avant que celle-ci ne soit transmise par des voies ascendantes aux différentes structures supra-spinales qui constituent la « *pain matrix* » (cf Chapitre I § 2.4.), où est intégrée l'information produisant la perception de la douleur.

## 2.1. Système nerveux nociceptif périphérique

Les nocicepteurs sont des neurones bipolaires dont les corps cellulaires sont localisés dans les ganglions DRG, pour ceux innervant le corps, ou dans les ganglions trigéminaux, pour ceux innervant la face. Ils émettent un axone vers la périphérie innervant les territoires cutanés ou les organes internes, et un axone vers la moëlle épinière. Ces nocicepteurs peuvent être activés par des stimuli mécaniques, thermiques et chimiques via des canaux ioniques spécifiques, mécanosensibles, thermosensibles ou chimiosensibles respectivement. Il existe une grande diversité de nocicepteurs, témoignant de la complexité de la nociception. Une tentative de classement selon leur profil transcriptomique s'est révélée être corrélée avec les modalités sensorielles qu'ils traitent (Usoskin et al., 2014). Par ailleurs, les terminaisons nerveuses de ces neurones sensoriels primaires sont classées selon le degré de myélinisation de l'axone, son diamètre et, par conséquent, sa vitesse de conduction (Gasser and Erlanger, 1927). Les terminaisons des nocicepteurs correspondent à des fibres de petit ou moyen diamètre, A (2 à 6µm) peu myélinisées et C (0.4 à 1.2µm) non myélinisées, en comparaison aux larges fibres myélinisées non nociceptives A (>10µm). Leur vitesse de conduction est relativement lente (12 à 30m/s pour les fibres A et 0.5 à 2m/s pour les fibres C) par rapport aux fibres purement sensorielles A (30 à 100m/s, Figure 3). Ces différentes vitesses de conduction provoquent une « double sensation » de douleur, avec une première phase, aiguë et intense, due à l'activité des fibres A, et une seconde phase, tardive et diffuse, due à l'activité des fibres C (Julius and Basbaum, 2001; Lewis and Pochin, 1937; Perl, 2007).



**Figure 3 | Potentiel d'action composite enregistré dans les fibres sensorielles périphériques (adapté de Perl, 2007).**

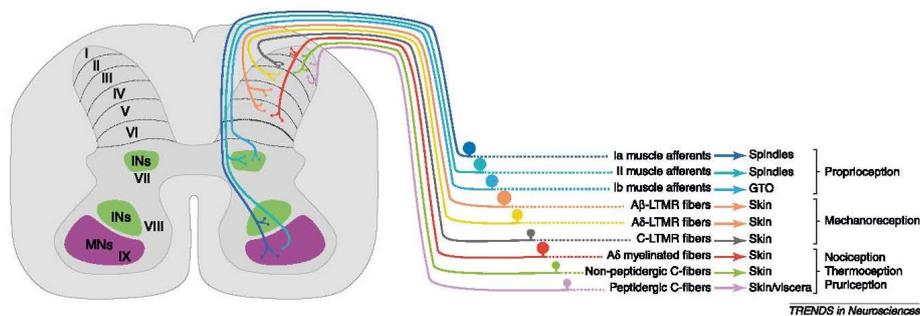
La stimulation électrique d'une fibre nerveuse périphérique évoque une série de variations de potentiel composant la trace violette. Les différents pics identifiés correspondent à l'activité de fibres conduisant plus ou moins rapidement l'information jusqu'au point d'enregistrement, en fonction de leur diamètre ou de leur degré de myélinisation. Les fibres sensorielles A et A plus larges et plus myélinisées sont celles qui conduisent l'information le plus rapidement (1<sup>er</sup> pic) ; les fibres nociceptives A, peu myélinisées, et C, non myélinisées, correspondent respectivement aux 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> pics.

Cependant, toutes les fibres A et C ne sont pas des fibres nociceptives. En effet, des fibres mécanosensorielles à bas seuil d'activation, les A-LTMR et C-LTMR existent également (LTMR : *Low Threshold MechanoReceptors*). De plus, les rôles de ces divers nocicepteurs dans la perception modalité-spécifique et dans la transduction du signal douloureux vers la moëlle épinière ne sont pas encore complètement élucidés, et l'identité des mécano-transducteurs nociceptifs n'est pas encore définie (Peirs and Seal, 2016)

## 2.2. Système nerveux nociceptif spinal

### 2.2.1. Organisation spinale des projections périphériques

La substance grise des cornes dorsales se divise en 6 couches, appelées *laminae* de Rexed, organisées dans l'axe dorso-ventral et qui se distinguent par leur densité de cellules (Rexed, 1952, Figure 4). Les différents types de fibres nociceptives qui contactent les neurones spinaux peuvent être distingués selon les couches dans lesquelles elles projettent. Les fibres A projettent vers les couches superficielles (I et II) et profonde (V), tandis que les fibres C projettent uniquement dans les couches I et II (Abraira et al., 2017; Todd, 2010). La grande diversité des neurones et interneurons spinaux constitue un circuit complexe, qui ne sera pas décrit ici, et qui opère un premier traitement de l'information nociceptive avant son ascension vers les centres supra-spinaux. Cependant, la contribution de ce circuit au codage modalité-spécifique de la douleur est encore peu comprise (Peirs and Seal, 2016).



**Figure 4 | Organisation des terminaisons centrales de neurones afférents primaires (d'après Lallemand and Ernfors, 2012).**

Les cornes dorsales de la moëlle épinière sont divisées en 6 couches : I (plus superficielle) à VI (plus profonde) recevant des afférences de fibres sensorielles primaires différentes. Les fibres nociceptives A innervent les couches I et V, tandis que les fibres C innervent les couches I et II. Les fibres mécanosensorielles A-LTMR, A-LTMR et C-LTMR innervent les territoires cutanés, projettent vers les couches II à V. Les cornes ventrales sont constituées de 3 couches (VII à IX, plus ventrale). Les fibres proprioceptives I et II innervant les fuseaux musculaires projettent dans ces cornes ventrales où elles contactent les motoneurones de la couche IX ou les interneurons des couches VII et VIII.

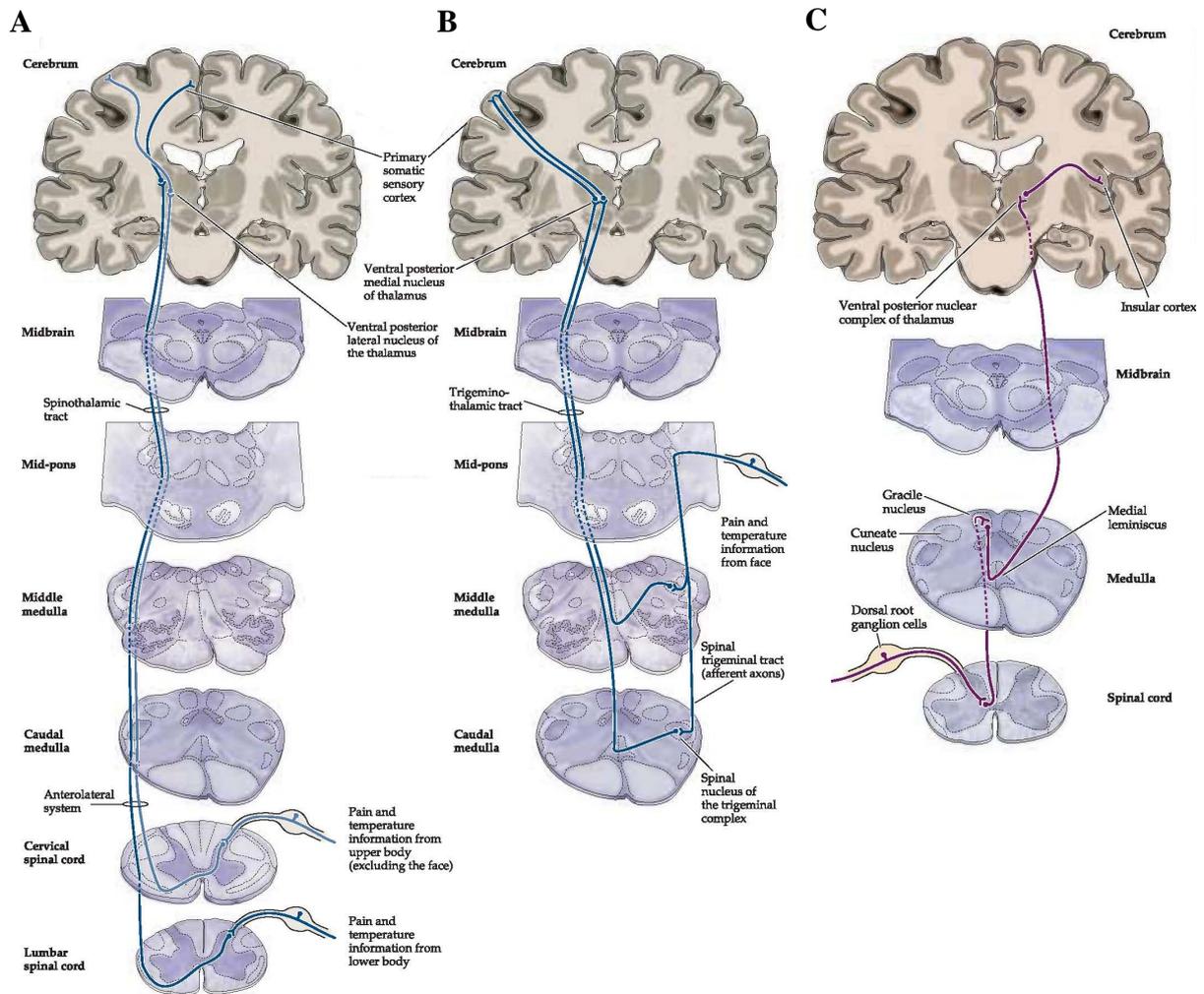
INs : interneurons ; MNs : motoneurones

Deux voies centrales de la douleur ont été décrites, correspondant à deux composantes de la sensation douloureuse : une voie sensorielle-discriminative informant sur la localisation, l'intensité et la qualité du stimulus, reposant sur des circuits ciblant le cortex somatosensoriel, et une voie affective-motivationnelle informant sur la nature déplaisante du stimulus et activant le système autonome (*fight or flight response*), reposant sur des circuits additionnels vers le cortex et le tronc cérébral. Ces voies seront brièvement décrites ci-dessous.

### 2.2.1. Voies ascendantes sensorielles discriminatives de la douleur

Les neurones spinaux de projection envoient des axones croisant la ligne médiane vers le quadrant ventrolatéral contralatéral de la moëlle épinière. Ces projections empruntent le système antérolatéral, remontant jusqu'au thalamus via le tractus spino-thalamique situé dans la substance blanche. Il s'agit de la voie ascendante majeure des informations douloureuses mécaniques et thermiques en provenance de tout le corps, projetant essentiellement sur le noyau ventro-postérieur latéral (VPL) thalamique (Figure 5A). Les informations mécanosensorielles et nociceptives mécaniques et thermiques émanant de la face empruntent une voie différente. Les axones de premier ordre issus des ganglions trigéminaux et associés aux nerfs crâniens projettent vers le tronc cérébral, dans le pont puis descendent dans le bulbe rachidien. Cette voie correspond au tractus spinal-trigéminal qui se termine dans les noyaux trigéminaux interpolaris et caudalis. Les axones de second ordre croisent la ligne médiane au niveau du bulbe rachidien pour atteindre le thalamus contralatéral, via le tractus trigémino-thalamique projetant sur le VPM (Figure 5B). Le VPM et VPL projettent à leur tour vers les aires somatosensorielles pour générer une perception sensorielle-discriminative de la douleur.

Les informations nociceptives en provenance des organes internes empruntent la voie des colonnes dorsales, de la même façon que les informations mécanosensorielles et proprioceptives non douloureuses. Les neurones spinaux de projection ciblent le noyau gris intermédiaire (organes abdominaux) ou gracile (organes thoraciques) au niveau du bulbe rachidien pour emprunter le lemnisque médian jusqu'au thalamus puis vers le cortex insulaire (Figure 5C, Purves et al., 2004).



**Figure 5 | Voies sensorielles-discriminatives principales de la douleur (d'après Purves et al., 2004).**

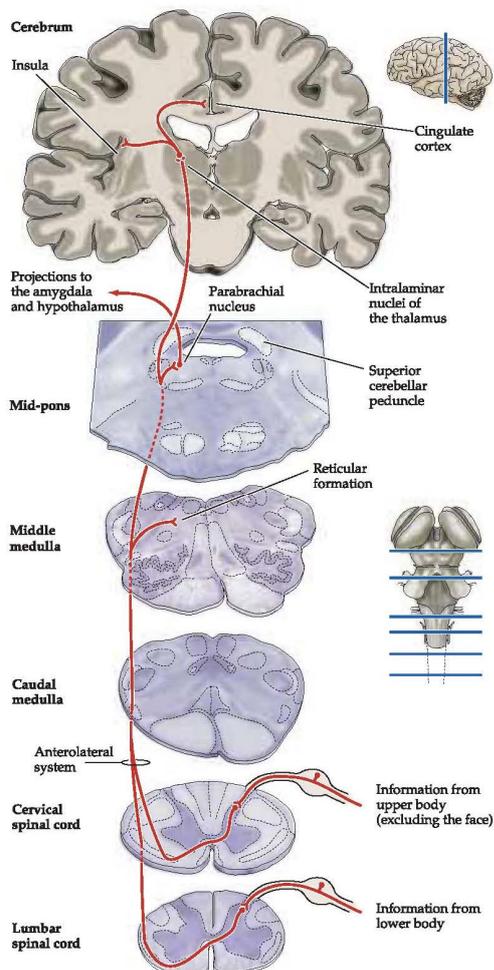
(A) Voie sensorielle-discriminative des afférences nociceptives issues du corps, correspondant au tractus spino-thalamique du système antérolatéral, qui s'étend des différents segments de la moëlle épinière au noyau thalamique VPL, traitant les informations somatosensorielles issues du corps, envoyées vers les aires corticales somatosensorielles.

(B) Voie sensorielle-discriminative des afférences nociceptives issues de la face, correspondant aux tractus spino-trigéminal, traversant le pont et relayée dans les noyaux trigéminaux du bulbe rachidien par le tractus trigémino-thalamique atteignant le noyau thalamique VPM traitant les informations sensorielles en provenance de la face, projetant ensuite vers les aires corticales somatosensorielles.

(C) Voie sensorielle-discriminative de la douleur viscérale empruntant la voie des colonnes dorsales vers le noyau gracile puis du lemnisque médian pour atteindre le noyau thalamique VPL et le cortex insulaire.

## 2.2.2. Voies ascendantes affectives-motivationnelles de la douleur

Les voies douloureuses affectives passent également par le système antérolatéral. Cependant, les cibles des neurones de second ordre sont différentes puisqu'ils projettent d'une part vers le noyau parabrachial (PB), via le tractus spino-parabrachial, projetant ensuite vers l'hypothalamus et l'amygdale, et d'autre part vers la formation réticulée, via le tractus spino-réticulaire. Cette dernière projette à son tour vers les noyaux thalamiques intralaminaires et VPM, qui communiquent avec les aires corticales insulaire et cingulaire. Ces cibles permettent la construction d'une perception émotionnelle de la douleur. (Figure 6, Purves et al., 2004). D'autres projections spinales y participent, empruntant les systèmes antérolatéral ou dorsolatéral, et ciblant la substance grise péri-aqueducule (PAG), via le tractus spino-mésencéphalique, initiant des contrôles descendants de la douleur, ou encore l'hypothalamus, via le tractus spino-hypothalamique envoyant plusieurs collatérales vers le noyau rouge, les colliculi supérieurs, la substance noire ou encore les ganglions de la base.



**Figure 6 | Voies affectives-motivationnelles de la douleur (d'après Purves et al., 2004).**

Les neurones de projection impliqués dans les voies affectives-émotionnelles de la douleur empruntent le système antérolatéral (ou dorsolatéral ne figurant pas ici) et projettent essentiellement vers des structures pontines et vers les noyaux thalamiques intralaminaires.

### 2.3. Système nerveux nociceptif supra-spinal

#### 2.3.1. La « pain matrix »

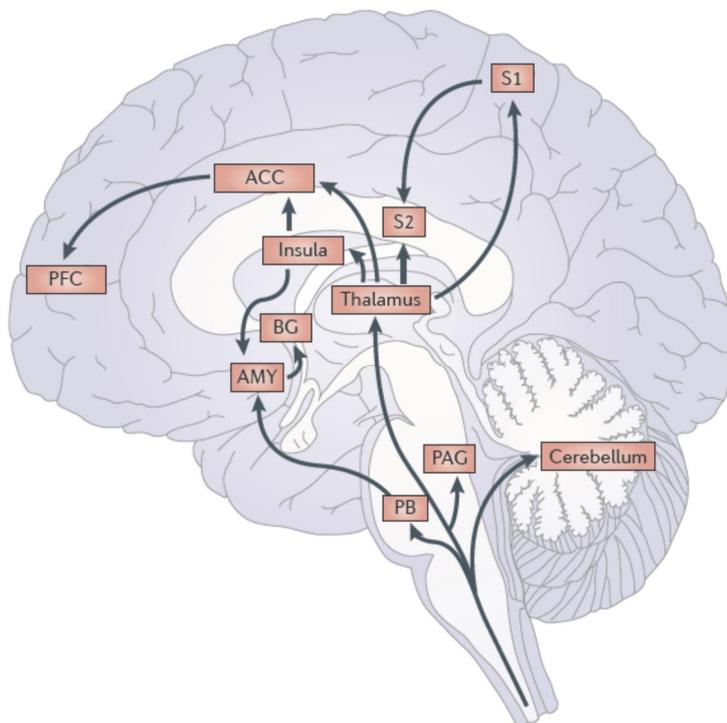
L'imagerie fonctionnelle du cerveau humain a montré que les stimuli nociceptifs activent conjointement un large réseau de structures corticales et sous-corticales incluant des régions sensorielles, limbiques et associatives, constituant ce qu'on appelle la « pain matrix » (Garcia-Larrea and Magnin, 2008; Mouraux et al., 2011, Figure 7). Les régions communément activées par ces stimuli sont les aires somatosensorielles primaires (S1) et secondaires (S2), l'insula, le cortex cingulaire antérieur (ACC), le cortex préfrontal (PFC), le thalamus et le cervelet (Apkarian et al., 2005; Bushnell et al., 2013). D'autres régions ont également été identifiées anatomiquement et par enregistrements électrophysiologiques comme recevant des afférences nociceptives, confirmées par imagerie fonctionnelle : le noyau accumbens (NAc) et l'amygdale recevant des afférences via le tractus spino-parabrachial, ainsi que la PAG recevant des afférences via le tractus spino-mésencéphalique, ou encore le locus coeruleus (Lc) et la région rostro-ventrale du bulbe rachidien (RVM, Basbaum and Fields, 1984; Helmstetter et al., 1998; Apkarian et al., 2011). Ces régions encodent les différentes dimensions douloureuses.

Ainsi, les aires corticales somatosensorielles S1 et S2 recevant des afférences des noyaux thalamiques VPM et VPL encodent les aspects sensoriels-discriminatifs de la douleur tels que sa localisation ou sa durée (Kenshalo et al., 1988; Treede et al., 1999). L'ACC et l'insula recevant des afférences des noyaux thalamiques intralaminaires encoderaient les aspects émotionnels et motivationnels de la douleur (Sellmeijer et al., 2018; Treede et al., 1999). L'insula semble cependant également impliquée dans la perception sensorielle-discriminative de la douleur. Des substrats des voies sensorielles-discriminatives et affectives-motivationnelles de la perception douloureuse aiguë ont ainsi été décrits aux niveaux périphérique, spinal et supra-spinal. Cependant, la voie cognitive-évaluative est encore indéterminée.

Il est à noter que les réseaux de la « pain matrix » ne sont pas exclusivement dédiés au traitement des informations douloureuses puisqu'ils peuvent être activés par d'autres stimuli, somatosensoriels, auditifs ou visuels, en l'absence de stimuli nociceptifs (Mouraux et al., 2011). Certains auteurs considèrent donc que la notion de « pain matrix » correspondrait plutôt à des profils complexes d'activation neuronale au sein de ces réseaux, pouvant ainsi

constituer un marqueur objectif de perception douloureuse. Il n'existe cependant pas de consensus sur la définition de la « *pain matrix* », ce qui témoigne de l'état précoce de nos connaissances sur la nociception, notamment au niveau supra-spinal (Garcia-Larrea and Bastuji, 2018; Garcia-Larrea and Peyron, 2013; Legrain et al., 2011). De plus, certaines structures impliquées dans la nociception ne font pas partie des voies décrites.

Parmi celles-ci, le Noyau Prétectal Antérieur (APN) a été étudié dans les années 80. Son implication dans la nociception a été établie, bien que son rôle exact soit encore indéfini (cf Chapitre III). Pourtant, cette structure n'est jamais mentionnée dans la description de la « *pain matrix* » et très rarement dans les études récentes sur la nociception. Ceci provient probablement du fait que l'activité de l'APN chez l'Humain est totalement inconnue. Des travaux réalisés chez le rat suggèrent que les effets analgésiques de la stimulation de l'APN reposeraient, au moins en partie, sur des projections descendantes impactant l'intégration spinale des stimuli nociceptifs. En effet, les structures supra-spinales permettent non seulement l'intégration des stimuli nociceptifs pour générer la perception douloureuse mais activent également des mécanismes descendants de modulation de la nociception.



**Figure 7 | Schéma non exhaustif des structures cérébrales recevant les afférences nociceptives spinales (d'après Bushnell et al., 2013).** Les informations nociceptives en provenance du tractus spino-thalamique (voie sensorielle-discriminative) atteignent le thalamus et projettent vers les aires corticales somatosensorielles primaire (S1) et secondaire (S2). Les informations nociceptives issues de la voie affective-motivationale de la douleur atteignent des structures du tronc cérébral, telles que le PB et la

PAG, ainsi que l'amygdale (AMY) et les ganglions de la base (BG). Les aires corticales insulaire, cingulaire antérieure (ACC) et préfrontale (PFC) reçoivent ensuite des afférences de ces différentes aires cérébrales et sont communément associées aux aspects émotionnels et affectifs de la sensation douloureuse.

### 2.3.2. Contrôle descendant de la douleur

La transmission nociceptive est modulée par des fibres descendantes issues de différentes régions de la « *pain matrix* » décrites ci-dessus, et qui exercent une influence sur la transmission nociceptive à tous les niveaux de la circuiterie spinale : au niveau des terminaisons centrales des fibres afférentes primaires, sur les neurones de projection ou encore sur les interneurons excitateurs et inhibiteurs. Ces contrôles descendants reposent sur la sécrétion de différents neurotransmetteurs et neuromodulateurs. En fonction des neuromodulateurs et des récepteurs sur lesquels ils agissent, ils sont susceptibles de faciliter ou d'inhiber la transmission de l'information nociceptive. La multiplicité des neuromodulateurs, récepteurs et des lieux d'action offre une large possibilité de mécanismes de contrôle descendant (Millan, 2002). Les structures les plus étudiées dans ce contexte seront ici succinctement présentées.

Il a été montré que lors de stimulations nociceptives, la stimulation électrique ou chimique de la PAG et de la RVM a un effet analgésique (SPA : *Stimulation Produced Analgesia*), qui se produit via l'activation du funiculus dorso-latéral (DLF, Helmstetter et al., 1998; Prado and Roberts, 1985; Reynolds, 1969). Or, les neurones sérotoninergiques de la RVM activés par les stimuli nociceptifs sont capables d'activer les récepteurs sérotoninergiques spinaux, aboutissant à une inhibition descendante (Dogrul et al., 2009). La RVM contient également des neurones GABAergiques envoyant une projection disynaptique sur les neurones sensoriels primaires via des neurones spinaux à enképhaline. Cette voie faciliterait la douleur mécanique aiguë (François et al., 2017). Cette structure est également sous le contrôle de la transmission opioïde issue de la PAG (Bajic and Proudfit, 1999; Helmstetter et al., 1998). Par ailleurs, une autre structure, le Lc, participe au contrôle descendant via des projections noradrénergiques et GABAergiques vers la moëlle et les noyaux trigéminaux (Winkler et al., 2006). L'activation de ces projections par les voies ascendantes jouerait de deux manières, en diminuant la transmission excitatrice des fibres afférentes primaires au niveau pré-synaptique, ainsi que l'excitabilité des neurones spinaux au niveau post-synaptique. Ces deux mécanismes s'effectueraient via l'activation de récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques (Sonohata et al., 2003). De plus, leur action sur les interneurons inhibiteurs spinaux via les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques potentialiserait l'inhibition de ce réseau (Baba et al., 2000b, 2000a). Ce circuit PAG-RVM-Lc a, en temps normal, pour effet net une inhibition. Ce contrôle descendant, activé par les stimuli nociceptifs inhibe la transmission nociceptive : « la douleur inhibe la douleur » (Bannister and Dickenson, 2017).

## CHAPITRE I

---

LøAPN fait également partie des structures dont la stimulation électrique ou chimique produit une analgésie (Prado, 1989; Prado and Roberts, 1985). Cet effet serait également médié par une modulation descendante, inhibant les neurones spinaux à champs récepteurs multiples des couches profondes, et excitant les neurones de projection des couches superficielles, bien que løAPN ne soit pas communément mentionnée parmi les structures du contrôle descendant de la nociception (Rees and Roberts, 1989; Rees et al., 1995, cf Chapitre III - 2.3.2.).

### 3. Physiopathologie de la douleur neuropathique

Comme définie précédemment, la neuropathie résulte d'un dysfonctionnement persistant dans un ou plusieurs nerfs. La douleur neuropathique est donc la manifestation d'une plasticité neuronale pathologique. Bien qu'il s'agisse d'un syndrome hétérogène avec des présentations symptomatiques multiples, les symptômes généralement rapportés chez les patients avec douleur neuropathique suspectée sont les suivants (Rasmussen et al., 2004):

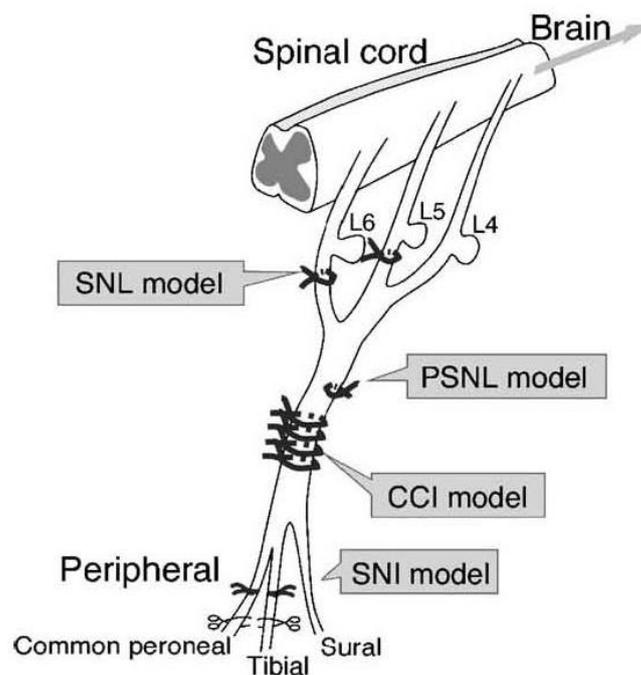
- Douleurs superficielles spontanées intenses (allodynie)
- Douleurs évoquées par le toucher ou le froid (hyperalgie)
- Douleurs spontanées profondes paroxystiques
- Douleurs évoquées par le frottement (*brush*)

Sur le long terme, le syndrome neuropathique peut s'accompagner de comorbidités telles que l'anxiété, la dépression ou les troubles du sommeil (Davis et al., 2011). La lésion à l'origine de la neuropathie peut survenir à tous les niveaux du système somatosensoriel. Ainsi, les neuropathies périphériques sont associées à une agression directe des neurones sensoriels primaires, pouvant provoquer des morts cellulaires, une compromission de la transduction (atrophie terminale), de la conduction (perte d'axones périphériques) ou encore de la transmission (perte des terminaisons centrales) de l'information. Ces phénomènes sont susceptibles d'affecter une seule ou toutes les modalités sensorielles, selon la nature des fibres afférentes primaires affectées.

La lésion ou l'inflammation tissulaire induit des changements réversibles et adaptatifs dans le système nerveux somatosensoriel. Dans le cadre d'une douleur neuropathique, le système nerveux *per se* est endommagé. Les changements de sensibilité peuvent alors devenir persistants, produisant des douleurs spontanées et un abaissement du seuil de sensibilité responsable de l'allodynie et de l'hyperalgie rapportée chez les patients neuropathique (von Hehn et al., 2012). La compréhension des mécanismes sous-jacents requiert donc des modèles expérimentaux de douleurs neuropathiques reproduisant ces phénomènes lésionnels.

## 3.1. Modèles de douleur neuropathique

Les modèles de douleur visent à reproduire les causes des pathologies décrites cliniquement afin d'en étudier les mécanismes (Le Bars et al., 2001). Ainsi, la neuropathie pouvant être induite par des cancers, des traitements chimiothérapeutiques, le diabète, ou encore des lésions nerveuses directes, différents modèles expérimentaux ont été développés. Une neuropathie cancéreuse peut être induite chez un sujet animal par greffe de cellules tumorales autour du nerf sciatique, une neuropathie chimiothérapeutique par administration de substances iatrogènes comme l'oxaliplatine, ou une neuropathie diabétique par injection d'agents cytotoxiques des cellules pancréatiques comme la streptozocine. Il existe enfin de multiples modèles de lésions nerveuses directes, affectant plusieurs types de nerfs. Le nerf infraorbital est le plus communément affecté comme modèle de neuropathie trigéminal. Pour les neuropathies périphériques, le nerf sciatique est le modèle le plus utilisé.



**Figure 8 | Diagramme des différents modèles neuropathiques de lésion physique du nerf sciatique (d'après Ueda, 2006).**

Le modèle SNL consiste en une ligature des segments L5 et L6 du nerf. Le modèle PSNL consiste en une ligature d'un tiers à la moitié du nerf. Le modèle de CCI consiste en plusieurs ligatures lâches du nerf. Enfin, le modèle SNI consiste à ligaturer et sectionner les branches terminales péronéale commune et tibiale du nerf.

CCI : Chronic Constriction Injury ; PSNL : Partial Spinal Nerve Ligation ; SNI : Spared Nerve injury ; SNL : Spinal Nerve Ligation.

Les modèles neuropathiques traumatiques peuvent être périphériques ou centraux. On distingue des modèles chimiques (lésions excitotoxiques) ou physiques. Différents types de lésions physiques du nerf sciatique existent (Figure 8). Le modèle de section totale du nerf sciatique (SNT : *Spinal Nerve Transection*) est le plus drastique et induit une autotomie et une faiblesse motrice. Ces dommages collatéraux sont susceptibles de biaiser l'interprétation des tests de sensibilité. Les autres modèles consistent en la lésion soit par ligature lâche de tout le nerf, comme le modèle de constriction chronique (CCI, Bennett and Xie, 1988) ou par une lésion serrée d'une partie du nerf (PSNL : *Partial Sciatic Nerve Ligation*, Malmberg and Basbaum, 1998; Seltzer et al., 1990) ou de certains segments (SNL : *Spinal Nerve Ligation*, Kim and Chung, 1992). Enfin, le modèle *Spared Nerve Injury* (SNI) correspond aux lésions les plus périphériques du nerf sciatique, avec ligature et section des branches commune péronéale et tibiale du nerf, laissant la branche surale intacte (Decosterd and Woolf, 2000). Ces différents modèles induisent une hypersensibilité à la douleur semblable aux symptômes neuropathiques, notamment une allodynie mécanique et thermique au froid. Le modèle SNI a l'avantage de maintenir séparées les fibres lésées et non lésées ; les territoires cutanés qu'elles innervent respectivement montrent donc une sensibilité distincte ce qui facilite leurs manipulations (cf. Matériel et Méthodes). De plus, ce modèle semble présenter les anomalies comportementales les plus reproductibles et les plus longues (plus de 6 mois). Il a été mis au point chez le rat puis adapté à la souris chez qui plusieurs variantes ont été développées (Bourquin et al., 2006).

Ces différents modèles provoquent des symptômes reproduisant plus ou moins bien la description clinique de la neuropathie. En effet, les lésions sont constamment présentes, contrairement aux neuropathies cliniques pour lesquelles les symptômes perdurent au-delà de la lésion nerveuse originelle. De plus, les différences interindividuelles et les états émotionnels et affectifs ne sont pas reproductibles. Enfin, la douleur de l'animal est estimée à partir de tests comportementaux, mais il n'y a pas de preuve directe que les réponses comportementales s'accompagnent d'une sensation douloureuse (Le Bars et al., 2001). Ces modèles sont donc à considérer comme des cas particuliers mais, malgré leurs limites, ils offrent néanmoins une première approche pour l'étude des mécanismes de la neuropathie.

### 3.2. Mécanismes de la neuropathie

Plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer le développement des douleurs neuropathiques. La plupart suggère qu'elles seraient initiées par des phénomènes de sensibilisation périphérique et centrale, survenant de manière physiologique lors d'une lésion tissulaire. La transition vers un état de douleur chronique pathologique résulterait d'un échec de la réversion de ces changements à long terme (Basbaum et al., 2009). Ces mécanismes de sensibilisation aboutiraient à des dérégulations dans l'expression des gènes, modifiant l'excitabilité neuronale et altérant la transmission du signal nociceptif. Les symptômes et signes cliniques des neuropathies n'étant toujours précisément établis, leurs liens avec les mécanismes qui commencent à être identifiés ne sont pas clairement définis et il n'existe pas encore de consensus quand à leur pathogénèse (Attal and Bouhassira, 2004; Bouhassira et al., 2004; Finnerup et al., 2016; Rasmussen et al., 2004). Certains exemples de mécanismes suspectés seront décrits ici, mais beaucoup sont encore incompris aujourd'hui.

#### 3.2.1. Sensibilisation périphérique

Suite à une lésion nerveuse, les tissus endommagés et les cellules immunitaires recrutées libèrent des substances inflammatoires contenant de nombreux neurotransmetteurs (sérotonine, CGRP, substance P, bradykinine, etc.) et d'autres substances variées (ATP, prostaglandines, neurotrophines, cytokines, protons, etc.). Celles-ci sont capables d'activer les récepteurs présents à la surface des nocicepteurs et de déclencher des voies de signalisation qui aboutissent à une modification de l'expression de récepteurs et canaux ioniques. Par exemple, la libération du NGF (*Nerve Growth Factor*) activerait des voies intracellulaires contribuant à l'augmentation de la fonction et de l'expression du canal thermosensible TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid 1*), diminuant le seuil d'activation thermique de certaines fibres C et amplifiant la réponse inflammatoire (Chuang et al., 2001; Ji et al., 2002). La grande diversité des substances, récepteurs et voies pouvant être mise en jeu offre une très large possibilité de mécanismes, qui ne sont pas tous élucidés. Ces modifications contribuent à l'hyperexcitabilité des fibres afférentes primaires et à leur décharge ectopique, probablement à l'origine des douleurs spontanées observées lors des neuropathies. Des modifications de plasticité entre le SNP et le SNC favorisent l'augmentation de l'entrée périphérique vers la moëlle et le recrutement de fibres non nociceptives comme les A $\delta$  et C-LTMR par des stimuli douloureux, contribuant à une sensibilisation centrale (Basbaum et al., 2009; Latremoliere and Woolf, 2010).

### 3.2.2. Sensibilisation spinale

Les mécanismes de sensibilisation centrale survenant lors des neuropathies ont essentiellement été décrits au niveau spinal. L'hyperexcitabilité des afférences primaires périphériques induit une activation de la microglie au niveau de la moëlle, libérant des substances pro-inflammatoires. Ceci mène à une perte d'inhibition dans les cornes dorsales avec plusieurs mécanismes suspectés.

Parmi eux, la mort cellulaire des neurones GABAergiques est envisagée. En effet, une perte d'immunoréactivité GABA a été rapportée dans les cornes dorsales de la moëlle épinière dans un modèle neuropathique chez le rat (Ibuki et al., 1997). De plus, l'hyperalgie induite par la SNI est atténuée par l'administration intrapéritonéale de tiagabine, un antagoniste du transporteur du GABA. Cette étude rapporte également une diminution du nombre de neurones GAD-positifs dans les cornes dorsales avec une expression de facteurs d'apoptose (caspase 3) colocalisée avec les neurones GABAergiques (Meisner et al., 2010). Des altérations de la transmission GABAergique pourraient également être à l'origine de cette levée d'inhibition. En effet, l'activation microgliale semble induire une dépolarisation du potentiel d'inversion du chlore (situé autour de -60mV en conditions physiologiques) dans les neurones GABAergiques. Celle-ci s'effectuerait via une modification du co-transporteur KCC2, menant à diminution du courant GABA-A, voire à une inversion de sa polarité (Coull et al., 2005; Ferrini et al., 2013). L'expression des récepteurs GABA-B est par ailleurs diminuée dans certains modèles neuropathiques (Wu et al., 2011). De plus, les souris *knock-out* (KO) pour les récepteurs GABA-B montrent, entre autres, une hyperalgie (Gassmann et al., 2004; Schuler et al., 2001). Par ailleurs, lors des douleurs neuropathiques, certaines fibres non-nociceptives LTMR sont recrutées et leur signalisation tactile normale est convertie en sensation douloureuse. Le mécanisme sous-jacent demeure peu compris, notamment de par la diversité des LTMR, mais certaines études suggèrent qu'il reposerait également sur une levée d'inhibition (Delfini et al., 2013; François et al., 2015; Seal et al., 2009). Des réorganisations des terminaisons spinales de ces fibres afférentes ont également été rapportées, notamment avec un développement ectopique de fibres afférentes primaires A dans la couche II, pouvant contribuer aux douleurs neuropathiques (Mannion et al., 1996; Woolf et al., 1992). Ces données convergent vers l'hypothèse d'une perte d'inhibition dans les cornes dorsales facilitant la transmission nociceptive spinale (Petitjean et al., 2015). Ce phénomène pourrait expliquer une augmentation de la probabilité, pour un stimulus nociceptif, de générer une sensation douloureuse via les nocicepteurs.

### 3.2.3. Modifications supra-spinales

Les lésions nerveuses induisent donc des changements plastiques dans les fibres nociceptives, correspondant à une sensibilisation périphérique, et dans les cornes dorsales, correspondant à une sensibilisation centrale. Mais des changements interviennent également dans les régions supra-spinales de la « *pain matrix* ». Ces derniers peuvent aboutir à des syndromes de douleur centrale. Le mécanisme principalement décrit est, de même qu'au niveau spinal, une perte de l'inhibition (Gustin et al., 2011; Henderson et al., 2013).

En effet, la douleur neuropathique semble associée à une désinhibition dans les circuits corticaux due, là encore, à une altération de la transmission GABAergique. Des diminutions dans le contenu GABAergique ont été montrées dans le thalamus, l'insula et l'ACC chez des patients atteints de douleur chronique (Foerster et al., 2012; Henderson et al., 2013). Par ailleurs, une perte de connectivité bidirectionnelle a été rapportée entre les neurones excitateurs et inhibiteurs de la couche V de l'ACC chez la souris dans le modèle neuropathique de CCI, qui se traduit par une diminution de la fréquence des CPSE et CPSI miniatures. La modélisation de ce réseau à partir des données récoltées sur les neurones pyramidaux et sur les interneurons de type *fast-spiking* montre que le facteur déterminant dans l'altération de cette connectivité est l'inhibition exercée par les interneurons *fast-spiking* sur les neurones pyramidaux (Blom et al., 2014). En cohérence avec ces observations, une diminution d'activité des interneurons corticaux à parvalbumine (PV) et somatostatine (SOM) a été décrite dans le cortex somatosensoriel dans un modèle SNI, associée à une augmentation d'activité des pyramides de la couche V. Dans cette étude, l'activation pharmacogénétique des interneurons SOM+ diminue l'activité des pyramides et abolit l'allodynie mécanique (Cichon et al., 2017a). La désinhibition corticale semble donc être une modification pathologique fondamentale dans le développement de la neuropathie.

Cette hypothèse est étayée par le fait que l'activation des interneurons corticaux par stimulation électromagnétique transcrânienne chez l'humain, dans le cortex moteur, montre des effets analgésiques sur la neuropathie (Lefaucheur et al., 2006; Ziemann et al., 1996). Ces phénomènes sont susceptibles d'impacter non seulement l'intégration de la sensation douloureuse mais aussi sa modulation. En effet, le cortex somatosensoriel envoie des projections cortico-spinales induisant une facilitation de la perception tactile et constituant une boucle d'amplification spino-cortico-spinale. Celle-ci serait impliquée dans l'allodynie tactile (Liu et al., 2018).

Les syndromes de douleur centrale ou neurogénique sont associés à une activité thalamique anormale (Berit, 1998; Vartiainen et al., 2016). Notamment, le noyau postérieur thalamique (PO), noyau d'ordre supérieur traitant des informations somatosensorielles et nociceptives (Perl and Whitlock, 1961; Whitlock and Perl, 1961), montre une augmentation d'activité suite à une lésion spinale. Ce phénomène serait dû à une suppression des entrées inhibitrices en provenance de la Zona Incerta (ZI) et de l'APN (Masri et al., 2009; Murray et al., 2010). Le PO entretenant des connexions réciproques avec plusieurs aires corticales associées à la somesthésie, mais aussi avec le cortex insulaire et l'amygdale, pourrait donc être impliqué dans la composante affective-motivationnelle de la douleur (Friedman and Murray, 1986; Park et al., 2018).

Enfin, les contrôles descendants de la douleur sont également altérés lors des neuropathies. En effet, les projections descendantes issues du Lc et de la RVM ont normalement pour effet net une inhibition de la transmission nociceptive spinale via les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques, occultant la facilitation descendante via les récepteurs 5-HT<sub>3</sub>. Dans les états neuropathiques, la voie adrénergique devient quiescente, de sorte que la facilitation sérotoninergique prendrait le dessus, contribuant à la persistance de la douleur (Bannister and Dickenson, 2017).

Les études d'imagerie fonctionnelle et de magnétoencéphalographie réalisées chez l'humain montrent des modifications des rythmes cérébraux dans la «*pain matrix*» qui se traduisent par une augmentation de l'activité enregistrée dans la bande de fréquence  $\beta$  et de la cohérence entre les oscillations  $\beta$  (4-9Hz) et  $\gamma$  (12-25Hz, Llinás et al., 1999; Sarnthein et al., 2006; Stern et al., 2006; Sarnthein and Jeanmonod, 2008). Ces dysrythmies thalamocorticales reposeraient sur une augmentation de la décharge en bouffée de PA des neurones thalamiques liée à l'activation des canaux calciques de type T (Jeanmonod et al., 1996).

Une modification des proportions de matière grise et blanche corticale, inversement corrélées, a également été rapportée. Celle-ci pourrait être due à une perte neuronale, un changement dans la concentration en protéines et canaux de surface des neurones ou de la glie, altérant la quantité d'eau extracellulaire, ainsi qu'à des changements de connectivité dans la matière blanche. Bien qu'on ignore encore le mécanisme sous-jacent, ceci traduit des modifications drastiques au niveau cérébral liées à la neuropathie (Apkarian, 2012; Apkarian et al., 2011; Treede et al., 1999). Ces résultats suggèrent que les douleurs chroniques n'induisent pas des modifications cérébrales locales et discrètes mais une modification globale de l'état de connectivité cérébrale.

Si plusieurs de mécanismes, dont ceux exposés ci-dessus, ont été proposés pour expliquer le développement des neuropathies, ces syndromes sont encore mal compris. De plus, les symptômes et signes cliniques ont été établis à partir de patients neuropathiques avérés ou putatifs selon que la lésion nerveuse originelle a été identifiée ou non. Ceci complique l'établissement de la symptomatologie neuropathique ainsi que l'étude de sa physiopathologie (Attal and Bouhassira, 2004; Finnerup et al., 2016; Rasmussen et al., 2004).

### 3.3. Canaux ioniques et neuropathie

Les modifications d'excitabilité qui surviennent lors des neuropathies reposent en grande partie sur les changements d'expression ou de régulation de récepteurs et de canaux ioniques. Par exemple, les canaux ioniques sensibles à l'acidité (ASIC : *Acid-Sensing Ion Channels*) activés par les protons déclenchent une dépolarisation qui semble impliquée dans plusieurs modèles de douleur chronique. En effet, une augmentation de leur niveau d'expression a été rapportée chez le rat dans les DRG suite à une incision plantaire, et leur inhibition pharmacologique spécifique ou leur *knock-down* (KD) *in vivo* diminuent significativement les douleurs post-opératoires (Deval et al., 2011). L'inhibition pharmacologique ou génétique des ASIC exprimés au niveau périphérique et central chez la souris montre également des effets analgésiques (Diochot et al., 2012). L'inhibition des canaux ASIC exprimés à la périphérie par injection systémique d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques reverse l'allodynie cutanée observée dans des modèles migraineux (Verkest et al., 2018). Enfin, au niveau supra-spinal, l'inhibition des ASIC exprimés dans l'amygdale basolatérale diminue les comportements douloureux dans le modèle de monoarthrite chez le rat (Aissouni et al., 2017).

D'autres travaux suggèrent également un rôle des canaux sodiques dans les neuropathies. En effet, une augmentation des courants sodiques Nav1.3 et 1.7 a été décrite dans les fibres sensorielles primaires, dans un modèle de neuropathie diabétique chez le rat (Devor et al., 1989; Hong et al., 2004). Par ailleurs, des mutations de type « gain de fonction » des gènes codants pour Nav1.7 et Nav1.8 ont été rapportées dans les fibres à petit diamètre de patients neuropathiques (Faber et al., 2012). En cohérence avec ces résultats, les neurones des DRG montrent une augmentation de la prévalence des oscillations du potentiel de membrane suite à une lésion nerveuse, favorisant la décharge ectopique de potentiels d'action (PA). Ce comportement oscillatoire et la décharge ectopique de ces neurones sont abolis en remplaçant les ions sodium ou en appliquant de la tetrodotoxine (TTX) ou de la lidocaïne peu concentrés,

préservant la propagation axonale des PA (Amir et al., 2018). Ces données témoignent de la contribution des canaux sodiques périphériques aux neuropathies.

Des comportements oscillatoires du potentiel de membrane, normaux ou pathologiques, reposent également sur l'activité des canaux HCN (Kanyshkova et al., 2009; Zobeiri et al., 2019). Dans ce contexte, il faut noter que l'injection intrapéritonéale de l'antagoniste des canaux HCN, le ZD 7288, dans des modèles de douleur neuropathique chez le rongeur diminue fortement le comportement douloureux et la décharge spontanée des fibres lésées enregistrées *ex vivo* (Chaplan et al., 2003). Cet antagoniste semble également abolir l'allodynie mécanique induite par ligature du nerf sciatique chez le rat (Luo et al., 2007). De plus, les souris KO homozygotes pour HCN2 dans les neurones sensoriels primaires ne développent pas de signes neuropathiques après PSNL (Emery et al., 2011). Enfin, au niveau cortical, un dysfonctionnement des canaux HCN dans les dendrites de neurones pyramidaux de la couche V a été rapporté dans le modèle SNI, augmentant leur capacité d'intégration des entrées excitatrices. L'activation spécifique des récepteurs sérotoninergiques 5-HT7 par l'agoniste 5-CT (5-Carboxamino-Tryptamine) induit une augmentation du courant lié aux canaux HCN et rétablit une intégration dendritique normale, associés à une diminution de l'hyper-sensibilité mécanique (Santello and Nevian, 2015). Cette restauration de la fonction des HCN par la sérotonine reposerait sur l'activation de la voie de l'adénylate-cyclase par les récepteurs 5-HT7, augmentant la concentration cytosolique d'AMPc capable de moduler positivement les canaux HCN (Wang et al., 2002).

La contribution des canaux HCN aux oscillations membranaires pourrait s'effectuer de concert avec l'activation des canaux calciques à bas seuil, de type T. En effet, les canaux HCN, activés par l'hyperpolarisation, induisent une dépolarisation lente du potentiel de membrane, activant les canaux calciques de type T qui génèrent alors un potentiel calcique à bas seuil. Cette dépolarisation déclenche des PA sodiques, inactivant les canaux HCN jusqu'à l'hyperpolarisation post-décharge. Celle-ci réactive les canaux HCN pour initier un nouveau cycle d'oscillation (Bal and McCormick, 1997). Ce mécanisme, mis en évidence dans les neurones de l'olive inférieure (Llinas and Yarom, 1981), pourrait être à l'origine de la genèse des oscillations de type delta dans les neurones thalamocorticaux (Crunelli et al., 2014). Une augmentation de l'expression des canaux calciques de type T, notamment de l'isoforme Cav3.2 a par ailleurs été rapportée dans les neurones sensoriels périphériques de plusieurs modèles neuropathiques (Jagodjic et al., 2007, 2008; Marger et al., 2011; Takahashi et al., 2010, cf Chapitre II). Ces mécanismes pourraient expliquer l'effet analgésique de

## CHAPITRE I

---

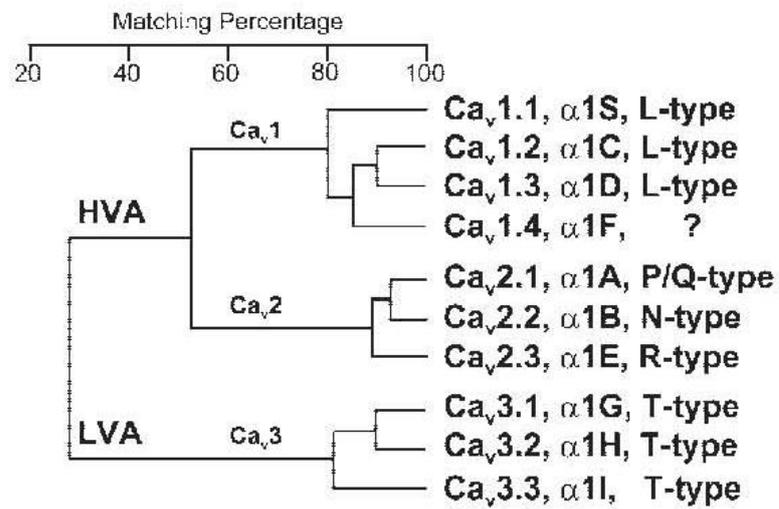
l'application de l'antagoniste des canaux T dans des modèles de douleur neuropathique  
(Barton et al., 2005; Dogrul et al., 2003; von Hehn et al., 2012) .

**CHAPITRE II :**  
**LES CANAUX CALCIQUES DE TYPE T**

### 1. Découverte des canaux calciques de type T

Peu après la caractérisation du potentiel d'action (PA) sodique dans l'axone géant de calamar (Hodgkin and Huxley, 1952), des potentiels d'action indépendants du sodium furent observés dans les fibres musculaires chez le crabe et leur origine calcique fut confirmée par la suite (Fatt and Ginsborg, 1958; Fatt and Katz, 1952). Grâce à la technique de *patch-clamp* (Hamill et al., 1981), l'analyse des courants entrants dans les cellules à œuf d'étoile de mer montra l'existence de deux types de courant calciques voltage dépendants : l'un activée après de petites dépolarisations membranaires, et l'autre nécessitant de plus fortes dépolarisations (Hagiwara, 1975). Ces conductances furent nommées respectivement LVA pour les bas seuils d'activation (*Low voltage-activated*) et HVA pour les hauts seuils d'activation (*High voltage-activated*, Carbone and Lux, 1984). Elles furent identifiées par la suite dans plusieurs types cellulaires de espèces variées (Armstrong and Matteson, 1985; Bean, 2004; Fedulova et al., 1985; Hagiwara et al., 1988). A partir d'enregistrements des courants calciques dans les DRG de poulet, au moins 3 types de canaux calciques furent initialement identifiés : les canaux L (*Long-lasting*) capables de produire de fortes dépolarisations de longue durée et les canaux T (*Transient*) de petite conductance sous-tendant des courants transitoires activés par de faibles dépolarisations et correspondant aux courants LVA ; enfin, les canaux N (*Neither*) ne correspondant ni aux canaux T, ni aux canaux L (Nowycky et al., 1985). L'existence de ces différents types de canaux fut confirmée par la suite à l'aide de bloqueurs pharmacologiques spécifiques qui ont permis de sous-diviser plus finement la famille des canaux calciques HVA en types L, N, P, Q et R dans de nombreuses populations neuronales (Ishibashi et al., 1998; Kasai et al., 1987; Mintz et al., 1992; Plummer et al., 1989; Randall and Tsien, 1997; Snutch et al., 1990).

Les apports de la biologie moléculaire dans les années 90 ont abouti à une classification des canaux calciques selon leurs propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques, en cohérence avec une classification par homologie de séquences d'acides aminés (Figure 9). Ainsi, il existe au moins 10 gènes *Cacna1* codant pour les canaux calciques voltage dépendants : 7 gènes encodent les sous-unités  $\alpha_1$  des canaux Cav1 et Cav2 à haut seuil d'activation (HVA) ; les 3 gènes restants identifiés par clonage moléculaire codent celle des canaux de type T, Cav3 (Cribbs et al., 1998; Lee et al., 1999).



**Figure 9 | Différents types de canaux calciques voltage dépendants classés selon l'homologie des séquences de la sous unité 1 (d'après Perez-Reyes, 2003).**

## 2. Propriétés des canaux calciques de type T

### 2.1. Structure des canaux calciques de type T

L'étude de la structure des canaux calciques a débuté avec la purification des canaux de type L et N à partir de muscles squelettiques et de cerveau, respectivement, et a permis de mettre en évidence 5 sous-unités, au plus, des canaux calciques voltage dépendants (Flockerzi et al., 1986; Witcher et al., 1993). Une sous-unité  $\alpha_1$  (170-240 kDa) forme le pore du canal (Figure 10). Elle est constituée de 4 domaines transmembranaires homologues (I à IV), eux-mêmes composés de 6 segments transmembranaires (S1 à S6, Perez-Reyes, 1999). Ces domaines sont liés par des boucles intracellulaires et extracellulaires et les domaines C-terminal et N-terminal sont intracellulaires. Les boucles intracellulaires sont le siège d'interactions avec plusieurs protéines régulatrices (García-Caballero et al., 2014). Le domaine S4 est un domaine senseur des variations du potentiel transmembranaire, constitué d'acides aminés chargés. Les boucles intra-membranaires entre les domaines S5 et S6 forment le pore (« P loop »). Ce dernier est suffisamment large pour laisser passer plusieurs types de cations mono et divalents mais la présence dans le pore de sites à très forte affinité pour le calcium, constitués d'acides aminés glutamiques et aspartiques, assure sa sélectivité pour les ions calcium (Dolphin, 2006; Talavera and Nilius, 2006).

Des sous-unités auxiliaires  $\alpha_2$ - et  $\alpha_3$  ont été identifiées dans les canaux HVA mais aucune sous-unité auxiliaire des canaux calciques de type T n'a été identifiée à l'heure actuelle. En effet, l'enregistrement de la sous-unité  $\alpha_1$  en système hétérologue montre un courant fonctionnel dont les propriétés biophysiques ressemblent fortement à celles du courant T natif, suggérant que les canaux T ne sont constitués que de la sous-unité  $\alpha_1$  (Klöckner et al., 1999; Kozlov et al., 1999; Lee et al., 1999; McRory et al., 2001; Monteil et al., 2000; Perez-Reyes, 2003). De plus, leur co-expression avec les sous-unités  $\alpha_2$ - et  $\alpha_3$  des canaux à hauts seuils ne modifie pas leurs propriétés biophysiques (Perez-Reyes, 2006) bien qu'il ait été suggéré que ces sous-unités auxiliaires auraient un rôle régulateur dans l'incorporation des canaux T au niveau de la membrane (Dolphin et al., 1999; Dubel et al., 2004).

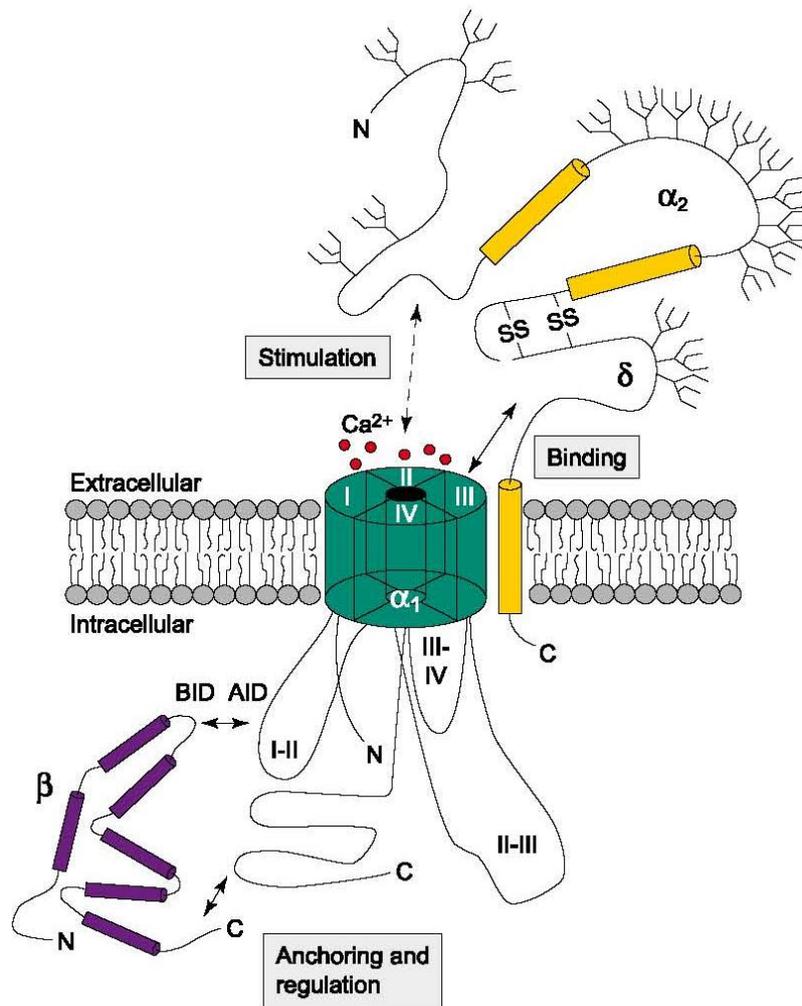


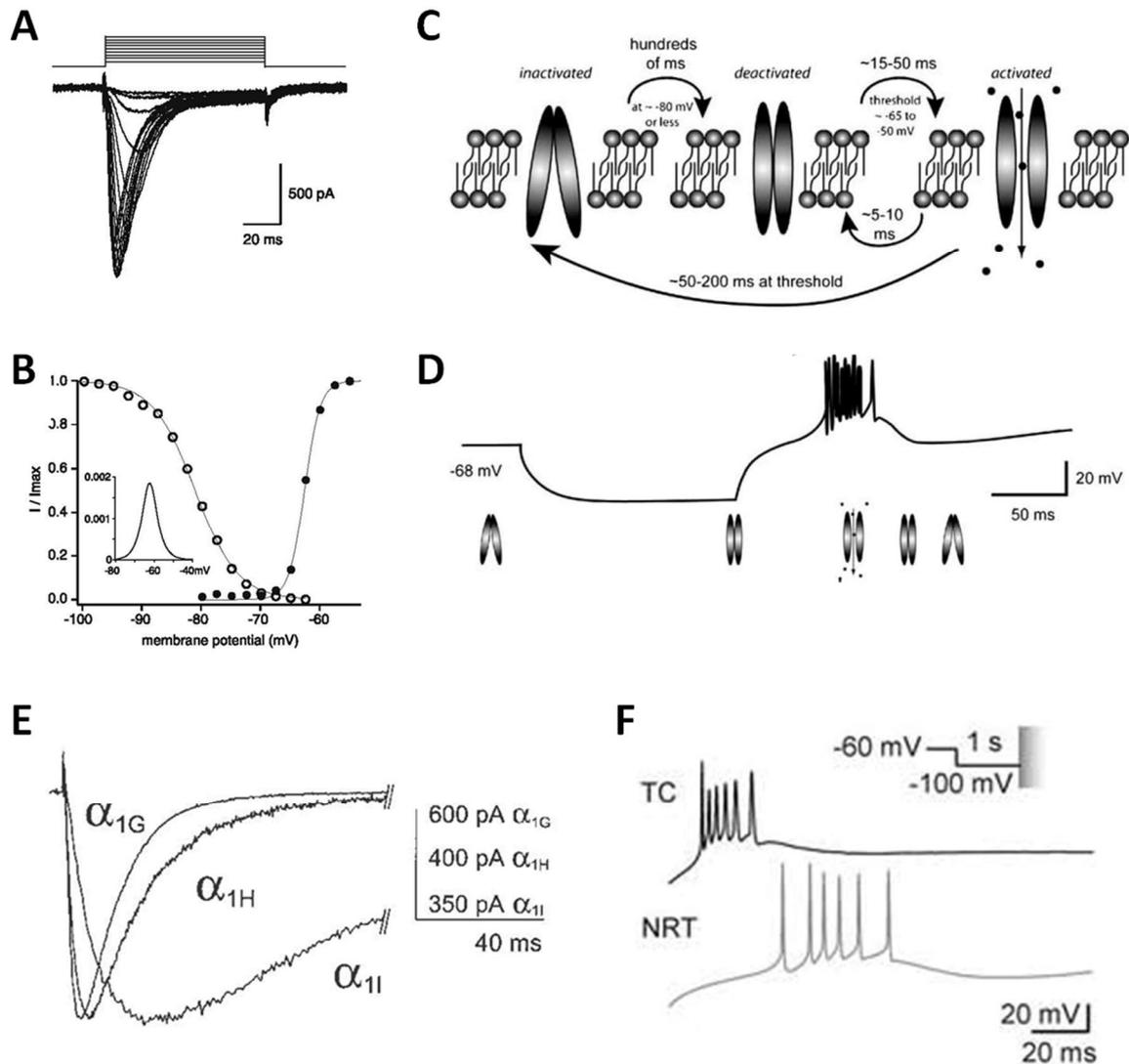
Figure 10 | Organisation structurale des canaux calciques voltage-dépendants. Les canaux calciques sont tous constitués d'une sous-unité 1 (d'après Dolphin, 2006).

### 2.2. Propriétés biophysiques des canaux calciques de type T

Les canaux T s'ouvrent pour des potentiels supérieurs à -60mV environ, et génèrent un courant calcique transitoire entrant, s'inactivant en quelques dizaines de millisecondes (Figure 11A, B). Leurs cinétiques d'activation sont relativement lentes par rapport aux canaux HVA (Burgess et al., 2002). Le maintien du potentiel membranaire au dessus de -60mV induit l'inactivation de la quasi-totalité de la population de canaux T exprimés dans la cellule (Figure 11B, C, D, Lambert et al., 2014). Par conséquent une hyperpolarisation en deçà de -60mV induisant la sortie d'inactivation d'une fraction plus ou moins importante de la population de canaux est un préalable nécessaire à l'activation d'un courant T transitoire (Figure 11C, D). Par ailleurs, les courbes de voltage-dépendance de l'activation et de l'inactivation à l'état stationnaire montrent un chevauchement autour de -60mV (Figure 11B). Ce chevauchement indique qu'il existe une gamme de potentiels où des canaux T ouverts, fermés et inactivés coexistent. Par conséquent, à l'équilibre dans cette fenêtre de potentiel allant de -50mV à -70mV, un courant constant de faible amplitude, appelé courant de « fenêtre », est généré par les canaux T et peut influencer l'excitabilité des neurones. Ce phénomène est particulièrement important dans des populations neuronales exprimant une très forte densité de canaux T telles que les noyaux thalamiques (Crunelli et al., 2005; Dreyfus et al., 2010; Williams et al., 1997).

Le clonage des trois différentes isoformes des canaux T a permis d'identifier leurs propriétés biophysiques respectives grâce à leur expression dans des systèmes hétérologues (Chemin et al., 2002; Perez-Reyes, 2003). Ils partagent tous les mêmes propriétés fondamentales, à savoir un bas seuil d'activation, une activation transitoire, et une inactivation quasi-totale aux potentiels de maintien proches du potentiel de repos de la majorité des neurones. Mais l'enregistrement de leurs courants respectifs montre qu'ils diffèrent sensiblement en termes de cinétiques et de voltage-dépendance (Figure 11E ;Hering et al., 2004; Klöckner et al., 1999; Kozlov et al., 1999; Talavera and Nilius, 2006). La différence la plus marquée concerne les constantes d'inactivation qui sont relativement rapides (20ms) pour les isoformes Cav3.1 et Cav3.2 et beaucoup plus lentes pour l'isoforme Cav3.3 (de l'ordre de 110ms en fonction des conditions d'enregistrement et des modèles étudiés).

## LES CANAUX CALCIFIQUES DE TYPE T



**Figure 11 | Propriétés biophysique des canaux calcifiques de type T**

(A) Courant T évoqué par des sauts de potentiels croissants à partir de  $-100\text{mV}$  (d'après Lambert et al., 2014).

(B) Courbe d'activation et d'inactivation à l'état stationnaire du canal T. La courbe d'activation ( ) résulte de l'amplitude maximale des courants évoqués par les différents sauts de potentiel montrés en A. La courbe d'inactivation à l'état d'équilibre ( ) été élaborée en mesurant le courant évoqué à  $-50\text{mV}$ , à partir de créneaux préalables allant de  $-100$  à  $-60\text{mV}$ , inactivant plus ou moins les canaux T (d'après Lambert et al., 2014).

(C, D) Schémas des différents états du canal T, des latences de transition entre ces états (C) et de leur évolution en fonction du potentiel de membrane (D, d'après Cueni et al., 2009).

(E) Courants évoqués via les canaux Cav3.1 (  $\alpha_{1G}$ ), Cav3.2 (  $\alpha_{1H}$ ) et Cav3.3 (  $\alpha_{1I}$ ) clonés et exprimés indépendamment dans des cellules HEK. Noter les différences de cinétique d'activation et d'inactivation de l'isoforme Cav3.3 (d'après Chemin et al., 2002).

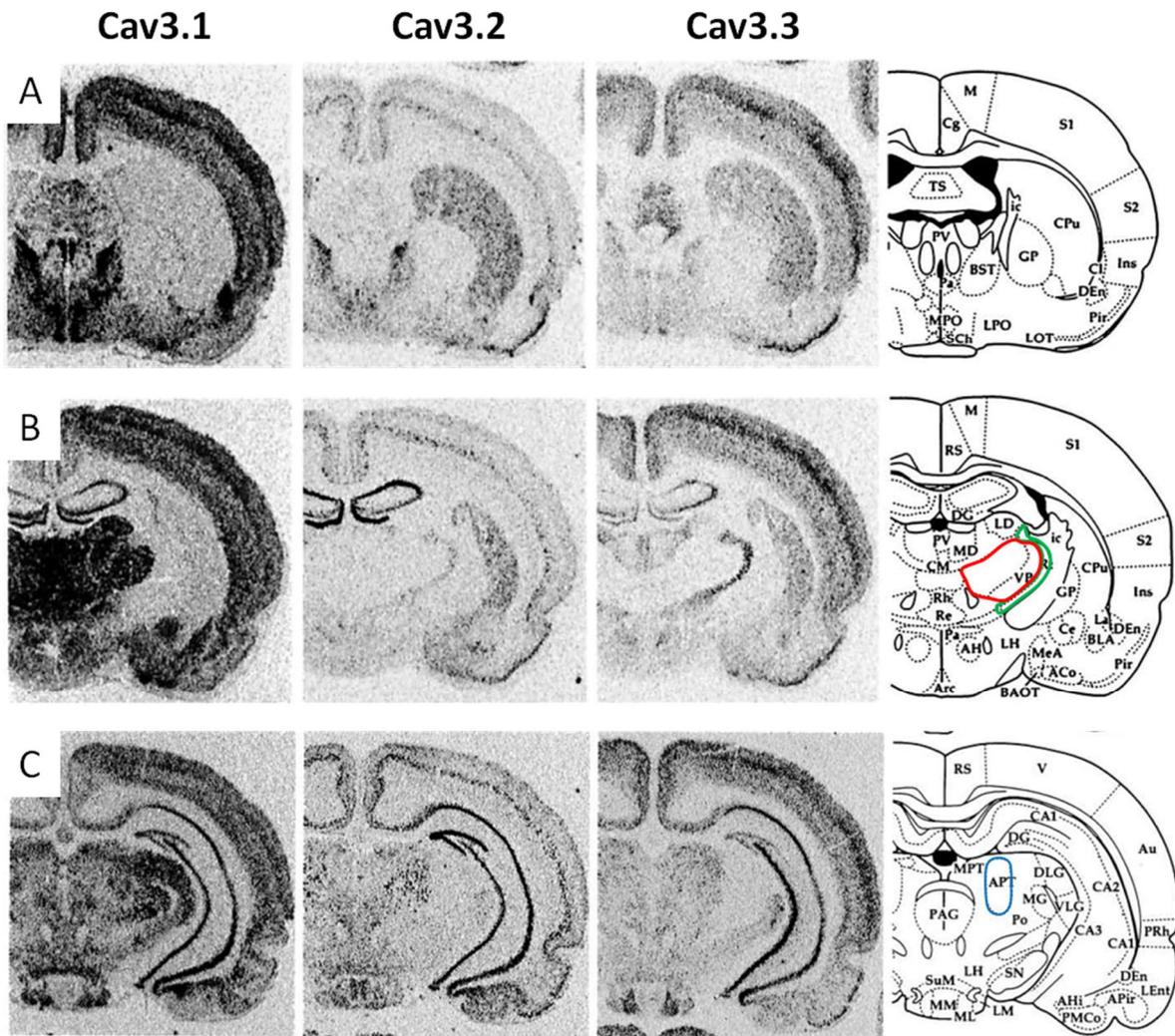
(F) Mode de décharge en bouffée de PA en rebond dans les neurones thalamocorticaux (TC) ou du noyau réticulé du thalamus (nRT) évoqués suite à un créneau de courant hyperpolarisant de  $-100\text{mV}$ . Noter les différences dans la structure temporelle de l'émission des PA (d'après Tschertter et al., 2011).

### 3. Localisations et rôles physiologiques des canaux T

#### 3.1. Rôle des canaux T dans la décharge en bouffée

L'étude de la localisation des trois isoformes des canaux T par hybridation *in situ* dans le cerveau du rat a montré qu'ils n'étaient pas exprimés de manière totalement uniforme (Talley et al., 1999). Ainsi, dans le thalamus, les neurones thalamocorticaux (TC) n'expriment que l'isoforme Cav3.1 tandis que les neurones du noyau réticulé thalamique (nRT) expriment les isoformes Cav3.2 et Cav3.3 (Figure 12). Ces différences de localisation, ainsi que les propriétés biophysiques respectives de ces isoformes, expliquent la différence de signature temporelle des bouffées de PA entre les neurones TC et dans ceux du nRT (Figure 11F). En effet, dans les neurones TC, la bouffée de PA est généralement constituée de 3 à 5 PA émis entre 300 et 500Hz avec une diminution continue de l'intervalle entre les PA (ISI : *Inter-Spike Interval*) au cours de la bouffée (Domich et al., 1986; Jahnsen and Llinas, 1984). A l'inverse, les neurones du nRT émettent plus de PA (5 à 8) à des fréquences inférieures (150 à 300Hz) avec une augmentation puis une diminution des intervalles inter-spike (ISI, Contreras et al., 1993). L'émission prolongée de PA et ce phénomène d'accélération puis de décélération serait due à la cinétique lente de l'isoforme Cav3.3 exprimée uniquement au niveau du nRT (Tscherter et al., 2011). Cette signature spécifique de la bouffée dans le nRT serait également liée à une localisation dendritique des canaux T (Contreras et al., 1993; Mulle et al., 1986). Il est important de noter que si le rôle des canaux Cav3.1 et Cav3.3 dans la génération des bouffées de PA semble clair, celui du canal Cav3.2 n'a pas été montré (Pellegrini et al., 2016).

De nombreuses études des canaux T dans l'olive inférieure et le thalamus portent sur le potentiel calcique à bas seuil (LTS) et la décharge en rebond. Mais leur rôle dans le contrôle de l'excitabilité cellulaire et des réseaux est encore mal défini. L'antagoniste spécifique des canaux T, le TTA-P2, a permis de découvrir de nouvelles fonctions de ces canaux, notamment dans l'excitabilité neuronale à des potentiels membranaires dépolarisés, dans l'intégration dendritique, ou encore dans la libération de neurotransmetteurs. Ces rôles reposent sur les différentes localisations de ces canaux dans les compartiments neuronaux.



**Figure 12 | Distribution des ARNm des isoformes des canaux T dans le cerveau, obtenue par hybridation in situ et observée en autoradiographie, sur trois niveaux de tranches coronales de cerveau de rat (adapté de Talley et al., 1999). Les tracés rouge et vert sur les schémas de droite délimitent le complexe ventrobasal thalamique (VB) et le nRT respectivement. Le tracé bleu délimite le Noyau Prétectal Antérieur (APN).**

### 3.1. Rôle des canaux T dans l'intégration dendritique

Une forte densité de canaux T dans les branches et épines dendritiques a été montrée par enregistrements électrophysiologiques, imagerie biphotonique, ou encore par modélisation, dans les neurones TC (Destexhe et al., 1998; Errington et al., 2010; Williams and Stuart, 2018), dans les neurones du nRT (Chausson et al., 2013; Crandall et al., 2010; Destexhe et al., 1996), dans les cellules de Purkinje (Hildebrand et al., 2009), dans les cellules en brosse unipolaires du cervelet (Diana et al., 2007), dans certains neurones striataux (Carter and Sabatini, 2004), ou encore dans les cellules granulaires du bulbe olfactif (Egger et al., 2003). Cette localisation dendritique a ensuite été confirmée par immunofluorescence et par microscopie électronique dans le néocortex, l'hippocampe, le thalamus et le cervelet (Craig et al., 1999; Kovács et al., 2010; Liu et al., 2011; McKay et al., 2006; Parajuli et al., 2010).

Cette position suggère un rôle des canaux T dans la propagation des potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE) le long des dendrites. En effet, il a été montré, dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe et du néocortex, que le courant T dendritique participe aux PPSE (Magee and Johnston, 1995; Markram and Sakmann, 1994). L'imagerie biphotonique dans le nRT a également montré que le recrutement des canaux T des dendrites distaux par la stimulation, génère de larges réponses calciques distales, pouvant potentiellement amplifier les entrées synaptiques et produire un PPSE supraliminaire au niveau somatique (Crandall et al., 2010). Ce mécanisme compenserait l'atténuation de ces PPSE le long des dendrites, liée aux propriétés passives de ces derniers. Ce phénomène aurait également lieu dans les neurones TC où de larges entrées calciques ont été enregistrées dans les dendrites distaux suite à l'application de glutamate ou à une stimulation synaptique (Errington et al., 2010). L'application de l'antagoniste spécifique des canaux T bloque ces signaux calciques. Enfin, dans les neurones du nRT, les canaux T dendritiques distaux participeraient à la propagation rétrograde des PA pouvant ainsi influencer l'intégration dendritique (Chausson et al., 2013).

Dans certains neurones où le courant T est plus petit, les effets des canaux T sur l'amplification des PPSE, leur forme et leur propagation peuvent être plus difficiles à mettre en évidence. Ces derniers pourraient même reposer plutôt sur l'augmentation d'autres conductances calcium-sensibles que sur l'effet électrogénique direct du courant T. Par ailleurs, certaines études proposent une interaction fonctionnelle directe entre les canaux T et

les canaux potassiques calcium-dépendants ou Kv4 de type A, susceptible d'impacter l'intégration dendritique (Anderson 2013, Anderson 2010, Cueni 2008, Wolfart 2002).

### 3.2. Rôle des canaux T dans la libération synaptique dendritique et axonale

Plusieurs études suggèrent que les canaux T exprimés au niveau dendritique et axonal influenceraient la libération synaptique. En effet, de courtes dépolarisations telles que des PPSE ou des PA peuvent activer les canaux T, dont l'activation rapide et la lente inactivation permettent de larges entrées calciques (Chemin et al., 2002; Kozlov et al., 1999). Par ailleurs, le recouvrement entre les courbes d'activation et d'inactivation des trois isoformes génère un courant de fenêtre correspondant à la petite fraction de canaux T ouverts à des potentiels proches du potentiel de repos (Dreyfus et al., 2010; Perez-Reyes, 2003). Au niveau des sites de libération synaptique, les courants calciques transitoires et toniques, via le courant de fenêtre, évoqués par les canaux T via ces mécanismes produiraient une exocytose de neurotransmetteurs spontanée ou évoquée. En effet, il a été montré à la synapse dendrodendritique entre les cellules granulaires et mitrales du bulbe olfactif que la propagation rétrograde des PA au niveau dendritique, ou la forte stimulation des afférences synaptiques, évoque une libération de GABA calcium-dépendante essentiellement due aux canaux T (Egger et al., 2003, 2005). Une étude basée sur l'utilisation de mibéfradil pour bloquer ces canaux suggère par ailleurs que la fusion des vésicules de neurotransmetteurs dans les cellules rétiniennes bipolaires dépendrait des canaux calciques de type T (Pan et al., 2001).

Au niveau des terminaisons présynaptiques de la couche III du cortex enthorinal, la microscopie électronique montre que les canaux HCN sont colocalisés avec les canaux Cav3.2. Le blocage du courant HCN ou la délétion des canaux correspondant induit une augmentation la fréquence des PPSE miniatures dans les neurones pyramidaux. Ceci suggère une implication des canaux HCN dans la libération de vésicules de glutamate. Cet effet est atténué par le blocage des canaux T via l'application de TTA. Les auteurs avancent l'hypothèse selon laquelle les canaux HCN présynaptiques dépolariseraient la terminaison, inactivant ainsi les canaux T et diminuant l'entrée présynaptique de calcium, ce qui aboutirait à une diminution de la libération spontanée du glutamate (Huang et al., 2011). Au niveau des interneurons hippocampiques de CA1, des canaux Cav3.1 sont présents dans les

terminaisons, proches des zones actives (Tang et al., 2011). A cette synapse, la libération asynchrone de GABA suite à l'activation des récepteurs cholinergiques présynaptiques diminue significativement avec application de TTA.

Les canaux T présynaptiques pourraient donc être impliqués dans des phénomènes de libération excitatrice et inhibitrice. Enfin, dans le nRT, la colocalisation entre l'isoforme Cav3.2 et la syntaxine-A1 a été mise en évidence dans l'élément présynaptique et contrôleraient l'exocytose à bas seuil de neurotransmetteurs (Weiss et al., 2012a, 2012b).

### 3.3. Rôle des canaux T dans la décharge tonique

Plusieurs études suggèrent également un rôle des canaux T dans la décharge tonique. En effet, l'imagerie biphotonique a montré une colocalisation entre les canaux T et les canaux sodiques du segment initial de l'axone (AIS) dans les interneurons du noyau cochléaire dorsal, dans les cellules de Purkinje et dans les neurones pyramidaux de la couche V. L'application de mibéfradil à l'AIS augmente le seuil de déclenchement du PA ainsi que l'ISI des décharges en bouffées, et diminue la probabilité de décharge d'un PA lors d'un PPSE supraliminaire. Cette modulation T-dépendante de la décharge tonique serait contrôlée par les récepteurs dopaminergiques, via leur action sur la protéine kinase C capable de réguler négativement le courant T (Bender and Trussell, 2009; Bender et al., 2010). Par ailleurs, cet effet toucherait spécifiquement les canaux T de l'AIS et non pas ceux des autres compartiments somatodendritiques, témoignant de la possibilité d'une modulation locale des canaux T.

Un rôle des canaux T dans la décharge tonique des neurones dopaminergiques de la substance noire a également été montré. En effet, ces neurones présentent une activité *pacemaker*, observée uniquement *in vitro*, et dont la fréquence dépend des grands potentiels post-hyperpolarisation (AHP) évoqués par les canaux potassiques calcium-dépendants SK (*small calcium-activated potassium channels* Wolfart and Roeper, 2002). A l'aide d'enregistrements en *patch* perforé, préservant la dynamique calcique intracellulaire, les auteurs montrent que la décharge tonique de ces neurones repose sur une entrée calcique via les canaux T, activant les canaux SK. L'application de mibéfradil ou de nickel altère en effet la régularité de cette décharge.

Enfin, dans les neurones thalamiques, il semble que l'effet du courant T sur l'excitabilité cellulaire ne repose pas systématiquement sur une hyperpolarisation transitoire ou tonique. En effet, dans ces neurones, la densité de canaux est telle que les canaux déinactivés aux potentiels dépolarisés représentent une population significative capable de générer un courant important. Par ailleurs, l'amplitude de ce courant est renforcée par une phosphorylation voltage-dépendante qui survient à de tels potentiels (Bessaïh et al., 2008; Leresche, 2004). Le large courant de fenêtre qui résulte de ces phénomènes semble influencer le potentiel de repos des neurones TC ainsi que la durée des *up states* lors des oscillations lentes (Crunelli et al., 2005; Dreyfus et al., 2010). De plus, cette population de canaux participerait à l'amplification des PPSE. La probabilité de décharge tonique des neurones TC semble également stabilisée sur une large gamme de potentiels grâce la forte densité de canaux T exprimés dans les neurones TC (Deleuze et al., 2012). Enfin, sur des homogénats de cervelet de rat, une association entre les canaux Cav3.2 et les canaux potassiques calcium-dépendants  $K_{Ca3.1}$  a été montrée, semblant influencer la décharge tonique spontanée des cellules de Purkinje aux potentiels membranaires dépolarisés (Engbers et al., 2012; Lambert et al., 2014).

### 3.4. Rôle des canaux T dans la plasticité à long-terme

Certaines preuves de l'implication des canaux T dans la plasticité à long-terme émergent également. En effet, la plupart des phénomènes de plasticité reposent sur une augmentation de la concentration calcique post-synaptique par des sources variées (Artola and Singer, 1993; Malenka and Bear, 2004). Ces entrées calciques pourraient provenir directement des courants évoquées par les canaux T, pouvant déclencher des cascades intracellulaires menant à une potentialisation ou dépression à long-terme (LTP ou LTD). Leur bas seuil d'activation pourrait également y contribuer induisant une première dépolarisation permettant le recrutement de sources calciques additionnelles, par d'autres canaux calciques voltage-dépendants ou via le retrait du blocage voltage-dépendant des récepteurs NMDA par le magnésium.

Par exemple, à la synapse entre les cellules pyramidales corticales de la couche V, les bouffées de PA se propageant rétrogradement dans les dendrites distaux activent les canaux T présents dans ces compartiments. Les PPSE unitaires issus de bouffées de PA à haute fréquence induisent une LTP robuste, atténuée par l'application de faibles concentrations de

## CHAPITRE II :

---

nickel ou d'antagoniste des récepteurs NMDA. Ce résultat suggère que cette LTP dépendrait de la levée du blocage par le magnésium des récepteurs NMDA, via une dépolarisation évoquée par les canaux T (Kampa et al., 2006). Au niveau du CA1 hippocampique, la coïncidence entre une entrée synaptique et un PA se propageant rétrogradement induit une augmentation de la concentration calcique dendritique et la potentialisation des PPSE. Ce phénomène est par ailleurs inhibé par l'application de faibles concentrations de nickel, suggérant une implication probable des canaux T (Magee and Johnston, 1997).

Ces mécanismes ne sont pas restreints aux synapses excitatrices puisqu'à la synapse inhibitrice entre les cellules de Purkinje et des noyaux cérébelleux profonds, un train de potentiels post-synaptiques inhibiteurs (PPSI) évoque un LTS et une bouffée de PA induisant un large courant calcique et une LTP. A l'inverse, la limitation de cette décharge en rebond induit une LTD (Aizenman et al., 1998). De même, à la synapse entre les neurones du nRT et les neurones thalamocorticaux, le couplage entre la stimulation présynaptique et l'activation du courant T post-synaptique induit une LTD dépendant de la concentration calcique dendritique intracellulaire dans les neurones thalamiques. Le TTA empêche la mise en place de cette plasticité. (Pigeat et al., 2015). Ces phénomènes reposent donc sur la présence dendritique des canaux T. Mais leur expression au niveau présynaptique, mise en évidence notamment dans les DRG à la synapse avec les neurones spinaux des couches superficielles et dans le cortex enthorinal par microscopie électronique, suggère un rôle possible dans la plasticité pré-synaptique (François et al., 2015; Huang et al., 2011)..

Les canaux T peuvent contribuer non seulement à la plasticité homosynaptique (dépendant de l'activité de l'élément présynaptique) mais également hétérosynaptique (dépendant de l'activité d'un 3<sup>e</sup> intervenant synaptique). Par exemple, à la synapse glutamatergique entre les neurones thalamocorticaux et les neurones du nRT, le couplage des entrées synaptiques avec le LTS du nRT induit une LTP, reposant sur les récepteurs NMDA, qui est abolie chez les souris KO pour l'isoforme Cav3.3 (Astori and Lüthi, 2013).

Ainsi, les canaux T ne sont pas uniquement impliqués dans les décharges en rebond comme cela a été très bien étudié dans les neurones thalamiques. D'autres fonctions commencent à être dévoilées au niveau central. Si les rôles des isoformes Cav3.1 et Cav3.3 semblent bien définis, au moins dans les neurones thalamiques, et s'il existe certaines pistes sur le rôle du canal Cav3.2 exprimé dans le cerveau, celui-ci n'est pas clairement défini. En revanche, au niveau périphérique et spinal, son implication dans la nociception est bien établie.

### 4. Rôle des canaux T dans la perception douloureuse

Plusieurs études se sont penchées sur l'implication des canaux T dans la perception douloureuse. Comme nous l'avons déjà vu, les canaux ioniques sont primordiaux dans la nociception, ainsi que dans l'établissement des douleurs chroniques (cf. Chapitre I). Des études pharmacologiques pionnières utilisant des bloqueurs à faible affinité et peu spécifiques des canaux T ont suggéré son rôle dans la nociception et dans les douleurs neuropathiques.

En effet, l'injection systémique ou intrapéritonéale de mibéfradil a des effets antinociceptifs mécaniques et thermiques et agit également sur la douleur viscérale chez le rat (Kim, 2003; Todorovic et al., 2002). L'administration intrapéritonéale d'éthosuximide montre également des effets analgésiques en test de *Tail-Flick* chez le rat (Barton et al., 2005). Ces études suggèrent donc un rôle des canaux T dans la transmission nociceptive aiguë.

En utilisant des approches pharmacologiques similaires, d'autres groupes ont également suggéré une implication des canaux T dans les douleurs chroniques et neuropathiques. En effet, l'administration intrapéritonéale d'éthosuximide ou de mibéfradil a des effets anti-hyperalgiques dans le modèle de douleur persistante induite par la capsaïcine et des effets analgésiques dans les phases précoce et tardive de douleur induite par la formaline (Barton et al., 2005). Leur administration systémique ou locale dans la voûte plantaire bloque également l'hyper-sensibilité mécanique et thermique dans le modèle SNL (*Sciatic Nerve Ligation*, Dogrul et al., 2003). Des effets anti-allodyniques et anti-hyperalgiques ont également été rapportés dans le modèle neuropathique de CCI (*Chronic Constriction Injury*, Hamidi et al., 2012) et de douleur viscérale chronique (IBS : *Irritable Bowel Syndrome*, Marger et al., 2011). Enfin, dans un modèle de douleur neuropathique chimiothérapeutique induit par le paclitaxel chez le rat, l'éthosuximide induit une réversion presque complète de l'allodynie mécanique et thermique au froid ainsi que de l'hyperalgie thermique (Flatters and Bennett, 2004). Ces travaux suggèrent donc que les canaux T ont également un rôle dans l'expression des douleurs chronique et neuropathique.

En cohérence avec cette hypothèse, des enregistrements extracellulaires des neurones des cornes dorsales chez le rat anesthésié neuropathique (modèle SNL) montrent que les réponses aux stimulations électriques ou naturelles (mécaniques et thermiques) sont inhibées de façon dose-dépendante par application locale d'éthosuximide (Matthews and Dickenson, 2001). Par ailleurs, dans le modèle diabétique à la streptozocine ou dans le modèle de CCI, une

## CHAPITRE II :

---

augmentation du courant T dans les neurones nociceptifs des DRG de rat a été observée (Jagodic et al., 2007, 2008). Ces études indiquent une modulation possible des canaux T dans le contexte neuropathique.

Cependant, comme nous l'avons dit précédemment, les bloqueurs employés dans ces études ne sont pas spécifiques des canaux T. En effet, l'éthosuximide diminue également les courants sodiques persistants et les courants potassiques calcium-dépendants (Crunelli and Leresche, 2003). Le mibéfradil, quant à lui, inhibe également les courants calciques HVA, les courants sodiques et les courants potassiques ATP-dépendants (Bezprozvanny and Tsien, 1995; Gomora et al., 1999; Liu et al., 1999; Nilius et al., 1997; Viana et al., 1997). La découverte à la fin des années 2000 des premiers bloquants spécifiques des canaux T dérivés de la piperidine, le 3,5-dichloro-N-[1-(2,2-diméthyl-tetrahydro-pyran-4-ylméthyl)-4-fluoro-piperidin-4-ylméthyl] -benzamide (TTA-P2, Shipe et al., 2008) a confirmé l'implication des canaux T dans la perception douloureuse. Il a ainsi pu être montré que l'injection intrapéritonéale de TTA-P2, induit une diminution des réponses douloureuses dans les phases précoce et tardive de l'injection de formaline ainsi qu'une réversion de l'hyperalgie thermique dans le modèle de neuropathie diabétique induite par la streptozocine (Choe et al., 2011). Il est à noter que ces effets anti-hyperalgique sont abolis par l'administration intrapéritonéale d'un ARN antisens de l'isoforme Cav3.2, suggérant que c'est cette isoforme qui sous-tendrait à elle seule l'expression de la neuropathie (Choe et al., 2011). Par ailleurs, l'administration orale de TTA-A2 induit une diminution dose-dépendante de l'hyper-sensibilité dans le modèle de l'IBS chez la souris (Francois et al., 2013). L'ensemble de ces résultats montrant une implication des canaux T dans la perception douloureuse aiguë et neuropathique a conduit à analyser la contribution respective des différentes isoformes. .

### 4.1. Rôle des isoformes des canaux T dans la perception douloureuse

Peu d'études se sont intéressées au rôle de l'isoforme Cav3.1 dans la perception douloureuse et les résultats obtenus dans différents modèles de douleur chronique sont en partie contradictoires. Dans les modèles neuropathiques de ligature du nerf sciatique ou infraorbital, la délétion constitutive du canal Cav3.1 (KO-Cav3.1) chez la souris provoque une diminution de l'hypersensibilité à la douleur suggérant un rôle pro-nociceptif du Cav3.1 (Choi et al., 2016; Na et al., 2008). En revanche, une autre étude réalisée dans le cadre de douleurs viscérales, induites par injection d'acide acétique ou de MgSO<sub>4</sub>, montre que le blocage de l'isoforme Cav3.1 des neurones thalamocorticaux aurait un effet hyperalgique, favorisant à l'inverse l'hypothèse d'un rôle antinociceptif du Cav3.1 (Kim, 2003). Ces résultats antagonistes reposent probablement sur des contributions différentielles de la même isoforme en fonction de sa localisation et/ou de son impact sur l'excitabilité cellulaire.

En ce qui concerne les canaux Cav3.3, les données de la littérature sont encore plus réduites : seule une étude utilisant l'approche par ARN antisens montre une réversion de l'allodynie mécanique et de l'hyperalgie thermique suite à une constriction chronique des DRG (Wen et al., 2006). Dans ce contexte, le canal Cav3.3 aurait un rôle pro-neuropathique

A l'inverse, de nombreuses études portent sur le rôle du canal Cav3.2 dans la perception douloureuse, notamment au niveau périphérique. En effet, le Cav3.2 est l'isoforme prédominante des canaux T dans les neurones sensoriels périphériques et de nombreux travaux ont montré son rôle dans l'excitabilité cellulaire et la perception somatosensorielle (Dubreuil et al., 2004; Heppenstall and Lewin, 2006; Nelson et al., 2007; Talley et al., 1999; Todorovic et al., 2001; White et al., 1989).

#### 4.1.1. Rôle du Cav3.2 dans la perception douloureuse.

Une classe de molécules endogènes a été identifiée dans les années 2000 comme capable d'induire une analgésie. Il s'agit de lipo-aminoacides, parmi lesquels la N-arachidonyl-glycine (NAGly) inhibe les courants évoqués par les 3 isoformes des courants T de manière réversible. Cet effet est particulièrement important sur le courant Cav3.2. De plus, cette inhibition n'est pas présente chez les souris ayant une délétion constitutive du canal Cav3.2 (KO-Cav3.2, Barbara et al., 2009). Chez ce KO constitutif, une diminution des réponses comportementales aux stimuli mécaniques, thermiques et chimiques a été mise en évidence, indiquant une implication du canal Cav3.2 dans la perception douloureuse aiguë (Choi et al.,

## CHAPITRE II :

---

2007). Il est à noter que cette étude n'a pas détecté d'effet de la délétion sur la perception douloureuse dans le modèle neuropathique SNL.

Le KD du Cav3.2 par injection intrathécale d'ARN antisens apporta la première preuve directe d'un rôle du Cav3.2 non seulement dans la perception douloureuse aiguë mais également neuropathique (Bourinet et al., 2005). En effet, ce traitement induit une antinociception ainsi qu'une anti-hyperalgie et anti-allodynie dans les modèles neuropathiques diabétique et de CCI, corrélées à une diminution du courant T dans les DRG (Bourinet et al., 2005; Messinger et al., 2010). Il empêche également le développement de l'hypersensibilité dans plusieurs modèles de douleur chronique comme l'IBS (Marger et al., 2011) et le SNC (*Spinal Nerve Cutting*, Takahashi et al., 2010), et de l'hyperalgie et l'allodynie mécanique induits par le sulfide d'hydrogène (Maeda et al., 2009; Okubo et al., 1937). Il a été montré par ailleurs que le blocage des isoformes Cav3.1 et Cav3.3 par l'approche antisens ne modifiait en rien la nociception (Bourinet et al., 2005).

Enfin, l'adressage membranaire du canal Cav3.2 et son activité sont régulés par l'ubiquitinylation des résidus lysine de la boucle intracellulaire III-IV (García-Caballero et al., 2014). En effet, l'utilisation d'un ARN *sh* (*short hairpin*) dirigé contre la déubiquitinase USP5 (*Ubiquitin Specific Protease 5*) induit une diminution de l'adressage du canal Cav3.2 à la membrane et une diminution du courant T. *In vivo*, ceci se traduit par une anti-hyperalgie mécanique dans les modèles de douleur inflammatoire et neuropathique CCI. De plus, le niveau d'USP5 est régulé positivement suite à la neuropathie induite par CCI, indiquant un mécanisme possible de régulation positive du canal Cav3.2. En accord avec cette hypothèse d'une surexpression des canaux T dans un contexte douloureux, il a été également montré dans le modèle SNI, que le niveau d'expression du canal Cav3.2 augmente spécifiquement dans les neurones à diamètre moyen des DRG ayant subi une lésion (Kang et al., 2018). Cet effet est associé à une augmentation de l'amplitude des dépolarisations suivant les PA (ADP : *After Depolarization*) aux potentiels hyperpolarisés (-85 à -95mV) indiquant un impact fonctionnel d'une régulation positive du canal Cav3.2 lors de la neuropathie.

Le Cav3.2 a donc un rôle certain dans la perception douloureuse neuropathique. Cependant, les résultats disponibles ne donnent que peu d'indication sur la localisation des canaux Cav3.2 mis en jeu. Ces canaux sont en effet exprimés aussi bien au niveau périphérique, dans les DRG, que central, dans la moëlle et plusieurs régions du cerveau (Talley et al., 1999) et les injections intrathécales d'ARN antisens sont susceptibles d'agir à ces différents niveaux

### *4.1.2. Localisation des canaux Cav3.2 impliqués dans la perception douloureuse*

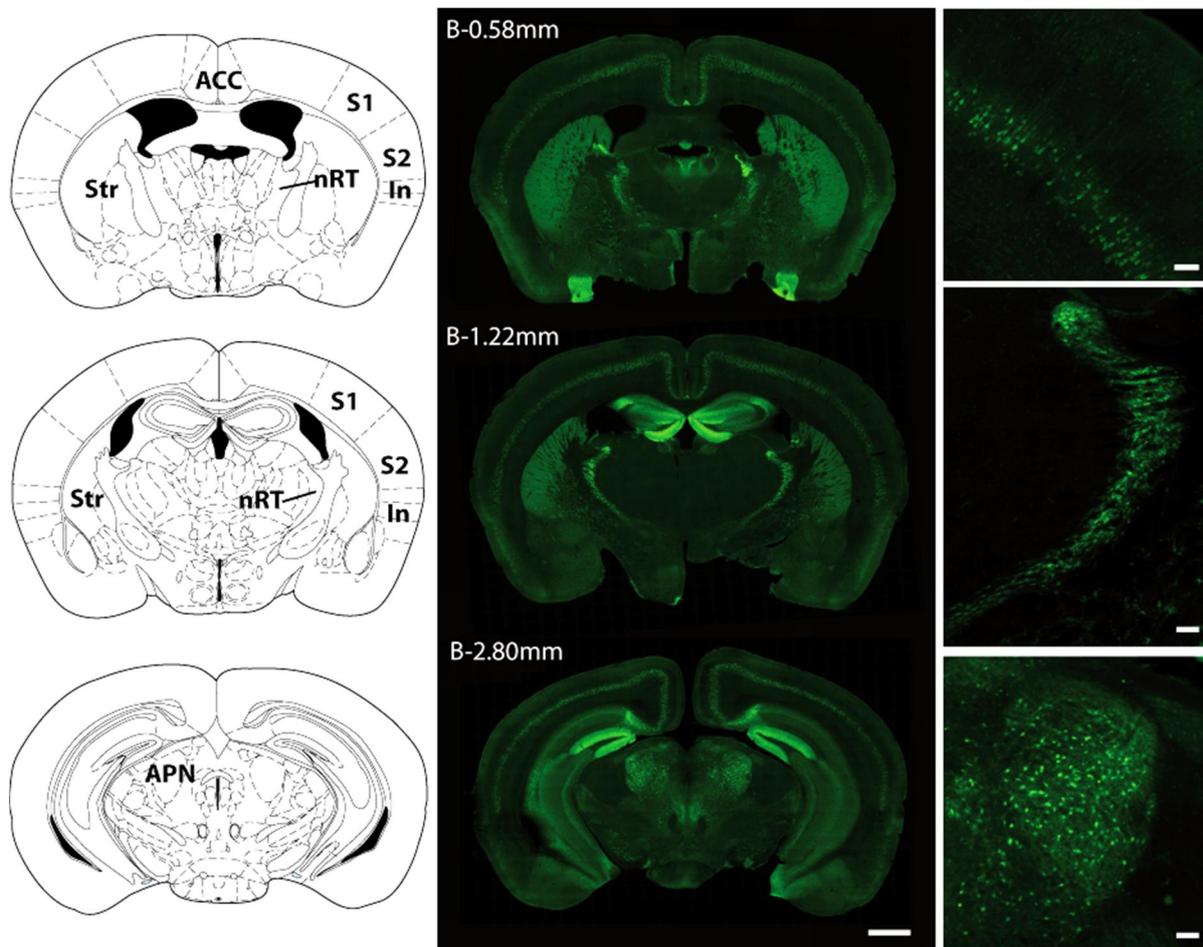
Peu d'études ont déterminé la localisation des neurones exprimant les canaux Cav3.2 impliqués dans la perception douloureuse aiguë ou chronique. Au niveau du bulbe rachidien, l'application de TTA-A2 diminue l'excitabilité des neurones sensoriels primaires, en augmentant le seuil de déclenchement du PA, et induit une analgésie mécanique, thermique et chimique. Ces effets sur l'excitabilité et la perception douloureuse sont abolis chez les souris KO-Cav3.2 (Francois et al., 2013). Une autre étude montre que le TTA-A2 ainsi que le paracétamol présentent des effets analgésiques lors de stimuli nociceptifs mécaniques ou chimiques (formaline). Ces derniers sont abolis chez les souris KO-Cav3.2 ainsi que suite à l'administration intra-cérébro-ventriculaire d'ARN antisens du Cav3.2. Ceci indique que les effets analgésiques du paracétamol reposent sur les canaux Cav3.2 supra-spinaux (Kerckhove et al., 2014). Enfin, chez le rat, après une CCI, le niveau d'expression du canal Cav3.2 augmente dans l'ACC et une augmentation du courant T est observée. De plus, l'administration d'un inhibiteur des canaux T (NNC 55-0396) diminue la fréquence des CPSE miniatures et supprime la décharge neuronale dans cette région. Ces effets s'accompagnent d'une atténuation de l'allodynie mécanique et thermique lors de la micro-injection de cet antagoniste dans l'ACC (Shen et al., 2015).

Ces études suggèrent que l'expression périphérique et centrale du canal Cav3.2 contribue à la perception douloureuse aiguë et chronique. Mais le rôle de ce canal demeure peu défini dans ces deux contextes, de par l'absence d'antagoniste spécifique de cette isoforme, mais aussi de par le peu de données décrivant précisément la localisation de la protéine Cav3.2 aux différents niveaux des voies de la nociception.

### 4.1.3. Expression périphérique et spinale du canal Cav3.2

Dans cette optique, l'équipe d'Emmanuel Bourinet a développé un modèle génétique murin, la lignée *knock-in* Cav3.2-eGFPflox (KI), chez laquelle un tag GFP a été inséré dans le locus *Cacna1h* du canal Cav3.2. Ceci leur a permis de localiser précisément l'expression périphérique et spinale du canal Cav3.2 à l'aide de marquages immunohistochimiques dirigés contre la GFP (Candelas et al., 2019; François et al., 2015). Ils ont ainsi déterminé qu'au niveau périphérique, le canal Cav3.2 est spécifiquement exprimé dans les fibres A et C-LTMR, innervant les follicules pileux de la peau, ainsi que le long des fibres (François et al., 2015). Au niveau spinal, le canal Cav3.2 est exprimé dans une population large et diversifiée de neurones de la couche II (Candelas et al., 2019). Cette lignée KI présente également des séquences loxP dans le locus du canal Cav3.2, permettant sa délétion par la *cyclic recombinase* (Cre). Ainsi, nos collaborateurs ont pu produire une délétion spécifique du canal dans les C-LTMR, par croisement avec la lignée murine Nav1.8-Cre. Ils ont ainsi démontré le rôle du canal Cav3.2 dans la sensibilité tactile aiguë et dans le développement de l'allodynie mécanique, thermique et chimique dans le modèle neuropathique SNI (François et al., 2015). Enfin, sa délétion spécifique spinale par injection locale de la Cre induit une diminution du comportement de décharge transitoire des neurones spinaux et de l'amplitude des dépolarisations en rebond, accompagnés d'une modification des cinétiques des PA (Candelas et al., 2019).

Ces résultats suggèrent que les canaux Cav3.2 sont impliqués dans la perception douloureuse aiguë et chronique à différents niveaux de la chaîne de traitement des informations nociceptives. Afin de compléter l'analyse du rôle de ces canaux en nous focalisant sur les structures supra-spinales du système nociceptif, nous avons tiré profit de la lignée murine KI-Cav3.2-eGFPflox et identifié une forte expression du canal Cav3.2 dans le Noyau Prétectal Antérieur (APN, Figure 13). Le chapitre suivant sera consacré à une description anatomofonctionnelle de ce noyau afin d'introduire le contexte de nos résultats.



**Figure 13 | Expression du canal Cav3.2-GFP au niveau supra-spinal (données personnelles).**

Observation en microscopie à épifluorescence à champ large du marquage immunohistochimique du canal Cav3.2-GFP (vert) dans le cerveau de souris KI-Cav3.2-eGFPflox, sur trois niveaux de tranches coronales (du plus antérieur en haut, au plus postérieur en bas).

ACC : Cortex Cingulaire Antérieur ; APN : Noyau Prétectal Antérieur ; In : Cortex Insulaire ; nRT : Noyau Réticulé du Thalamus ; S1/S2 : Cortex Somatosensoriel primaire et secondaire ; St : Striatum



**CHAPITRE III :**  
**LE NOYAU PRETECTAL ANTERIEUR**

### 1. Organisation du préteetum

Bien que souvent considéré comme d'origine mésencéphalique dans la littérature, le préteetum est une structure dérivant du neuroépithélium diencéphalique. En effet, au cours du développement les prosomères 1 et 2 du diencéphale se différencient en une masse pronucléaire donnant respectivement naissance à l'épithalamus et au préteetum (Jones, 1985). Ce dernier est localisé à l'interface entre le mésencéphale et le thalamus. L'observation de ce complexe chez plusieurs mammifères non humains, notamment le chat et le rat, a permis d'identifier 5 noyaux préteetaux par homologie de structure et de fonction (Figure 14 ; Kanaseki and Sprague, 1974; Berman, 1977; Weber and Harting, 1980; Hutchins, 1991; Rees and Roberts, 1993) :

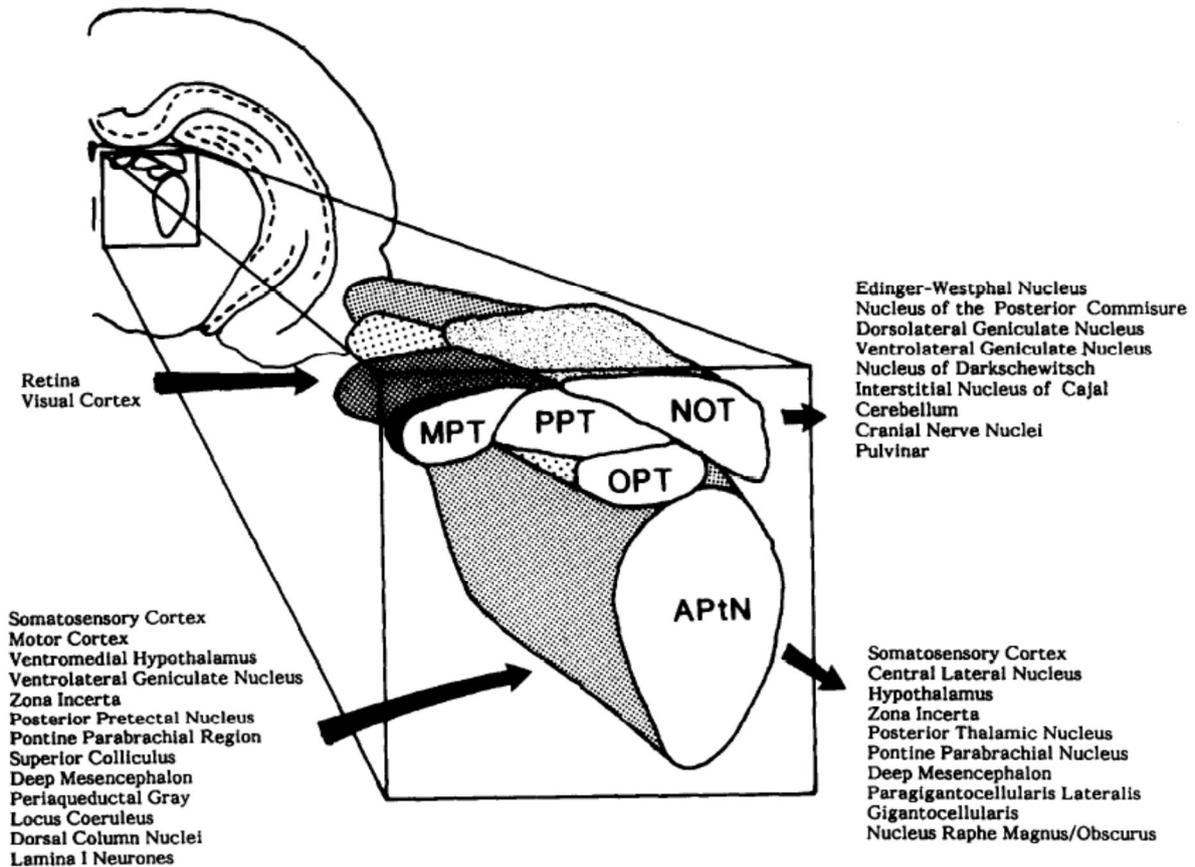
- Le noyau préteetal antérieur (APN : *Anterior Pretectal Nucleus*)
- Le noyau préteetal médian (MPT : *Medial Pretectal nucleus*)
- Le noyau du tractus optique (NOT : *Nucleus of the Optic Tract*)
- Le noyau préteetal olivaire (OPT : *Olivary Pretectal nucleus*)
- Le noyau préteetal postérieur (PPT : *Posterior Pretectal nucleus*)

L'organisation du préteetum est similaire chez les mammifères primates et non primates (Hutchins and Weber, 1985). D'après une étude ancienne, la nomenclature classiquement utilisée chez l'humain différait car elle était basée sur des observations faites chez le lapin et la tortue (Kuhlenbeck and Miller, 1949). A des fins de clarté, des auteurs ont donc transposé la nomenclature présentée ci-dessus chez l'Homme en se fondant sur des homologies de positions et de marquages chimiques (Borostyánkoi-Baldauf and Herczeg, 2002).

Le préteetum est connu chez les mammifères pour son rôle dans le contrôle des réflexes oculomoteur et pupillaire à la lumière. En effet, les lésions de ce complexe induisent entre autres un déficit dans les comportements visuo-guidés, une perception diffuse de la lumière ou encore un nystagmus optocinétique (Rees and Roberts, 1993). La plupart des noyaux préteetaux, notamment NOT et l'OPT, reçoivent des afférences directes de la rétine (Garey and Powell, 1968; Hutchins and Weber, 1985; Scalia and Arango, 1979). Ces noyaux envoient également des projections vers des structures du système visuel et oculomoteur, telles que le noyau d'Edinger Westphal (EWN), le noyau de Darkschewitsch (Dk) et le noyau interstitiel de Cajal (Inc, Carpenter and Pierson, 1973; Berman, 1977; Weber and Harting, 1980).

## LE NOYAU PRETECTAL ANTERIEUR

En revanche, contrairement aux autres noyaux prétectaux, l'APN est très peu connecté avec des structures visuelles. Si des afférences rétiniennes ont été observées vers l'APN chez le chat, elles sont absentes chez le rat et le primate (Hutchins, 1991; Scalia and Arango, 1979). Ce noyau est en réalité associé à des fonctions somatosensorielles, notamment antinociceptives (Rees and Roberts, 1993).



**Figure 14 | Organisation du complexe prétectal chez le rat (d'après Rees and Roberts, 1993).**

Le prétectum est organisé en 5 noyaux. Leurs afférences et efférences respectives sont représentées par des flèches. Les connexions visuelles impliquent essentiellement le NOT, l'OPT et le MPT. L'APN présente des connexions essentiellement somatosensorielles.

APtN/APN : Noyau Prétectal Antérieur ; NOT : Noyau du Tractus Optique ; MPT : Noyau Prétectal Médian ; PPT : Noyau Prétectal Postérieur.

## 2. Organisation du noyau prétectal antérieur

### 2.1. Anatomie de l'APN

L'APN est le noyau le plus rostral et le plus grand du complexe prétectal. Son organisation cellulaire a été étudiée chez plusieurs espèces à l'aide de marquages des corps cellulaires et de la myéline. Les études réalisées chez les mammifères non primates (chat, lapin, rat, musaraigne) ont permis de distinguer deux régions en fonction de leur architecture et de la densité cellulaire : une région dorsale (APNd) et une région ventrale (APNv).

Dans ces espèces, l'APNd se caractérise par une plus forte densité de corps cellulaires que l'APNv et un neuropile de fibres myélinisées. Les corps cellulaires sont de tailles homogènes, petites et moyennes. À l'inverse, les corps cellulaires de l'APNv ont des tailles plus disparates, avec des neurones de grande et de petite tailles et cette région est traversée par de larges faisceaux myélinisés, diminuant la densité des corps cellulaires. Ces deux régions sont donc également distinguées comme compacte (APNc, *pars compacta*) et réticulée (APNr, *pars reticulata*, Scalia, 1972; Kanaseki and Sprague, 1974; Berman, 1977; Avendaño and Juretschke, 1980; Gregory, 1985; Kitao and Nakamura, 1987). Sur la base de cette hétérogénéité de composition cellulaire, mais également en raison de différences dans leurs afférences certaines études suggèrent qu'il s'agirait de noyaux distincts, (Foster et al., 1989; Scalia, 1972). Chez le primate, l'APN est de taille réduite, en comparaison aux autres mammifères et aucun élément cyto-architectural n'a permis de distinguer une région compacte et une région réticulaire (Hutchins and Weber, 1985).

### 2.2. Connectivité anatomique de l'APN

La connectivité de l'APN a principalement été étudiée du point de vue anatomique. Elle a été établie par injections de traceurs antérogrades et rétrogrades tels que la *horseradish peroxidase* associée ou non à la *wheat-germ agglutinin* (HRP et WGA-HRP), des acides aminés tritiés, le marqueur rétrograde FastBlue, ainsi que par marquage en imprégnation argentique des fibres dégénérescentes suite à la lésion de l'APN (marquage de Fink-Heimer). Ces travaux ont mis en évidence des projections de l'APN vers le prétectum contralatéral, essentiellement vers l'APN, le PPT, le MPT (Berman, 1977), ainsi que diverses connexions avec des systèmes extra-prétectaux.

### 2.2.1. Connexions anatomiques avec le système visuel et oculomoteur

Les connexions du prétectum avec le système visuel ont d'abord été étudiées chez le chat où des afférences rétiniennes bilatérales dans le NOT ont été montrées (Berman, 1977; Garey and Powell, 1968). Des projections rétiniennes ont également été décrites chez le rat dans l'OPT et le NOT (Scalia and Arango, 1979). Plus récemment, une projection rétinienne bilatérale vers l'APN chez le chat a été rapporté (Hutchins, 1991) bien qu'elle ne fasse pas l'objet d'un consensus (Kanaseki and Sprague, 1974). Cette projection existerait aussi chez le lapin et la musaraigne mais pas chez le rat ni la souris (Scalia, 1972). Chez le singe, une étude rapporte un faible marquage dans l'APN suite à l'injection d'acide aminé tritié dans la rétine (Hutchins and Weber, 1985). Les auteurs précisent cependant qu'il est impossible de déterminer si ce marquage correspond à des terminaisons synaptiques ou à des fibres de passage. Les afférences rétiniennes vers l'APN semblent donc varier d'une espèce à l'autre et d'une étude à l'autre mais l'absence de projection chez le rat et la souris paraît établie.

Cependant, des afférences de l'APN en provenance d'autres régions du système visuel et oculomoteur ont été observées, notamment chez le rat (Cadusseau and Roger, 1991; Foster et al., 1989). C'est le cas du corps genouillé latéral ventral (vLGN) qui fait partie du noyau sensoriel primaire thalamique recevant des informations visuelles. C'est également le cas des colliculi supérieurs, plus particulièrement des couches superficielles, ainsi que du noyau latéropostérieur (LP) thalamique et du Dk oculomoteur. Enfin, des afférences du cortex visuel (aires 17 et 18) ont été observées chez la musaraigne (Weber and Harting, 1980) et chez le rat (Cadusseau and Roger, 1991). De plus, des afférences provenant d'autres noyaux prépectaux, impliqués dans le contrôle oculomoteur, tels que l'OPT et le PPT, ont été décrites chez le rat (Cadusseau and Roger, 1991; Foster et al., 1989).

Plusieurs structures visuelles et oculomotrices projettent donc vers l'APN. Ce noyau envoie également des projections réciproques vers ces systèmes. En effet, il projette vers les colliculi supérieurs, le noyau de Darkshewitsch, le noyau interstitiel de Cajal, le vLGN et le pulvinar (Berman, 1977; Itoh, 1977; Weber and Harting, 1980; Onodera and Hicks, 1995). Ces projections décrites chez le chat et la musaraigne n'ont cependant pas été trouvées chez le rat ou la souris.

Ainsi, il existerait des connexions de l'APN avec des noyaux visuels et oculomoteurs, souvent réciproques comme pour le vLGN, le Dk et les colliculi supérieurs. Cependant, celles-ci varient d'une espèce à l'autre et certaines ne font pas l'objet d'un consensus. Cette incertitude résulte probablement des limites des techniques de traçages antérogrades, ne permettant pas de déterminer si les marquages observés correspondent à des terminaisons synaptiques ou à des fibres de passage. Par ailleurs, du point de vue fonctionnel, aucune implication spécifique de l'APN dans la vision ou le contrôle oculomoteur n'a été montrée à ce jour. En revanche, de nombreuses connexions avec le système somatosensoriel ont été décrites, associées à un rôle dans la nociception (cf. 3)

### 2.2.2. *Connexions anatomiques avec le système somatosensoriel*

Des études de traçages ont montré que l'APN reçoit des afférences ascendantes en provenance de noyaux du tronc cérébral. Notamment, elle reçoit des projections des noyaux gracile et cunéen des colonnes dorsales, avec une organisation somatotopique, observées chez le rat (Yoshida et al., 1992), le chat (Berkley and Mash, 1978; Wiberg and Blomqvist, 1984a) et le singe (Wiberg et al., 1987). Elle reçoit également des afférences du noyau sensoriel trigéminale SP5, notamment des sous-noyaux interpolaris (SP5i) et oralis (SP5o), observées chez le rat (Veinante et al., 2000; Yoshida et al., 1992). Ces afférences transmettraient des informations somatosensorielles relatives à plusieurs vibrisses, vers l'APN, le PO et la ZI (Veinante and Deschênes, 1999). Enfin, des projections clairsemées issues directement de neurones de la moëlle épinière ont été rapportées, en provenance des parties lombaire et cervicale du tractus spino-thalamique, chez le singe (Wiberg et al., 1987), chez le chat (Wiberg and Blomqvist, 1984b) et chez le rat (Lund and Webster, 1967; Cliffer et al., 1991). L'APN reçoit également des afférences corticales en provenance de la couche V du cortex somatosensoriel, observées chez le chat (Berkley and Mash, 1978), le rat (Foster et al., 1989) et la souris (Aronoff et al., 2010; Mao et al., 2011; Sumser et al., 2017).

En termes d'éfférences, des projections descendantes de l'APN susceptibles d'impacter l'intégration des informations somatosensorielles ont également été décrites. En effet, des projections directes ont été rapportées vers la formation réticulée mésencéphalique chez le chat (Berman, 1977; Itoh, 1977), la musaraigne (Weber and Harting, 1980) et le rat, plus particulièrement dans les noyaux gigantocellularis et paragigantocellularis (Gi, PGi, Zagon et al., 1995). De nombreuses fibres ont également été décrites dans le pont chez le rat (Cadusseau and Roger, 1991; Terenzi et al., 1995). Mais l'APN envoie également des

projections ascendantes vers des noyaux thalamiques. Une étude des terminaisons synaptiques de l'APN dans le thalamus montre que ces projections ciblent les noyaux d'ordre supérieur (Bokor et al., 2005). Ces noyaux thalamiques sont caractérisés par leur très forte connexion en provenance des neurones de la couche V du cortex, par opposition aux noyaux de premier ordre dont l'afférence excitatrice principale provient de la périphérie (Guillery and Sherman, 2002). Ainsi, chez le rat, il a été montré que les noyaux postérieur (Po), éthmoïde (Eth) et postérieur triangulaire (PoT) traitant des informations somatosensorielles reçoivent des afférences de l'APN (Bokor et al., 2005).

### 2.2.3. Autres connexions de l'APN avec des structures thalamiques et associées

D'autres structures n'appartenant pas à un système défini entretiennent des connexions avec l'APN. Des projections thalamiques ont été décrites vers les noyaux intralaminaires, notamment vers le noyau centrolatéral (CL) mais aussi vers le centromédian (CM) et le paracentral (PC), chez le chat (Berman, 1977; Itoh, 1977; Kitao et al., 1989), la musaraigne (Weber and Harting, 1980) et le rat (Carstens et al., 1990; Terenzi et al., 1995). Une projection vers le noyau latérodorsal (LD) du thalamus a également été décrite chez le rat (Robertson, 1983). Ce dernier considéré comme un noyau associatif aurait une fonction somatosensorielle (Bezudnaya and Keller, 2008). Une étude récente a employé des marquages au BDA (*Biotinylated Dextran Amine*) et PHAL (*Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin*) afin d'observer les terminaisons synaptiques de l'APN dans le thalamus. Les auteurs montrent la présence de terminaisons dans le thalamus ipsilatéral, non seulement dans le PO, l'Eth et le PoT somatosensoriels, mais également dans le LD et le LP visuels, dans le ventro-médian moteur, le médio-dorsal associatif ainsi que dans les noyaux intralaminaires centrolatéral, paracentral et parafasciculaire (Bokor et al., 2005). Enfin, une connexion réciproque de l'APN avec la ZI, notamment ventrale (vZI), a aussi été observée chez le rat (Cadusseau and Roger, 1991; Foster et al., 1989; Giber et al., 2008; Terenzi et al., 1995), le chat (Berman, 1977; May et al., 1997) et la musaraigne (Weber and Harting, 1980). La ZI serait impliquée dans le contrôle du passage d'informations sensorielles entre le thalamus et d'autres structures (Trageser and Keller, 2004; Trageser et al., 2006; Watson et al., 2015). Les études anatomiques ont donc démontré une large connectivité de l'APN. Cependant, l'observation de fibres dans des structures cibles potentielles ne suffit pas à démontrer que des connexions existent avec ces structures, dans la mesure où il pourrait s'agir uniquement de fibres de passages (Hutchins and Weber, 1985).

### 2.3. Connectivité fonctionnelle de l'APN

#### 2.3.1. Connectivité intra-cérébrale de l'APN

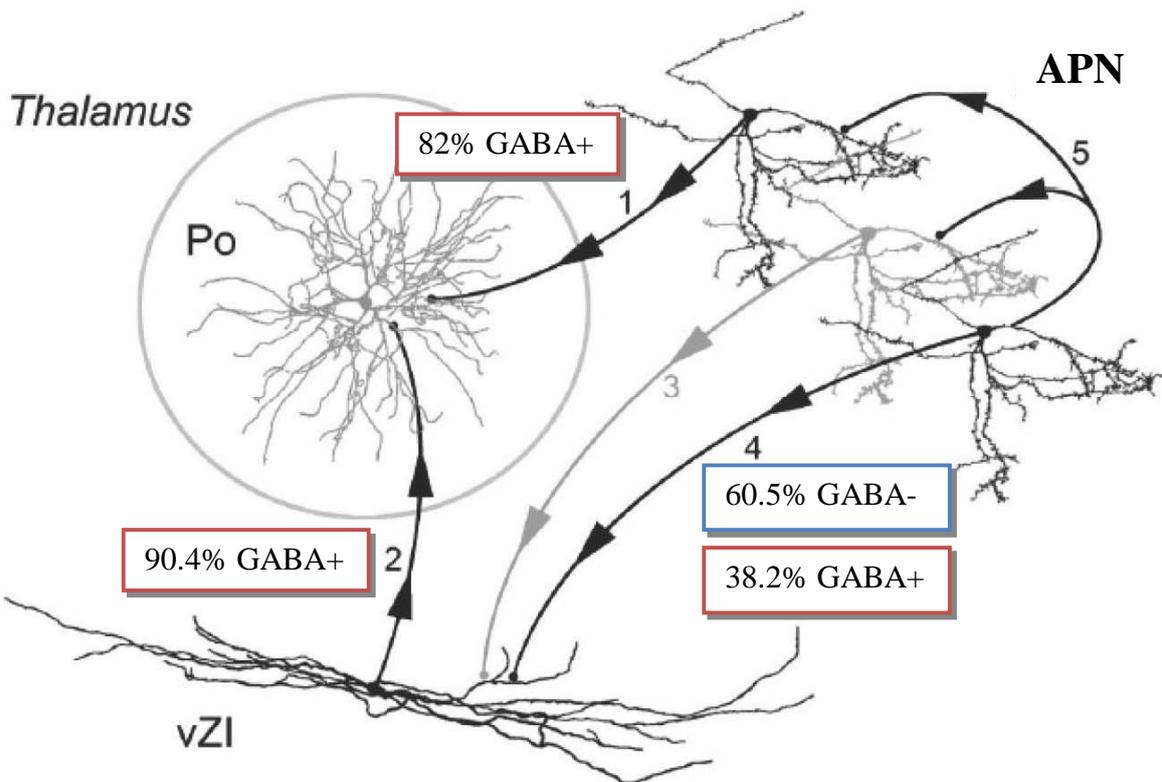
Afin d'approfondir cette description purement anatomique des afférences et efférences de l'APN, des travaux décrivant la connectivité fonctionnelle de ces projections ont été réalisés, notamment chez le rat anesthésié. La connexion entre l'APN et les noyaux thalamiques d'ordre supérieur a été étudiée chez le rat (Bokor et al., 2005). Cette étude montre que les terminaisons synaptiques mises en jeu sont majoritairement GABAergiques (82%, Figure 15) et qu'elles sont capables d'évoquer un courant inhibiteur monosynaptique dépendant des récepteurs GABA-A (bicuculline sensible) dans les neurones du noyau postérieur thalamique (PO). En terme d'impact sur l'excitabilité de ces neurones, les auteurs ont montré que les PPSI évoqués par la stimulation électrique de l'APN sont capables de supprimer la décharge du neurone thalamique cible et d'y induire une dépolarisation en rebond, parfois associée à une bouffée de potentiels d'action. Cet effet a été observé non seulement *in vitro* mais également *in vivo*. Cette étude démontre donc l'existence d'une forte connexion fonctionnelle inhibitrice de l'APN vers les noyaux thalamiques d'ordre supérieur.

La connexion entre l'APN et la vZI a également été décrite d'un point de vue fonctionnel chez le rat (Giber et al., 2008, Figure 15). En effet, l'analyse des terminaisons synaptiques de l'APN dans la ZI par microscopie électronique a montré que 60.5% sont GABA-négatives (GABA-) et 38.2% GABA-positives (GABA+). Ces deux types de terminaisons contactent préférentiellement les dendrites moyens. Les somas sont contactés dans de rares cas par des fibres GABA-. La projection APN-ZI est donc majoritairement inhibitrice. De façon surprenante, la composante inhibitrice de la voie APN-ZI semble inexistante chez le chat. En effet, chez cette espèce, les synapses APN-ZI sont asymétriques, morphologie caractérisant généralement des synapses excitatrices (May et al., 1997).

Par ailleurs, la projection ZI-thalamus qui innerve préférentiellement les noyaux thalamiques d'ordre supérieur (Halassa and Acsády, 2016) est très majoritairement GABAergique (Barthó et al., 2002, Figure 15). L'APN pourrait donc exercer un contrôle complexe sur l'activité des noyaux thalamiques d'ordre supérieur reposant sur une projection directe essentiellement inhibitrice et une projection indirecte via la ZI, pouvant induire un renforcement ou une levée d'inhibition selon l'entrée excitatrice ou inhibitrice impliquée respectivement.

## LE NOYAU PRETECTAL ANTERIEUR

De plus, l'implication de l'APN dans l'excitabilité du PO a été observée dans le syndrome de douleur centrale (CPS : *Central Pain Syndrome*) chez le rat. En effet, l'activité spontanée et évoquée du PO augmente suite à une lésion spinale, en partie du fait d'une diminution de l'entrée inhibitrice en provenance de la ZI (Masri et al., 2009). Les mêmes auteurs ont montré que l'activité de l'APN augmente également dans ce modèle de CPS, notamment dans les neurones projetant sur la ZI. La suppression de l'activité de l'APN chez des rats contrôles étant corrélée à une augmentation de l'activité spontanée du PO, ces résultats suggèrent que l'APN régule l'entrée inhibitrice de la ZI vers le PO et que son hyperexcitabilité en CPS pourrait contribuer à l'hyperactivité du PO.



**Figure 15 | Diagramme de la connectivité entre le thalamus, la ZI et l'APN (adapté de Giber et al., 2008).**

Projection excitatrice : gris ; projection inhibitrice : noir.

Le PO reçoit des afférences majoritairement GABAergiques de l'APN (1) et la ZI (2) (Barthó et al., 2002; Bokor et al., 2005). L'APN exerce également un contrôle sur la ZI par des projections, à 38% GABAergiques (voie 4, Giber et al., 2008). De nombreuses collatérales axonales intra-APN existent (voie 5)

PO : Noyau Postérieur thalamique ; vZI : Zona Incerta ventrale ; APN : Noyau Prétectal Antérieur.

Outre le thalamus, d'autres régions du cerveau répondent aux stimulations de l'APN. En effet, chez le rat anesthésié, des neurones de la région parabrachiale pontine (PPR) reçoivent une entrée excitatrice lors de la stimulation électrique de l'APN et réciproquement (Terenzi et al., 1992). De même, la stimulation de l'APN excite des cellules de la région ventro-latérale du bulbe rachidien (VLM, Terenzi et al., 1991). L'APN n'est donc pas un noyau exclusivement inhibiteur mais envoie également des projections excitatrices.

### 2.3.2. *Connectivité spinale de l'APN*

La connectivité fonctionnelle avec les voies sensorielles spinales a également été étudiée. La stimulation électrique des colonnes dorsales contralatérales (noyaux gracile et cunéen), ainsi que du DLF ipsilatéral évoque une excitation orthodromique dans l'APN (Rees and Roberts, 1989; Rees et al., 1995). L'APN reçoit donc des afférences excitatrices de la moëlle épinière. Par ailleurs, des projections descendantes ont également été mises en évidence du point de vue fonctionnel. En effet, la stimulation électrique de l'APN excite les neurones nociceptifs spinaux des cornes dorsales de la moëlle épinière dans les couches superficielles et inhibe les neurones spinaux à champs récepteurs multiples des couches profondes (Rees and Roberts, 1989; Rees et al., 1995). Elle inhibe également la plupart des neurones nociceptifs des noyaux somatosensoriels trigéminaux du tronc cérébral (SP5 subnucleus oralis, interpolaris et caudalis, Chiang et al., 1992). Il y a donc une connectivité fonctionnelle descendante de l'APN vers les neurones spinaux et trigéminaux, impliquée dans le contrôle descendant de la douleur. Cette connectivité fonctionnelle n'est cependant pas forcément directe d'un point de vue anatomique, et les voies spinales mises en jeu n'ont pas été identifiées (cf. 3.2.3.). Ainsi, l'APN est un carrefour de connectivité ascendante et descendante au sein du système somatosensoriel (Figure 18), suggérant un rôle majeur dans l'intégration et la modulation des messages nociceptifs.

### 3. Rôle de l'APN dans la somesthésie et la nociception

#### 3.1. Découverte de l'implication de l'APN dans la nociception

De nombreuses études de stimulation électrique de diverses régions, notamment dans le tronc cérébral, ont été réalisées afin d'observer l'impact sur la perception de la douleur (Reynolds, 1969). Elles ont permis d'identifier plusieurs structures dont la stimulation produisait une analgésie (SPA : *Stimulation Produced Analgesia*) se traduisant par une diminution des réponses comportementales aux stimuli douloureux (Mayer et al., 1971; Rhodes and Liebeskind, 1978). Une des structures les plus étudiées dans ce contexte fut la PAG, capable d'induire une analgésie équivalente ou supérieure à une dose de 10mg/kg de morphine, en diminuant les réponses des neurones sensoriels spinaux par contrôle descendant (Mayer and Liebeskind, 1974). Parmi les autres structures identifiées se trouvent l'habenula (Mahieux and Benabid, 1986 ; Terenzi et al., 1990 ; Cohen and Melzack, 1986), la RVM (Gebhart et al., 1983; Prieto et al., 1983; Sandkühler and Gebhart, 1984b, 1984a), le PB (DeSalles et al., 2009), le Lc (Segal and Sandberg, 1977), les cortex préfrontal et somatosensoriel (Hardy, 1985; Chiang et al., 1990), ainsi que l'APN (Roberts and Rees, 1986).

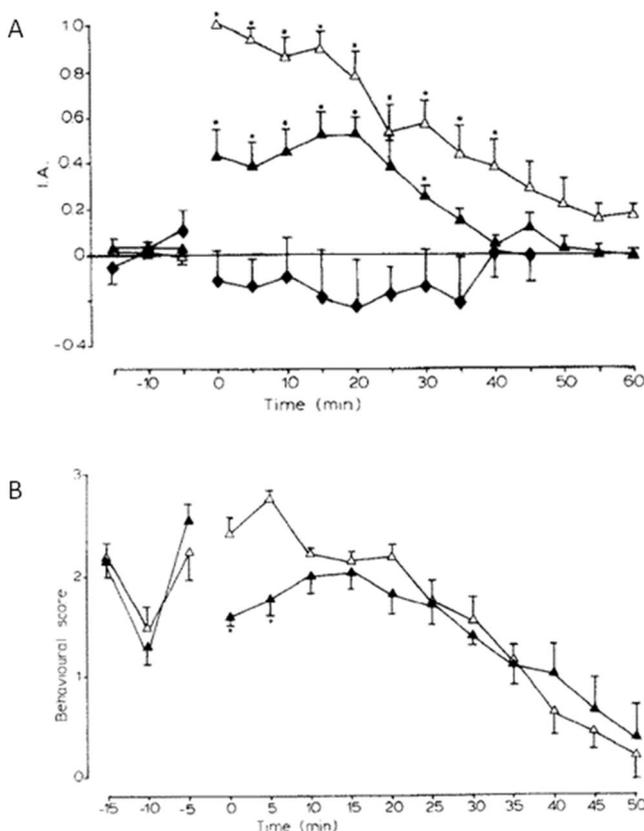
Les stimulations de ces régions, notamment pontines et mésencéphaliques, peuvent également évoquer des réactions aversives (Olds, 1963; Hilton and Redfern, 1986). Or le stress *per se* est capable d'induire de l'analgésie (Butler and Finn, 2009; Parikh et al., 2013). De plus, parmi les effets collatéraux potentiels des stimulations cérébrales, des déficits moteurs et des césures peuvent altérer les réactions des animaux. Ainsi, l'analgésie induite après stimulation électrique de certaines de ces régions pourrait être qu'un effet indirect. Par exemple, les stimulations de la PAG et du *Nucleus Raphe Magnus* (NRM) évoquent de fortes réactions d'évitement à de faibles intensités de stimulation (Oleson et al., 1980). Des travaux ont donc visé à établir la corrélation entre les comportements d'analgésie et d'aversion. L'APN a été identifié comme étant une des seules régions dont la stimulation ne générât aucune réaction aversive, ôtant la possibilité d'un biais dû au stress. Sa stimulation n'induit pas non plus de déficit moteur ni de changement de l'activité électro-encéphalographique suggérant qu'aucune altération motrice ou césure ne pouvait biaiser ces résultats. (Prado and Roberts, 1985; Rhodes and Liebeskind, 1978). Par ailleurs, l'APN est la région cérébrale requérant la plus faible intensité de stimulation pour évoquer une analgésie (Prado and Roberts, 1985). Ces

observations font de l $\alpha$ APN un bon candidat pour des applications thérapeutiques de stimulations cérébrales.

### 3.2. Rôle de l $\alpha$ APN dans la perception de la douleur aiguë

#### 3.2.1. Effet antinociceptif de la stimulation de l $\alpha$ APN

Plusieurs travaux ont ainsi été menés, notamment chez le rat, pour étudier les effets antinociceptifs de la stimulation de l $\alpha$ APN dans le cadre de douleurs aiguës. La stimulation électrique de cette région chez le rat éveillé atténue les réponses comportementales à des stimulations nociceptives. Cet effet a été observé dans le cadre d'une stimulation thermique chaude de la queue (test du *Tail-Flick*, Figure 16A), d'une stimulation mécanique par pression et pincement de la patte (Figure 16A), et chimique dans la phase précoce de l'hypersensibilité induite par injection intraplantaire de formaline (Figure 16B, Rhodes and Liebeskind, 1978; Roberts and Rees, 1986; Rees and Roberts, 1987; Wilson et al., 1991; Terenzi et al., 1992). Cet effet antinociceptif de la stimulation de l $\alpha$ APN a également été observé sur le réflexe d'ouverture de la mâchoire (*Jaw Opening Reflex*, JOR, Chiang et al., 1991). Seul le test de la plaque chauffante ne révèle pas d'effet en SPA (*Stimulation Produced Analgesia*, Figure 16A).



**Figure 16 | Effets antinociceptifs de la stimulation électrique de l $\alpha$ APN (d'après Wilson et al., 1991)**

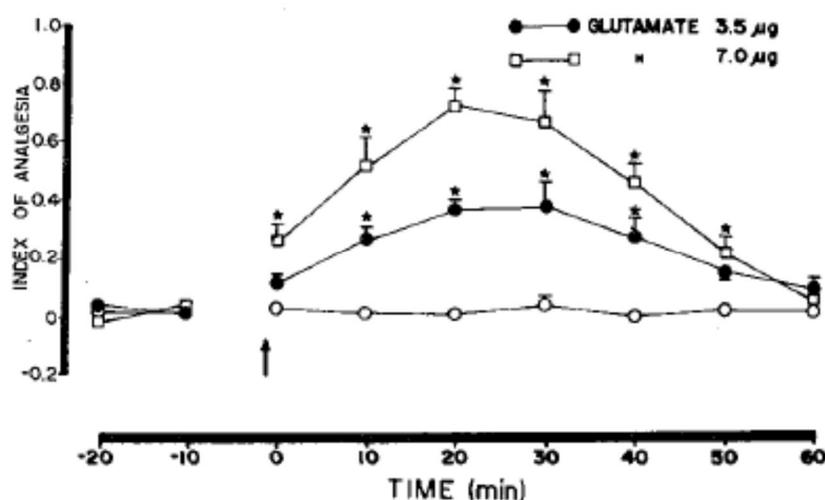
(A) Effet de la stimulation électrique de l $\alpha$ APN sur les réponses comportementales lors des tests du *Tail-Flick* (  $\Delta$  ), de pression de la patte (  $\square$  ) et de la plaque chauffante (  $\circ$  ). L'indice d'analgésie (IA) correspond à la différence normalisée entre les latences de réponses avant et après stimulation de l $\alpha$ APN. L'axe des abscisses correspond au temps après la stimulation de l $\alpha$ APN (à T = 0min).

(B) Mesure du comportement nociceptif suite à l'injection intraplantaire de formaline (à T = 0min) avec (  $\Delta$  ) ou sans (  $\square$  ) stimulation électrique de l $\alpha$ APN.

\* p < 0.05

## LE NOYAU PRETECTAL ANTERIEUR

Les stimulations électriques demeurent cependant peu précises car elles peuvent aussi bien activer les corps cellulaires de la zone stimulée que des fibres de passage. L'utilisation de glutamate pour stimuler l $\alpha$ APN a permis de montrer que les effets observés en *Tail-Flick* et en JOR ne sont pas dus à la stimulation de fibres de passage mais bien à celle de l $\alpha$ APN même (Chiang et al., 1991; Prado, 1989). Cet effet est par ailleurs dose dépendant (Figure 17). L $\alpha$ APN a donc un rôle antinociceptif dans des contextes de douleur aiguë.



**Figure 17 | Effet de l'injection de glutamate dans l $\alpha$ APN sur la réponse comportementale en test de tail-flick (d'après Prado, 1989).**

0 µg (□), 3.5µg (●) ou 7.0µg (■) de glutamate dilué dans 0.5µL de solution saline ont été injectés pendant 3min dans l $\alpha$ APN chez 10 rats. Le début de l'injection est indiqué par une flèche.

\*  $p < 0.05$

### 3.2.2. Mécanismes de l'antinociception médiée par l'APN

Afin de débiter l'étude des mécanismes sous-jacents à l'antinociception évoquée par la stimulation de l'APN, des marqueurs d'activité ont été observés suite à des stimulations nociceptives aiguës. Ainsi, il a été montré que l'injection intraplantaire de formaline chez le rat induit une augmentation de la consommation de <sup>14</sup>C-déoxyglucose dans l'APN. Cet effet de l'ordre de 24% était observé en bilatéral dès la phase précoce (Porro et al., 1991). Cette étude ainsi que les enregistrements électrophysiologiques des réponses de neurones de l'APN aux stimulations nociceptives aiguës suggèrent que l'APN opère bien une intégration des signaux nociceptifs (Rees et al., 1995).

L'injection de différents agonistes a permis de mettre en évidence des voies de neuromodulation mises en jeu dans l'antinociception médiée par l'APN, dans des contextes de douleur aiguë. Comme nous l'avons vu, l'injection de glutamate dans l'APN induit une antinociception dose-dépendante en test de *Tail-Flick* chez le rat (Figure 17 ; Prado, 1989). Il en est de même lors de l'injection d'agonistes sérotoninergiques (notamment des récepteurs 5-HT-1B) et opioïdes (notamment des récepteurs  $\mu$ ), mais pas lors de l'injection d'acétylcholine, de carbachol, de norépinephrine ou de dopamine (Mamede Rosa and Prado, 1997; Prado, 1989). La sérotonine et les opioïdes endogènes pourraient donc être les neurotransmetteurs médiant, au moins en partie, l'antinociception de l'APN, via l'activation de récepteurs 5-HT-1B et  $\mu$ -opioïdes.

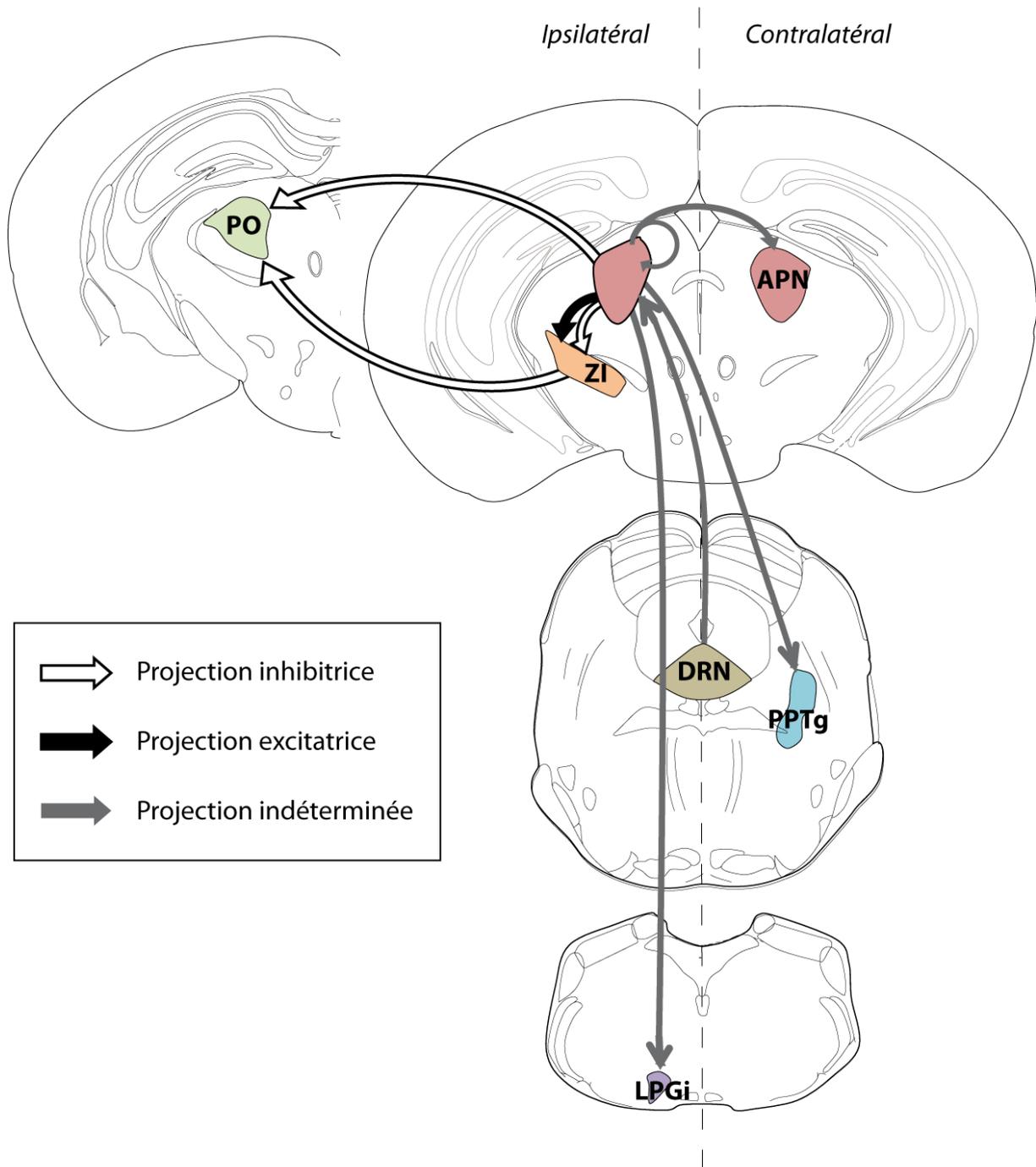
### 3.2.3. Voies de l'antinociception médiée par l'APN

Afin de déterminer quelles voies étaient impliquées dans l'antinociception évoquée par la stimulation de l'APN, les réponses des neurones spinaux ont été enregistrées. Ainsi, la stimulation de l'APN évoque une inhibition de certains neurones localisés dans les couches profondes des cornes dorsales de la moëlle épinière et une excitation des neurones des couches superficielles. Parmi les neurones à champs récepteurs multiples inhibés dans les couches profondes, certains ont été identifiés comme des neurones de projections dans le tractus antérolatéral (ALF) contralatéral. De plus, la lésion du DLF ipsilatéral, annule l'effet de la stimulation de l'APN, tandis que la lésion de la voie des colonnes dorsales n'a aucun impact (Rees and Roberts, 1987; Rees et al., 1995). L'antinociception médiée par l'APN implique donc le DLF, qui fut également démontrée dans le modèle d'analgésie induite par

électro-acupuncture en *Tail-Flick* (Silva et al., 2010). Les auteurs avancent l'hypothèse selon laquelle des stimuli nociceptifs exciteraient les neurones des couches superficielles envoyant des projections excitatrices vers l'APN qui inhiberait à son tour les neurones spinaux profonds projetant dans l'ALF contralatéral pour réduire la perception du stimulus douloureux (Rees et al., 1995).

Cependant, aucune projection directe de l'APN dans la moëlle épinière n'a été démontrée. Ceci suggère l'existence d'une ou plusieurs structures relais dans le tronc cérébral. Des lésions électrolytiques ou excitotoxiques ont cherché à mettre en évidence ces structures relayant l'inhibition descendante de l'APN, notamment en test de *Tail-Flick*. Ainsi, il a été montré que la lésion des noyaux profonds du mésencéphal (DpMe) ipsilatéral, de la VLM, du noyau paragigantocellularis latéral (LPGi), ou encore du noyau pédonculopontin tegmental (PPTg) réduit l'effet antinociceptif de la stimulation de l'APN (Genaro and Prado, 2016; Terenzi et al., 1991, 1992; Wang et al., 1992). Certaines de ces structures ont par ailleurs déjà été décrites comme étant des cibles des neurones de l'APN (cf 2.3.1). Une étude démontre que la stimulation de l'APN activerait une voie de signalisation opioïde endogène dans le LPGi ipsilatéral et une voie de signalisation NMDA, sérotoninergique et nicotinique dans le PPTg contralatéral (Genaro et al., 2019). De plus, l'injection de glutamate dans le noyau du raphé dorsal (DRN) a un effet antinociceptif totalement inhibé par l'administration de lidocaïne, de naloxone ou d'antagonistes sérotoninergiques (methiothepine et méthysergide) dans l'APN. L'intégrité de l'APN est donc nécessaire à l'effet antinociceptif du DRN, impliquant des voies de modulation sérotoninergiques et opioïdes (Mamede Rosa et al., 1998; Prado and Faganello, 2000). La voie de connexion entre l'APN et le DRN a été par ailleurs confirmée dans cette étude par l'injection du traceur rétrograde *Fast blue* dans le DRN. L'APN pourrait donc être un relai via lequel le DRN module les messages nociceptifs provenant de la moëlle. L'hypothèse d'une modulation sérotoninergique et opioïde fut également confirmée dans le cadre d'analgésie induite par la stimulation des cortex occipital et rétrospinal agissant via l'APN lors du test de *Tail-Flick* (Reis et al., 2011).

L'APN est donc le siège d'un contrôle descendant de la douleur aiguë reposant sur l'activation de voies sérotoninergique et opioïdes mais comme nous l'avons vu précédemment elle est également susceptible d'exercer un contrôle complexe sur l'activité du PO, via une connexion directe et via la ZI (Figure 18).



**Figure 18 | Diagramme récapitulatif des projections fonctionnelles caractérisées de l'APN, potentiellement impliquées dans le contrôle de la perception douloureuse.**

APN : Noyau Prétectal Antérieur ; DRN : Noyau du Raphé Dorsal ; LPGi : Noyau Latéral Para-Gigantocellularis ; PO : Noyau Postérieure thalamique ; PPTg : Noyau Pédonculopontin Tegmental ; ZI : Zona Incerta

### 3.3. Rôle de l'APN dans la douleur chronique

#### 3.3.1. Modèles de douleur chronique et persistante

Certaines études ont tenté de déterminer si le contrôle descendant exercé par l'APN dans le cadre d'une douleur aiguë était également impliqué dans des contextes de douleur persistante ou chronique. L'implication de l'APN dans le contrôle de la douleur persistante a été étudiée chez le rat avec des modèles de douleur incisionnelle, considéré comme un modèle de douleur persistante où une lésion est effectuée dans la voûte plantaire, ainsi que dans le modèle de douleur inflammatoire induite par le carraghénane, considéré comme un modèle de douleur subaiguë, intermédiaire entre la douleur aiguë et chronique. De même, dans le modèle de douleur incisionnelle, la lésion électrolytique ou le blocage par la lidocaïne de l'APN contralatéral à la lésion induit une augmentation de l'allodynie mécanique (Villarreal et al., 2003, 2004a). Le modèle d'hyperalgie inflammatoire induite par le carraghénane a également montré une augmentation de l'hyperalgie suite à l'injection de lidocaïne dans l'APN contralatéral (Villarreal et al., 2003). Ces études sur un rôle de l'APN dans la douleur chronique et persistante sont bien moins nombreuses que celles concernant la douleur aiguë, mais elles convergent toutes vers l'hypothèse selon laquelle l'APN réduirait la sévérité des réponses comportementales aux lésions persistantes.

#### 3.3.2. Mécanismes et voies de l'anti-hyperalgie chronique médiée par l'APN

En termes de mécanismes, dans le modèle d'hyperalgie inflammatoire induite par le carraghénane, le marquage c-Fos augmente significativement dans l'APN contralatéral principalement, ainsi que dans une moindre mesure dans l'APN ipsilatéral (Villarreal et al., 2003). L'APN semble donc intégrer les signaux de douleur persistante et chronique de manière bilatérale. Cette étude montre également que l'injection de bupivacaïne dans l'APN contralatéral y diminue le nombre de cellules c-Fos+. Cet effet est par ailleurs accompagné d'une diminution de l'immunoréactivité c-Fos dans les couches superficielles de la moëlle épinière ipsilatérale, et une augmentation dans les couches profondes ipsilatérales. Les auteurs postulent donc qu'une entrée nociceptive activerait l'APN contralatéral déclenchant un mécanisme descendant d'activation des neurones des couches superficielles et d'inhibition des neurones des couches profondes dans la moëlle épinière. Cette hypothèse corrobore celle avancée pour le mécanisme d'antinociception évoqué par l'APN dans le cadre d'une douleur aiguë. Une étude pionnière réalisée dans le contexte d'une douleur chronique suggérait déjà

### CHAPITRE III :

---

que dans le cadre de lésions prolongées, la décharge des neurones spinaux superficiels serait maintenue par la stimulation et par une facilitation via l'APN, et qu'une inhibition descendante soutenue réduirait les réponses aux lésions prolongées (Rees et al., 1995).

Par ailleurs, l'effet pro-hyperalgique de la lésion de l'APN dans le modèle de douleur incisionnelle serait médié en partie par des voies descendantes via le PPTg contralatéral et le GiA (Villarreal et al., 2004b). Ces structures ont également été mises en évidence dans l'antinociception descendante par l'APN lors de douleurs aiguës. De plus, l'injection d'antagonistes opioïdes (naloxone) et sérotoninergiques (méthysergide) dans l'APN augmente l'allodynie dans le modèle de douleur incisionnelle (Villarreal and Prado, 2007). Or les voies opioïdes et sérotoninergiques ont également été indiquées comme médiatrices de l'antinociception par l'APN en douleur aiguë. Cette étude emploie l'injection de nombreux autres agonistes et antagonistes et avance l'hypothèse selon laquelle les signaux nociceptifs seraient relayés jusqu'à l'APN ventral par des voies cholinergiques et sérotoninergiques, permettant l'activation des mécanismes de contrôle descendants. La voie sérotoninergique serait contrôlée par des voies GABAergiques intrinsèques de l'APN ou projetant sur l'APN, modulées négativement par les terminaisons nerveuses opioïdes (Villarreal and Prado, 2007).

Ces observations suggèrent que l'APN est un siège d'intégration des signaux nociceptifs non seulement aigus mais aussi persistants ou chroniques et qu'elle activerait des voies antinociceptives descendantes dans ces deux contextes. Par ailleurs, la stimulation de l'APN dorsal induirait une meilleure antinociception dans le modèle de douleur aiguë de *Tail-flick*, tandis que l'APN ventral aurait un effet antinociceptif plus efficace dans le modèle de douleur incisionnelle (Villarreal et al., 2004a). Il est donc possible que l'intégration des signaux nociceptifs aigus ou persistants s'effectue dans différentes régions de l'APN. Les mécanismes descendants activés seraient cependant fortement similaires.

### 3.3.3. Douleur neuropathique

L'APN exerce un contrôle descendant sur la perception de la douleur aiguë et dans certains modèles de douleur chronique. Mais le rôle de l'APN dans la douleur neuropathique est peu connu. Ainsi, une première étude a montré que dans le modèle de déafférentiation des racines dorsales, la lésion préventive de l'APN augmente le comportement d'autotomie de façon prolongée (jusqu'à 3 semaines, Rees et al., 1995). L'APN semble donc réduire les effets débilissants d'une lésion prolongée. Une étude plus récente par marquage cFos a montré l'activation de tout l'APN peu après une constriction chronique du nerf (CCI : *Chronic Constriction Injury*, Rossaneis and Prado, 2015). Cette étude montre également que la lésion excitotoxique de l'APN ventral par le NMDA ou son inhibition par la lidocaïne peu avant la CCI favorise l'hypersensibilité tactile (Rossaneis and Prado, 2015; Rossaneis et al., 2015). Ce phénomène impliquerait que l'APN ventral, corroborant les résultats observés lors des lésions locales de l'APN en douleur aiguë et persistante (Rossaneis and Prado, 2015; Villarreal et al., 2004a). De façon intéressante, une lésion réalisée plus précocement, avant la CCI, n'est pas pro-hyperalgique. De plus, lorsque la lésion de l'APN est réalisée après la CCI, aucun effet n'est observé. Ces résultats suggèrent que l'APN ventral aurait donc un rôle dans la mise en place de la neuropathie, notamment dans son initiation plutôt que son maintien. Par ailleurs, l'intensification de l'hypersensibilité tactile observée en phase initiale après la CCI suite à l'injection des antagonistes naloxone et de méthysergide confirme l'implication des voies opioïdes et sérotoninergiques, respectivement, dans le contexte d'une neuropathie.

L'APN est donc impliqué non seulement dans l'intégration des signaux nociceptifs aigus, persistants et chroniques, mais également dans le modèle neuropathique de CCI. Cependant, dans les modèles persistants et chroniques, la lésion de l'APN est effectuée de manière préventive et l'effet nociceptif observé est prolongé (Rees et al., 1995), tandis que dans le modèle neuropathique étudié, la lésion préventive de l'APN n'est efficace qu'en phase initiale de la neuropathie tandis qu'une lésion ultérieure n'a aucun effet (Rossaneis et al., 2015). Par ailleurs, il semblerait que les régions ventrale et dorsale de l'APN soient recrutées de façon différentielle dans les contextes aigus et chroniques, tout en impliquant des voies de neuromodulation similaires. En conclusion, l'implication de l'APN dans l'intégration et le contrôle de la douleur aiguë semble clairement établie. Pourtant, cette structure n'est jamais mentionnée parmi les centres supra-spinaux de la douleur. Par ailleurs, le rôle de l'APN dans le contexte de la douleur chronique reste encore à être précisé, et de nombreuses questions subsistent concernant son implication dans la neuropathie.



# **PROBLEMATIQUE**



## PROBLEMATIQUE

---

Comme vu précédemment, la douleur est un signal d'alarme essentiel à l'intégrité physique individuelle. Son évolution vers un état de douleur chronique la rend purement délétère. Aujourd'hui, peu de molécules sont efficaces dans le traitement des douleurs chroniques ou neuropathiques. Par ailleurs, les voies de la douleur, aiguë ou chronique, semblent ne pas être totalement élucidées. Si certains mécanismes de développement de la neuropathie ont récemment été identifiés, essentiellement au niveau périphérique et spinal, sa physiopathologie reste encore mal définie, notamment au niveau supra-spinal. Ceci témoigne de la nécessité d'approfondir l'état des recherches sur la douleur neuropathique, dans l'optique d'obtenir de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Les dérégulations des canaux ioniques semblent fondamentales dans cette pathologie. Parmi eux, le canal calcique Cav3.2 a une implication nettement établie au niveau périphérique et spinal. Cependant, sa localisation et son rôle au niveau supra-spinal n'ont pas encore été spécifiquement étudiés. Par ailleurs, si les rôles des autres isoformes de canaux T, Cav3.1 et Cav3.3 ont été établis, entre autres dans la décharge des neurones thalamiques et les oscillations thalamocorticales, le rôle général de l'isoforme Cav3.2 exprimée dans le cerveau est encore inconnu. Grâce à un modèle murin développé et validé par nos collaborateurs aux niveaux périphérique et spinal, nous avons investigué l'implication des canaux Cav3.2 exprimés au niveau supra-spinal dans la douleur neuropathique.

Nos premières expériences de localisation du canal par immunohistochimie ont montré que le canal Cav3.2 est exprimé dans des régions discrètes du cerveau, dont beaucoup font partie de la «*pain matrix*». Une forte expression a notamment été remarquée dans le Noyau Prétectal Antérieur (APN). De manière intéressante, ce noyau ne fait pas partie des structures supra-spinales classiquement désignées dans le traitement nociceptif. Or son rôle dans la perception douloureuse a été clairement établi.

C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier le rôle du canal Cav3.2 exprimé dans l'APN, dans le développement de la neuropathie. Pour ce faire, nous avons d'abord observé plus précisément l'expression du canal Cav3.2-GFP dans l'APN chez les souris KI-Cav3.2-eGFPflox. Puis nous avons eu recours à des injections virales locales de la Cre par stéréotaxie chez ces souris et réalisé des tests comportementaux de sensibilité pour déterminer l'impact de cette délétion locale, dans des conditions de perception somatosensorielle basale ou neuropathique. Enfin, pour mieux comprendre les effets observés, nous avons effectué une caractérisation anatomique, moléculaire et électrophysiologique *in vitro* des neurones Cav3.2-GFP-positifs de l'APN



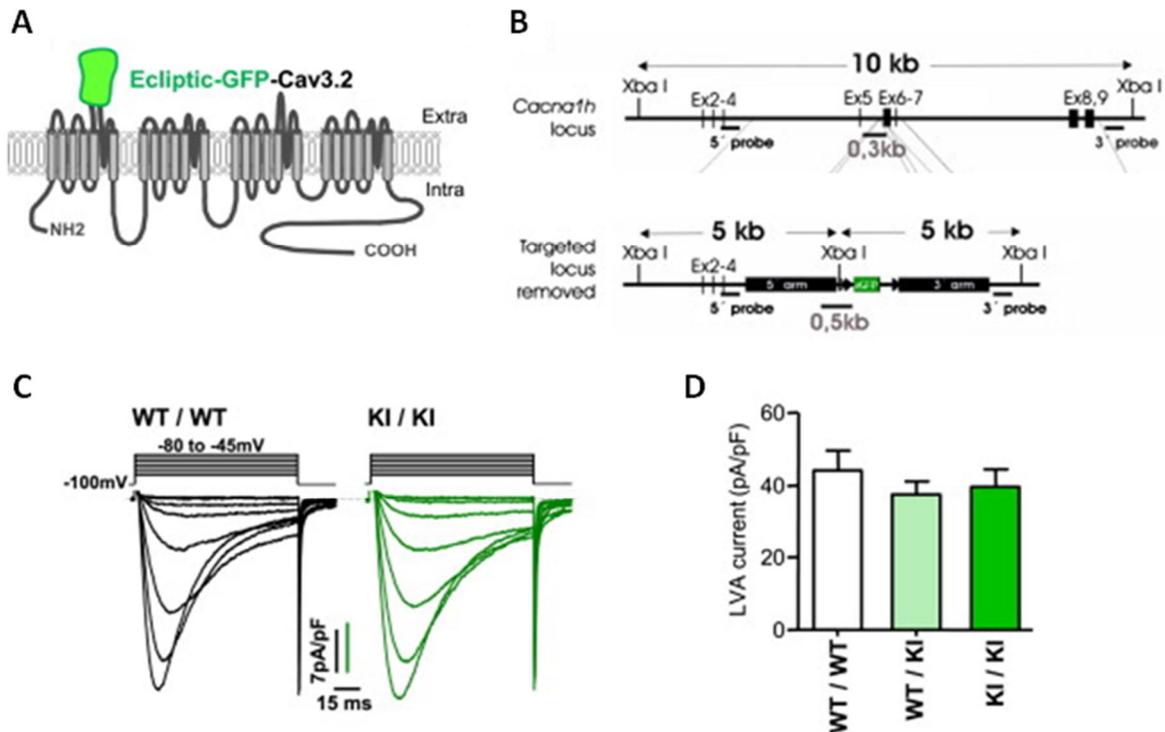
**MATERIEL &  
METHODES**

### 1. Modèles animaux

Les expériences ont été réalisées en accord avec les règles d'éthique de la Federation for Laboratory Animal Science Association (FELASA), selon la directive 2010/63/UE, avec l'accord du Comité d'Éthique pour la Santé et les Sciences de la Vie et du Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche et de l'Innovation. Toutes les souris utilisées pour cette étude étaient hébergées par groupes de 5 maximum par cage, avec un cycle jour/nuite de 12h/12h et un accès *ad libitum* à l'eau de boisson et à la nourriture.

Quatre lignées murines ont été utilisées au cours de cette étude, notamment la lignée KI-Cav3.2-eGFPflox (KI, François et al., 2015). Chez ces souris, la séquence codante de la GFP-écliptique (eGFP, sensible au pH, (Miesenböck et al., 1998)) est insérée dans l'exon 6 du locus *cacna1h* du canal Cav3.2 (Figure 19B). La GFP s'exprime ainsi dans une boucle extracellulaire du canal, entre le 5<sup>e</sup> segment transmembranaire et le pore (Figure 19A). Des sites LoxP sont également insérés avant l'exon 6 et après l'exon 7 permettant la délétion de ce fragment floxé en présence de la Cre. La comparaison des courants enregistrés dans des neurones de DRG de souris homozygotes *Wild-Type* (WT), KI et hétérozygotes WT/KI n'a pas révélé d'impact de l'insertion de la GFP sur le courant T (Figure 19C, D, François et al., 2015).

Nous avons également utilisé la lignée PValb-Cre (B6.129P2-Pvalb-tm1(cre)Arbr/J) exprimant la Cre sous le contrôle du promoteur de la parvalbumine, ainsi que la lignée reportrice Ai14 (B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor-tm14(CAG-tdTomato)Hze/J) exprimant de façon Cre-dépendante la protéine fluorescente sous le contrôle du promoteur CAG.



**Figure 19 | Description de la lignée KI-Cav3.2-eGFPlox (adapté de François et al., 2015).**

(A) Schéma de la structure de la protéine de fusion Cav3.2-eGFP

(B) Locus *cacna1h* WT (*Cacna1h* locus) et muté (*Targeted locus removed*) avec insertion de la séquence codante de la eGFP entre les exons (Ex) 5 et 6, obtenue après retrait d'une cassette de résistance à la néomycine au niveau du site de restriction XbaI.

(C) Courants Cav3.2 enregistrés par *patch-clamp* (configuration cellule entière, mode voltage imposé) dans les neurones des DRG de souris homozygotes WT ou KI.

(D) Densités moyennes de courant Cav3.2 (*LVA current*) des cellules enregistrées chez des souris homozygotes WT/WT, hétérozygotes WT/KI et homozygotes KI/KI. Représentation de la moyenne  $\pm$  SEM.

## 2. Immunohistochimie

### 2.1. Préparation des tranches

Pour tous les marquages immunohistochimiques, des souris âgées de 4 à 31 semaines ont été utilisées. Les animaux sont anesthésiés à l'isoflurane 2% (cf. Tableau 1), puis injectés avec une dose létale de pentobarbital avant d'être perfusés avec une solution à 4°C de liquide céphalorachidien artificiel (ACSF, *Artificial Cerebro-Spinal Fluid*), oxygénée avec un mélange 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>, contenant (en mM) : 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 25 glucose (cf. Tableau 7). Les cerveaux sont ensuite rapidement extraits de la boîte crânienne et incubés dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) dilué à 4% dans une solution de tampon phosphate (PBS : Phosphate Buffer Saline) pour post-fixation pendant une nuit à 4°C. Par la suite, des tranches de 40µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un vibratome (Leica VT1000S) dans du PBS.

### 2.2. Marquages immunohistochimiques

Tous les marquages immunohistochimiques sont réalisés à température ambiante. Les tranches sont rincées trois fois dans une solution de Tris Buffer Saline (TBS, contenant 50mM de Tris Base et 150mM de NaCl) à pH 8.4, puis incubées dans une solution de TBS additionnée de Tween20 à 0.05%, de Triton100X à 0.2% et de Donkey Serum à 10% (TBSTD) pendant 1h30. Les détergents Tween20 et le Triton100X perméabilisent les membranes, tandis que le Donkey Serum permet la saturation des sites spécifiques. Les tranches sont ensuite incubées avec les anticorps primaires (cf. Tableau 2) dans une solution de TBSTD pendant une nuit, rincées 3 fois avec du TBS, incubées avec les anticorps secondaires (cf. Tableau 3) dans du TBSTD pendant 2h et rincées de nouveau 3 fois avant d'être montées entre lame et lamelle dans du Fluoromount.

### 2.3. Acquisition et quantification

Les images de tranches entières sont acquises en microscopie à épifluorescence sous un microscope (Axio Zoom. V16 Zeiss). Les mosaïques sont réalisées au grossissement 200 et traitées avec le logiciel ZEN (Zeiss). Les images utilisées pour étudier les co-expressions sont acquises en microscopie confocale (Leica TCS SP5 droit) aux objectifs 20X et 63X, et traitées à l'aide du logiciel Fiji/ImageJ, avec le *plug-in* Cell Counter pour des comptages cellulaires manuels.

## MATERIEL & METHODES

Anesthésique	Marque	Dilution	Voie d'administration	Dosage
<b>Isoflurane</b>	Iso-Vet	2%	Inhalée	NP
<b>Pentobarbital</b>	Euthasol Vet	362.9 mg/mL	Intrapéritonéale	500 mg/kg
<b>Kétamine</b>	Imalgene 1000	10 mg/mL	Intrapéritonéale	100 mg/kg
<b>Xylazine</b>	Rompun 2%	1 mg/mL	Intrapéritonéale	10 mg/kg
<b>Lidocaïne</b>	Lurocaïne	20 mg/mL	Sous-cutanée	NP

**Tableau 1 | Liste des anesthésiques utilisés**

NP : non pertinent

Antigène	Espèce	Dilution	Fournisseur	Référence
<b>GFP</b>	Poulet	1/500	Life Technologies	A10262
<b>GFP</b>	Lapin	1/500	Chromotek	PABG1
<b>Parvalbumine</b>	Souris	1/1000	Sigma Aldrich	P3088
<b>NeuN</b>	Lapin	1/500	Merck Millipore	ABN78
<b>DsRed/tdTomato/RFP</b>	Lapin	1/1000	ClonTech	632496

**Tableau 2 | Liste des anticorps primaires utilisés.**

Anticorps	Espèce	Dilution	Fournisseur	Référence
<b>Anti-poulet-A488</b>	Chèvre	1/500	Life Technologies	A11039
<b>Anti-poulet-A488</b>	Âne	1/500	Sigma Aldrich	SAB4600031
<b>Anti-lapin-A647</b>	Chèvre	1/500	Life Technologies	A21244
<b>Anti-souris-A488</b>	Chèvre	1/500	Life Technologies	A11001
<b>Anti-souris-A555</b>	Chèvre	1/500	Life Technologies	A21422
<b>Anti-lapin-Cy3</b>	Âne	1/2000	Jackson IR	711-165-1525

**Tableau 3 | Liste des anticorps secondaires utilisés.**

### 3. Chirurgies

Les souris sont anesthésiées à l'aide d'un mélange kétamine-xylazine (cf. Tableau 1) et placées sur un tapis chauffant. Un collyre à base de vitamine B12 (Twelve TVM) est appliqué sur les yeux et une injection sous-cutanée de solution saline stérile (NaCl 0.9%) est réalisée afin de prévenir respectivement le dessèchement oculaire et la déshydratation. La zone chirurgicale est nettoyée à l'éthanol et aseptisée avec une solution iodée (Vétédine). A la fin de la chirurgie, les bords de la plaie sont remis en apposition et la peau suturée à l'aide d'un fil de Vicryl 4-0 (Ethicon) et/ou de colle chirurgicale (Vetbond 3M). Les souris sont enfin placées dans une cage de réveil sur un tapis chauffant avant d'être remises en cage d'hébergement, une fois totalement réveillées.

#### 3.1. Injections stéréotaxiques

De la lidocaïne est administrée en sous-cutanée au lieu de l'incision, puis les souris sont placées en décubitus ventral sur un appareil stéréotaxique. Un temps d'attente de 5min est observé suite à l'injection de lidocaïne pour en assurer l'efficacité avant de pratiquer une incision de moins d'1cm au niveau de la boîte crânienne. Une craniotomie est réalisée au dessus de la région d'intérêt. La canule ou pipette (cf. 3.1.1. et 3.1.2 respectivement) est descendue aux coordonnées cibles pour l'injection, puis remontée lentement 5 à 10min après la fin de l'injection. De la solution saline est régulièrement appliquée sur le crâne pour éviter le dessèchement de la craniotomie.

##### 3.1.1. Injections pour tests comportementaux

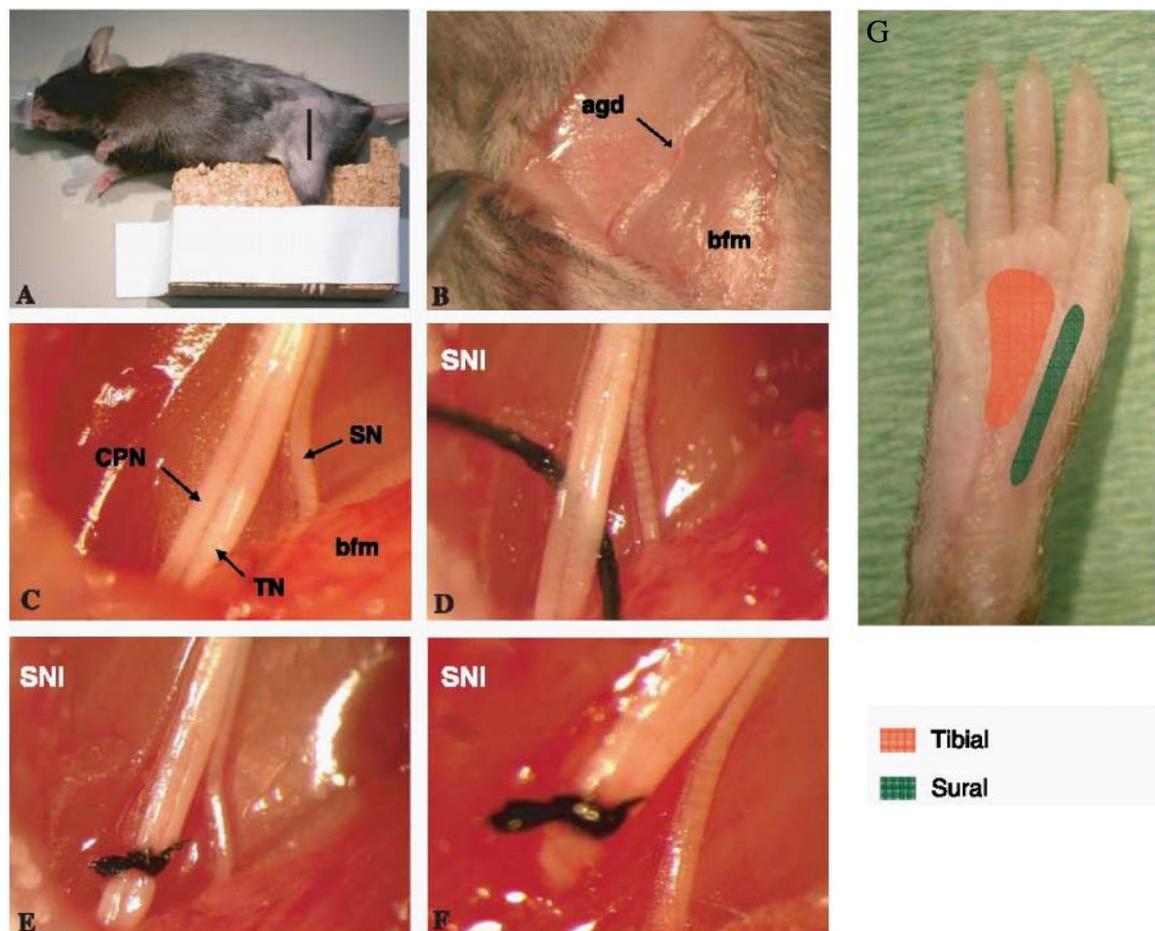
Les injections en vue des expériences de comportement ont été réalisées chez des souris KI mâles et femelles âgées de 6 à 8 semaines. 1 $\mu$ L de virus AAV8-hSyn-mCherry-Cre (4.9x10<sup>12</sup>ppm) est injecté en bilatéral à une vitesse de 0.1 à 0.2 $\mu$ L/min dans l'APN (Bregma : -2.70 à -2.80mm ; Médiolatéral :  $\pm$  1.10 à 1.15mm ; Profondeur : -2.65 à -2.70mm depuis la dure-mère) afin de supprimer localement l'expression du canal Cav3.2. Certaines souris KI ont été injectées avec 1 $\mu$ L de virus AAV8-hSyn-mCherry (4.6x10<sup>12</sup>ppm) pour générer un groupe contrôle. Ces virus ont été fournis par Vector Core (Université de Caroline du Nord). Le système d'injection consiste en une canule en inox de 26 gauges reliée par une tubulure en polyéthylène à une seringue Hamilton de 10 $\mu$ L placée dans un système d'injection automatique. Une bulle d'air visible dans la tubulure assure l'interface entre le virus présent à l'extrémité de la canule et de l'eau stérile permettant un maintien de pression dans le système.

### 3.1.2. Injections pour traçage de voies

Les injections en vue des traçages de voies ont été réalisées chez des souris mâles et femelles âgées de 6 à 19 semaines. Elles sont effectuées en unilatéral, dans l'hémisphère droit, à l'aide d'une micropipette en verre (Drummond) fabriquée avec une étireuse verticale (Narishige PE-2). Le produit à injecter est introduit par capillarité. Une goutte d'huile minérale stérile assure l'interface entre le produit et le piston d'injection. Celui-ci est relié à une roue d'injection graduée (Narishige, 100µL/tour) par une tubulure remplie d'huile minérale stérile. La pression maintenue tout le long du système permet l'injection précise de petits volumes. Pour le traçage de voies antérogrades, 30 à 50nL de virus AAV1-CAG-Flex-tdTomato-WPRE ( $4.49 \times 10^{13}$  copies/mL, Université de Pennsylvanie) sont injectés dans l'APN (B -2.80mm ; L -1.10mm ; P -2.70mm) de souris PValb-Cre. Trois semaines après les injections, des tranches coronales ou parasagittales sont effectuées pour visualiser les projections axonales des neurones transfectés avec, le cas échéant, un marquage anti-PV (cf. 2 - Immunohistochimies). Le traçage des voies rétrogrades est réalisé en injectant 20 à 50 nL de RedRetrobeads (couplées à la Rhodamine Red X, non diluées ou diluées à 1:3, Lumafluor) dans le POm (B -1.60 à 1.70mm ; L 1.25 à 1.30mm ; P 3.0 à 3.25mm) ou la ZI (B -2.15mm ; L 1.80mm ; P -3.95mm) de souris KI. Une semaine après les injections, des tranches coronales et un marquage anti-GFP sont effectués pour visualiser les neurones marqués de l'APN (cf. 2).

### 3.2. Ligature du nerf sciatique

Les ligatures du nerf sciatique (*spared nerve injury*, SNI, d'après Decosterd and Woolf, 2000) ont été réalisées sur des souris KI mâles et femelles, âgées de 10 à 15 semaines, du côté gauche. Les souris sont anesthésiées et placées en décubitus latéral. La cuisse à opérer est légèrement surélevée et une incision d'environ 1cm est pratiquée entre la hanche et le genou. Les muscles renfermant la loge du nerf sciatique sont écartés à l'aide d'un ciseau coudé à bout rond. Une fois celle-ci exposée, de la solution saline est appliquée pour éviter le dessèchement des tissus. Les branches péronéale commune et tibiale du nerf sciatique sont ligaturées à l'aide d'un fil de suture en soie 6-0 (Ethicon) et un fragment de nerf est sectionné sous la ligature (Figure 20). L'opération est réalisée de sorte à garder intacte la branche surale du nerf sciatique. Les muscles sont ensuite remis en apposition et la peau suturée.



**Figure 20 | Méthode chirurgicale de ligature du nerf sciatique (SNI, adapté de Bourquin et al., 2006)**

(A) Souris anesthésiée et marque de l'incision sur la cuisse arrière gauche.

(B) Muscle *biceps femoris* (bfm) exposé, renfermant la loge du nerf sciatique et artère *genus descendes* (agd) utilisée comme repère pour écarter les fibres musculaires.

(C) Exposition du nerf sciatique et des branches périphériques : péronéale commune (CPN), tibiale (TN) et surale (SN).

(D) Fil de soie 6.0 glissé sous les branches CPN et TN. La branche SN est épargnée.

(E) Ligature des branches CPN et TN.

(F) Les branches ligaturées du nerf sont sectionnées à distance de la ligature et un fragment de nerf de 2mm est retiré.

(G) Vue plantaire de la patte arrière gauche. Les régions innervées par les branches tibiale et surale du nerf sont colorées en orange et vert respectivement. Le territoire innervé par la branche surale du nerf est stimulé lors du test de Von Frey en prenant soin d'éviter la bordure entre la zone glabre et pileuse.

### 4. Tests comportementaux

Au cours de cette étude, 3 cohortes d'expériences comportementales ont été traitées de façon identique. Les souris KI mâles et femelles sont injectées avec le virus Cre ou contrôle dans l'APN. Après récupération post-opératoire (4 jours), elles sont placées à deux reprises pendant 2h sur les postes de comportement pour habituation. Lors de la seconde session d'habituation, les seuils de sensibilité sont mesurés pour habituer les animaux à être testés. Pendant les 4 semaines suivant les injections, 5 mesures basales (BL) de sensibilité mécanique (Von Frey) et thermique à la chaleur (Hargreaves) sont réalisées. Ce délai permet de dépasser le temps d'expression maximale théorique du virus (3 semaines) afin de garantir la stabilité des dernières mesures basales. A la suite celles-ci les ligatures du nerf sciatique sont pratiquées. Des mesures de Von Frey et Hargreaves sont ensuite effectuées pendant les 3 semaines de mise en place de la neuropathie (mesures SNI). La locomotion dynamique des animaux est évaluée avec le test du rotarod, à deux reprises au cours des mesures basales et une fois à la fin des mesures SNI. Enfin, la locomotion spontanée est évaluée avec le test du couloir circulaire à la fin des tests comportementaux. Les souris sont ensuite sacrifiées pour une localisation *post-hoc* des sites d'injection par immunohistochimie (cf. 21, Figure 21).

#### 4.1. Test de Von Frey

La sensibilité mécanique des souris est mesurée par le test de Von Frey selon la méthode up-down (Chaplan et al., 1994). Les souris sont placées sur une grille surélevée (Ugo Basile) et le territoire de la voûte plantaire gauche, ipsilatérale à la lésion, innervée par la branche surale du nerf sciatique (Figure 20G), est stimulé à l'aide de filaments de Von Frey (Bioseb) de rigidités différentes. La force expérimentateur-dépendante appliquée par chaque filament est préalablement calibrée à l'aide d'une balance de précision (Tableau 4). Un premier filament exerçant une force théorique de 0.16g est utilisé. Si la souris montre une réaction à la stimulation (retrait de la patte ou écartement des doigts) un filament de force inférieure est appliqué. Sinon un filament de force supérieure est utilisé. Des stimulations séquentielles sont ainsi appliquées jusqu'à ce qu'un premier changement de réaction soit observé (positive puis négative ou inversement). 4 stimulations supplémentaires sont ensuite réalisées (excepté dans les cas où le filament de rigidité maximale ou minimale était utilisé). Ce protocole est répété 2 fois à 15min d'intervalle afin d'éviter toute sensibilisation. Le seuil de retrait de la patte (PWT : *Paw Withdrawal Threshold*) moyen calculé à partir de ces mesures correspond au

## MATERIEL & METHODES

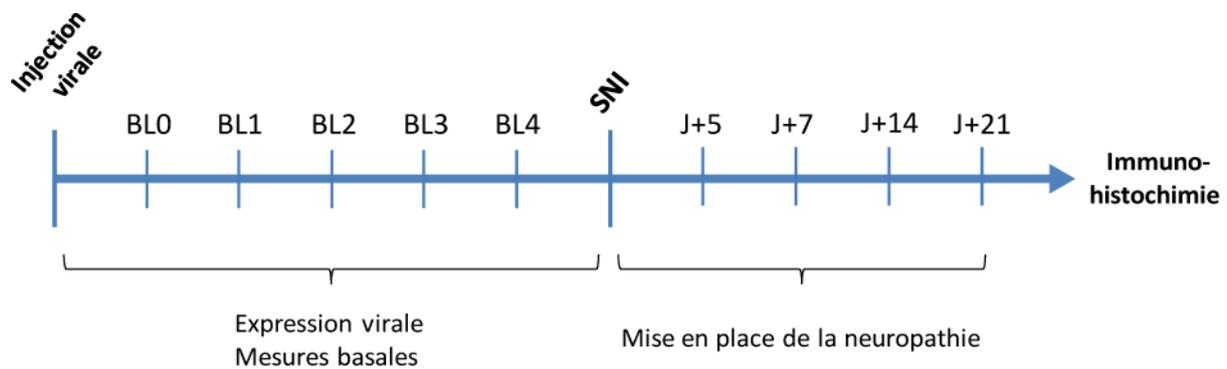
poinds nécessaire pour que la souris réagisse à la stimulation dans 50% des cas. Ces mesures sont réalisées 9 à 10 fois sur chaque cohorte.

Nous avons déterminé un pourcentage d'atténuation de l'allodynie à J+21, selon la formule suivante :

$$\% \text{ Atténuation de l'allodynie} = \frac{\text{SNI}_{\text{J+21}} - \text{SNI}_{\text{J+5}}}{\text{SNI}_{\text{J+5}}}$$

Où  $\text{SNI}_{\text{J+21}} = \text{SNI}_{\text{J+21}} - \text{SNI}_{\text{J+5}}$

Sur 2 des 3 cohortes, un test de nage forcée a été effectué à la fin des expériences pour établir le niveau d'analgésie induit par le stress (*stress induced analgesia*). A la fin de la mesure SNI J+21, les souris sont placées pendant 3 à 5min dans une piscine d'eau à température ambiante, puis séchées et un nouveau test de Von Frey est effectué.



**Figure 21 | Chronologie du paradigme expérimental mené sur les cohortes comportementales.** BL : mesures basales

<b>Force théorique (g)</b>	0.02	0.04	0.07	0.16	0.4	0.6	1	1.4
<b>Force réelle moyenne (g)</b>	0.028	0.048	0.749	0.166	0.430	0.623	1.032	1.353
<b>SEM de la force réelle (x 10<sup>-3</sup> g)</b>	0.5	0.7	0.7	2.6	5	4.3	21.7	11.2

**Tableau 4 | Forces théoriques et réelles appliquées par les filaments de Von Frey.**

### 4.2. Test de Hargreaves

La sensibilité thermique à la chaleur des souris est déterminée à partir du test plantaire de Hargreaves. Les souris sont placées sur une plaque en verre et le territoire de la voûte plantaire gauche innervé par la branche surale du nerf sciatique lésé est stimulé à l'aide d'un générateur envoyant un faisceau de lumière infrarouge à 20% de puissance. Un système de détection de la réaction de la souris permet l'arrêt automatique de la source de chaleur et la mesure précise de la latence de réaction. 3 mesures sont réalisées par animal à 15min d'intervalles pour éviter toute sensibilisation. Ces mesures étaient réalisées 9 à 10 fois sur chaque cohorte.

### 4.3. Test du Rotarod

La coordination motrice des souris est évaluée par le test du rotarod (Bioseb). Les souris sont placées sur une barre rotative dont la vitesse est contrôlée avec une rampe d'accélération de 4 à 16 tours par minute pendant 3min. La durée de marche sur la barre avant la chute de l'animal est mesurée automatiquement, à trois reprises pour chaque jour de test. Ces mesures étaient réalisées 2 fois pendant les mesures de BL et une fois en fin de tests neuropathiques pour chaque cohorte.

### 4.4. Test du couloir circulaire

A la fin des différents protocoles effectués sur chaque cohorte, la locomotion spontanée des souris était évaluée par le test du couloir circulaire. Les souris sont placées dans un cyclotron (IMetronic) consistant en un couloir de PVC transparent de 10cm de largeur. Cette structure ne présentant ni centre aversif, ni coins préférentiels, et étant placée à l'obscurité, les souris se déplacent librement sans localisation anxiogène. Des capteurs placés dans 4 directions permettent la détection du nombre de quarts de tour effectués par les souris en 2 heures.

### 4.5. Statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel IGOR (Wavemetrics). Un test de Wilcoxon-Mann-Whitney (test U), pairé (comparaisons intra-groupe des mesures BL) ou non pairé (comparaisons groupe contrôle *vs* test) est effectué pour identifier les différences significatives. Pour le test de Von Frey et de Hargreaves, une correction de Bonferroni est appliquée pour la comparaison deux à deux des mesures basales ou SNI. Si aucune différence significative n'est détectée parmi les mesures basales, la distribution des valeurs SNI de chaque mesure est comparée à l'ensemble des valeurs basales. Les mesures de chaque point expérimental des groupes test et contrôle sont comparées deux à deux. Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM.

### 5. Electrophysiologie

#### 5.1. Electrophysiologie *in vitro*

##### 5.1.1. Préparation des tranches

Les souris PVcre-Ai14 mâles et femelles âgées de P23 à P123 ont été utilisées pour ces expériences. Elles sont endormies à l'isoflurane 2% puis décapitées. Le cerveau est rapidement extrait et placé dans une solution de ACSF (osmolarité 305mOsm, pH 7.3 après équilibration) oxygénée avec un mélange 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> à 4°C. Un bloc contenant l'APN est préparé. Des tranches coronales de 250 à 300µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un vibratome (Campden Instruments 7000 SMZ2) dans une solution à 4°C contenant en mM : 130 potassium gluconate, 15 KCl, 2 EGTA, 20 HEPES, 25 glucose, 1 CaCl<sub>2</sub>, 6 MgCl<sub>2</sub>, 0.05 D-APV (304 mOsm, pH 7.4 après équilibration). La coupe est réalisée à l'aide d'une lame en inox (vitesse : 0.05 à 0.07mm/s ; fréquence : 65Hz ; amplitude : 0.75mm). Les tranches sont ensuite transférées quelques minutes dans une solution à 4°C oxygénée avec un mélange 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> et contenant en mM : 225 D-mannitol, 2.5 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 25 glucose, 1 CaCl<sub>2</sub>, 6 MgCl<sub>2</sub> (310mOsm). Enfin, elles sont incubées dans une solution de ACSF oxygénée avec 95%O<sub>2</sub> / 5%CO<sub>2</sub> à 32°C.

##### 5.1.2. Enregistrements intracellulaires

Les tranches sont placées dans une cuve perfusée avec de l'ACSF oxygéné avec 95%O<sub>2</sub> / 5%CO<sub>2</sub>, et chauffé à 32°C. Les neurones fluorescents sont visualisés à l'aide d'un microscope à épifluorescence avec des objectifs à immersion 10X et 63X (Olympus BX51WI). Ils sont enregistrés selon la technique du patch-clamp en configuration « cellule entière » à l'aide de pipettes de verre en borosilicate remplies d'un milieu intracellulaire contenant (en mM) : 140 acide méthane-sulfonique, 1 EGTA, 10 HEPES, 4 MgCl<sub>2</sub>, 0.1 CaCl<sub>2</sub>, 3 Na-ATP, 0.4 Na-GTP (pH 7.3 ; 280mOsm ; résistance des électrodes R<sub>p</sub>=2-4Má ). L'électrode est connectée à un amplificateur AxoPatch 200B (Axon Instruments). L'activité neuronale est enregistrée en mode courant imposé avec une fréquence d'acquisition de 20kHz et filtrée à 2kHz avec un filtre passe-bas. Le logiciel pClamp (Molecular Device) est utilisé pour l'acquisition. Les analyses sont réalisées sous Matlab.

### 5.2. RT-PCR multiplex sur cellule unique

Des expériences de RT-PCR (Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction) multiplex sur cellule unique (scRT-PCR : *Single Cell RT-PCR*) ont été menées en collaboration avec Benjamin Le Gac et Bruno Cauli (Equipe Réseaux Synaptiques et Neuroénergétiques, Laboratoire Neurosciences Paris Seine, CNRS UMR8246, INSERM U1130, Sorbonne Université UM119). Elles consistent à sonder simultanément la présence de plusieurs ARN messagers (ARNm) d'intérêt prédéfinis dans le cytoplasme de cellules fluorescentes enregistrées en intracellulaire en configuration cellule entière chez des souris PValb-Cre x Ai14 (Devienne et al., 2018).

Nous avons sondé la présence des ARNm correspondants aux protéines suivantes :

- la parvalbumine
- le transporteur vésiculaire du glutamate Vglut2, pour identifier les cellules glutamatergiques
- les enzymes de synthèse du GABA, GAD65 et GAD67 (GAD : *Glutamic Acid Decarboxylase*) pour identifier les cellules GABAergiques.
- les trois isoformes des canaux T, Cav3.1 Cav3.2 et Cav3.3

#### 5.2.1. Conception des amorces

Des amorces de PCR efficaces et sélectives ont été conçues pour l'amplification (cf. Tableau 5) et la détection fidèle des transcrits de cellules uniques (cf. Tableau 6). A partir des ARNm (ARN messagers) d'intérêt, retrouvés via la NCBI Reference Sequence Database, les séquences communes aux différentes variantes d'épissage contenant le moins d'homologie de séquence sont détectées avec le logiciel MACAW (Multiple Alignment Construction & Analysis Workbench). L'étude des structures introns-exons de ces gènes via BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) permet de vérifier le chevauchement d'introns pour éviter l'amplification d'ADN génomique et n'amplifier que l'ADN codant (ADNc). L'utilisation d'amorces internes pour la seconde PCR de détection permet une meilleure spécificité et efficacité d'amplification.

## MATERIEL & METHODES

Gène	Amorce sens (5' > 3')	Amorce anti-sens (5' > 3')
<b>Parvalbumine</b>	GCCTGAAGAAAAAGAACCCG	AATCTTGCCGTCCCCATCCT
<b>Vglut2</b>	TGGAGAAGAAGCAGGACAACC	GTGAGCAGTATCGCAGCCCC
<b>GAD65</b>	CCAAAAGTTCACGGGCGG	TCCTCCAGATTTTGC GGTTG
<b>GAD67</b>	TACGGGGTTTCGCACAGGTC	CCCAGGCAGCATCCACAT
<b>Cav3.1</b>	CACCGATGTCACTGCCCAAG	GGCTCTCCTGACCCTCTCCA
<b>Cav3.2</b>	TACCAGACAGAGGAGGGCGA	CTATCACCACCAGGCACAGG
<b>Cav3.3</b>	GTCCCCCTCCATCCCCTC	CAATGAAGAAGTCCAAGCGGTT

**Tableau 5 | Séquences des amorces pour la 1<sup>ère</sup> PCR d'amplification**

Gène	Amorce sens (5' > 3')	Amorce anti-sens (5' > 3')
<b>Parvalbumine</b>	GCCTGAAGAAAAAGAACCCG	AATCTTGCCGTCCCCATCCT
<b>Vglut2</b>	TGGAGAAGAAGCAGGACAACC	GTGAGCAGTATCGCAGCCCC
<b>GAD65</b>	CCAAAAGTTCACGGGCGG	TCCTCCAGATTTTGC GGTTG
<b>GAD67</b>	TACGGGGTTTCGCACAGGTC	CCCAGGCAGCATCCACAT
<b>Cav3.1</b>	CACCGATGTCACTGCCCAAG	GGCTCTCCTGACCCTCTCCA
<b>Cav3.2</b>	TACCAGACAGAGGAGGGCGA	CTATCACCACCAGGCACAGG
<b>Cav3.3</b>	GTCCCCCTCCATCCCCTC	CAATGAAGAAGTCCAAGCGGTT

**Tableau 6 | Séquences des amorces pour la 2<sup>e</sup> PCR de détection**

### 5.2.2. Préparation des tranches et enregistrements intracellulaires

Les tranches sont préparées comme ci-dessus (cf. 6.1.1.) à partir de souris PVcre-Ai14 âgées de 17 à 21 jours. Les pipettes de patch en borosilicate sont systématiquement manipulées avec des gants pour éviter toute contamination. 8µL de milieu intracellulaire sont introduits dans la pipette, préparé dans des conditions stériles (*RNAse-free*) et contenant (en mM) : 144 potassium-gluconate, 0,5 EGTA, 10 HEPES, 3 MgCl<sub>2</sub> (295mOsm, pH 7,2 après équilibration, résistance de pipette : 5 à 7 M $\Omega$ ). Une fois le neurone fluorescent visualisé, la pipette est délicatement approchée avec une pression positive de manière à dégager localement le tissu et diminuer les risques de contamination. L'enregistrement en mode courant-imposé en configuration cellule entière permet l'identification rapide des propriétés électrophysiologiques de la cellule pendant une durée maximale de 10min. A la fin des enregistrements, une pression négative est appliquée afin de récolter le cytoplasme et la pipette doucement retirée de façon à obtenir une configuration *outside-out* protégeant le contenu de la pipette de toute contamination.

## MATERIEL & METHODES

### 5.2.3. Reverse transcription et PCR

Le cytoplasme récolté contenu dans la pipette de patch est expulsé dans un tube de PCR contenant les désoxynucléotides-tri-phosphate (dNTPs, 2.5mM chacun), les amorces d'amplification randomisées (25µM chacune), du di-thio-thréitol (DTT, 0.2M) comme agent réducteur évitant les formations de structures secondaires, la reverse-transcriptase (0.5µL) et une enzyme inhibitrice de la RNase (0.5µL). Les ARNm contenus dans ces échantillons sont reverse-transcrits en ADN codant (ADNc) pendant une nuit à 37°C, puis les tubes sont conservés à -80°C jusqu'à l'étape suivante. Une première PCR d'amplification de tous les ADNc en même temps (PCR multiplex) est réalisée. Elle permet d'augmenter suffisamment le nombre de copies d'ADNc dans le but d'obtenir une répartition fiable des produits de PCR en aliquots, servant de matrices pour la seconde PCR. Au cours de celle-ci, chacun des produits de PCR est individuellement amplifié avec son couple d'amorces spécifiques pour la détection séparée de chaque ADNc d'intérêt. Chaque produit de PCR est placé dans un puits sur un gel d'agarose à 2% réalisé avec du Bromure d'Éthidium comme agent intercalant de l'ADN. L'électrophorèse est effectuée puis analysée pour déterminer les ADNc amplifiés à partir des ARNm contenus dans le cytoplasme de chaque cellule enregistrée.

Produits	Fournisseurs	Références
NaCl	Sigma Aldrich	S6191
KCl	Sigma Aldrich	60128
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma Aldrich	S5011
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma Aldrich	31437
K-gluconate	Sigma Aldrich	G4500
K-méthane-sulfonate	Fluka	64280
D-Mannitol	Sigma Aldrich	M9647
D-(+)-glucose	Sigma Aldrich	49159
EGTA	Sigma Aldrich	E3889
HEPES	Sigma Aldrich	H3375
CaCl <sub>2</sub>	Sigma Aldrich	21114
MgCl <sub>2</sub>	Sigma Aldrich	63020
PBS	Sigma Aldrich	D1408
PFA liquide 16%	Delta Microscopies	15710
Tween20	Sigma Aldrich	P9416
Triton100X	Sigma Aldrich	T8787
Donkey serum	Sigma Aldrich	D9663
Fluoromount	Sigma Aldrich	F4680
Trizma	Sigma Aldrich	T1503
Huile minérale	Sigma Aldrich	M5904
Bromure d'Éthidium	Sigma Aldrich	E1510
Inhibiteur RNase	Promega	N2511

Tableau 7 | Liste des produits utilisés.



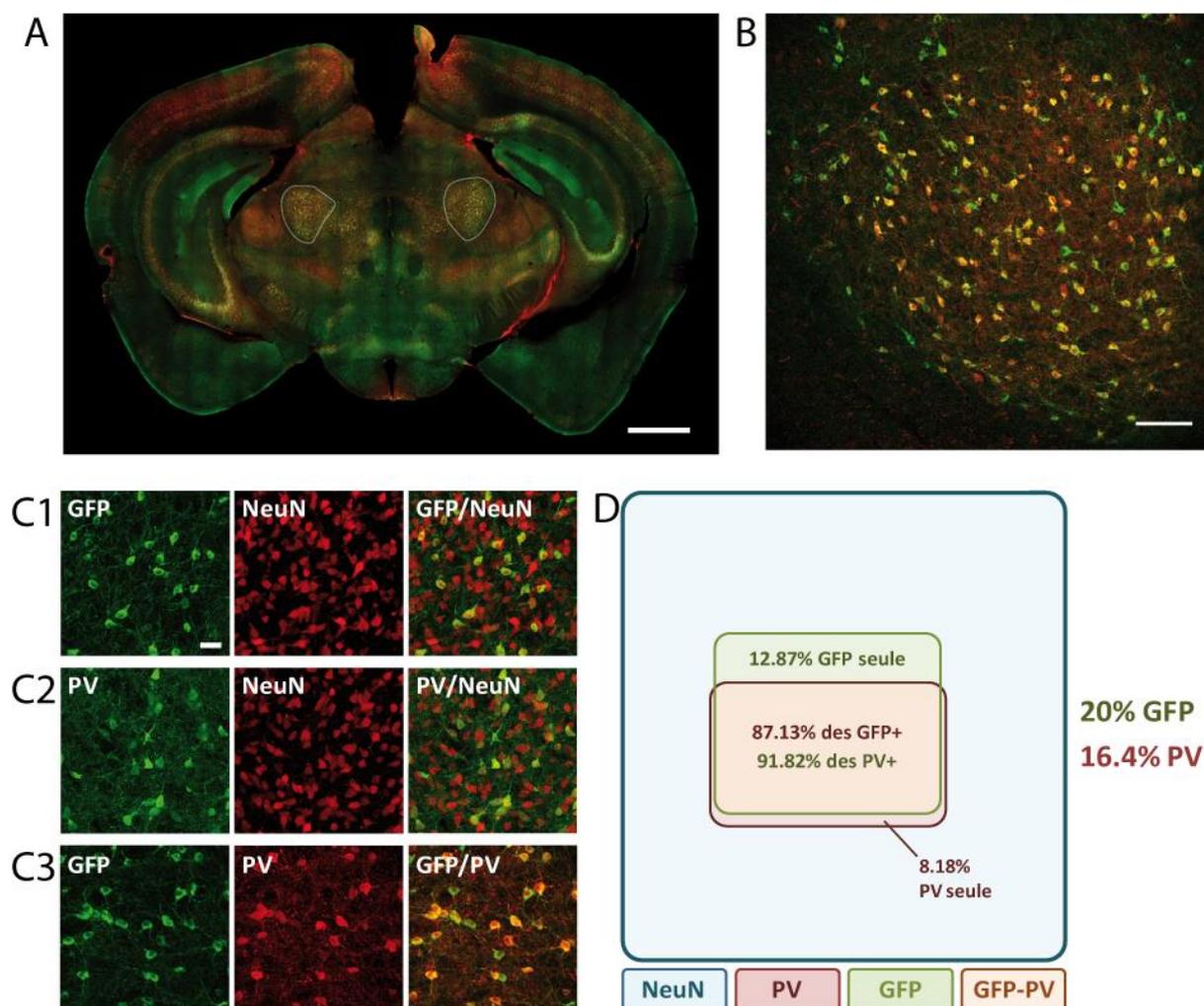
# RESULTATS

## 1. Expression du canal Cav3.2 et de la PV dans les neurones de l $\alpha$ APN.

Afin d'étudier la localisation du canal Cav3.2 dans l $\alpha$ APN, nous avons utilisé la lignée murine KI-Cav3.2-eGFPflox (KI) chez laquelle un tag GFP est exprimé dans une boucle extracellulaire du canal Cav3.2. Ce dernier nous a permis de déterminer, dans un premier temps, la proportion de neurones de l $\alpha$ APN exprimant la protéine de fusion Cav3.2-GFP, à l'aide de co-marquages anti-GFP anti-NeuN (n=2 mâles et 1 femelle, 11 à 18 images analysées par souris ; Figure 22C1). Nous avons estimé que  $20.00 \pm 0.60$  % des neurones de l $\alpha$ APN expriment le canal Cav3.2-GFP (cf. Tableau 8). Afin d'identifier les populations de neurones présentes dans l $\alpha$ APN, nous avons d'abord tenté d'utiliser le marquage GAD67 pour observer les cellules GABAergiques. Celui-ci n'ayant pas permis de distinguer des corps cellulaires, nous avons utilisé les principaux marqueurs cellulaires des interneurons corticaux, à savoir la parvalbumine (PV), le peptide vaso-intestinal (VIP), le neuropeptide Y (NPY) et la somatostatine (SOM). Seule la PV est exprimée dans l $\alpha$ APN (Figure 22A, B). Des co-marquages anti-PV anti-NeuN ont révélé que  $16.40 \pm 0.10$  % des neurones de l $\alpha$ APN expriment la PV (n=2 mâles et 1 femelle, 7 à 9 images analysées par souris ; Figure 22C2, Tableau 8). Afin d'évaluer le recouvrement entre les populations Cav3.2-GFP+ et PV+, nous avons effectué des co-marquages anti-GFP anti-PV (n=2 mâles et 1 femelle, 11 à 12 images analysées par souris ; Figure 22C3). Nous avons d'abord déterminé que  $87.13 \pm 1.75$  % des neurones Cav3.2-GFP+ co-expriment la PV (Figure 22C3, D, Tableau 8). Réciproquement  $91.82 \pm 0.97$  % des neurones PV+ co-expriment la GFP (Figure 22C3, D, cf Tableau 8). Ces résultats indiquent que les populations de neurones Cav3.2-GFP+ et PV+ présentent un fort taux de recouvrement. En rapportant le pourcentage de co-expression de chaque population au pourcentage de neurones qu'elles représentent dans l $\alpha$ APN, nous avons estimé que la population de neurones co-exprimant Cav3.2-GFP et la PV représente en moyenne 16% des neurones de l $\alpha$ APN.

Population	Pourcentagemoyens (%)	SEM (%)
% neurones GFP+	20.00	$\pm 0.60$
% neurones PV+	16.40	$\pm 0.10$
% neurones GFP+ exprimant aussi la PV	87.13	$\pm 1.75$
% neurones seulement GFP+	12.87	$\pm 1.75$
% neurones PV+ exprimant aussi la GFP	91.82	$\pm 0.97$
% neurones seulement PV+	8.18	$\pm 0.97$

**Tableau 8 | Pourcentages moyens de neurones de l $\alpha$ APN exprimant la GFP et/ou la PV, obtenus par comptages cellulaires à partir de co-marquages anti-GFP, anti-PV, anti-NeuN chez des souris KI.**



**Figure 22 | Expression de Cav3.2-GFP et de la PV parmi les neurones de l $\alpha$ APN**

(A) Co-marquage anti-GFP (vert) anti-PV (rouge) sur une tranche coronale de souris KI à un niveau d'antéro-posteriorité contenant l $\alpha$ APN (délimitée en blanc), observé en épifluorescence. Barre d'échelle : 1mm

(B) Co-marquage anti-GFP (vert) anti-PV (rouge) dans l $\alpha$ APN, observé en microscopie confocale. Barre d'échelle : 100 $\mu$ m.

(C) Double marquages anti-GFP / anti-NeuN (C1), anti-PV / anti-NeuN (C2) et anti-GFP / anti-PV (C3) réalisés sur des coupes d $\alpha$ APN observées en microscopie confocale pour effectuer les comptages cellulaires. Barre d'échelle : 30 $\mu$ m, pour toutes les images

(D) Diagramme des proportions de neurones de l $\alpha$ APN exprimant la GFP et/ou la PV déterminées par comptages cellulaires sur chacun des trois co-marquages.

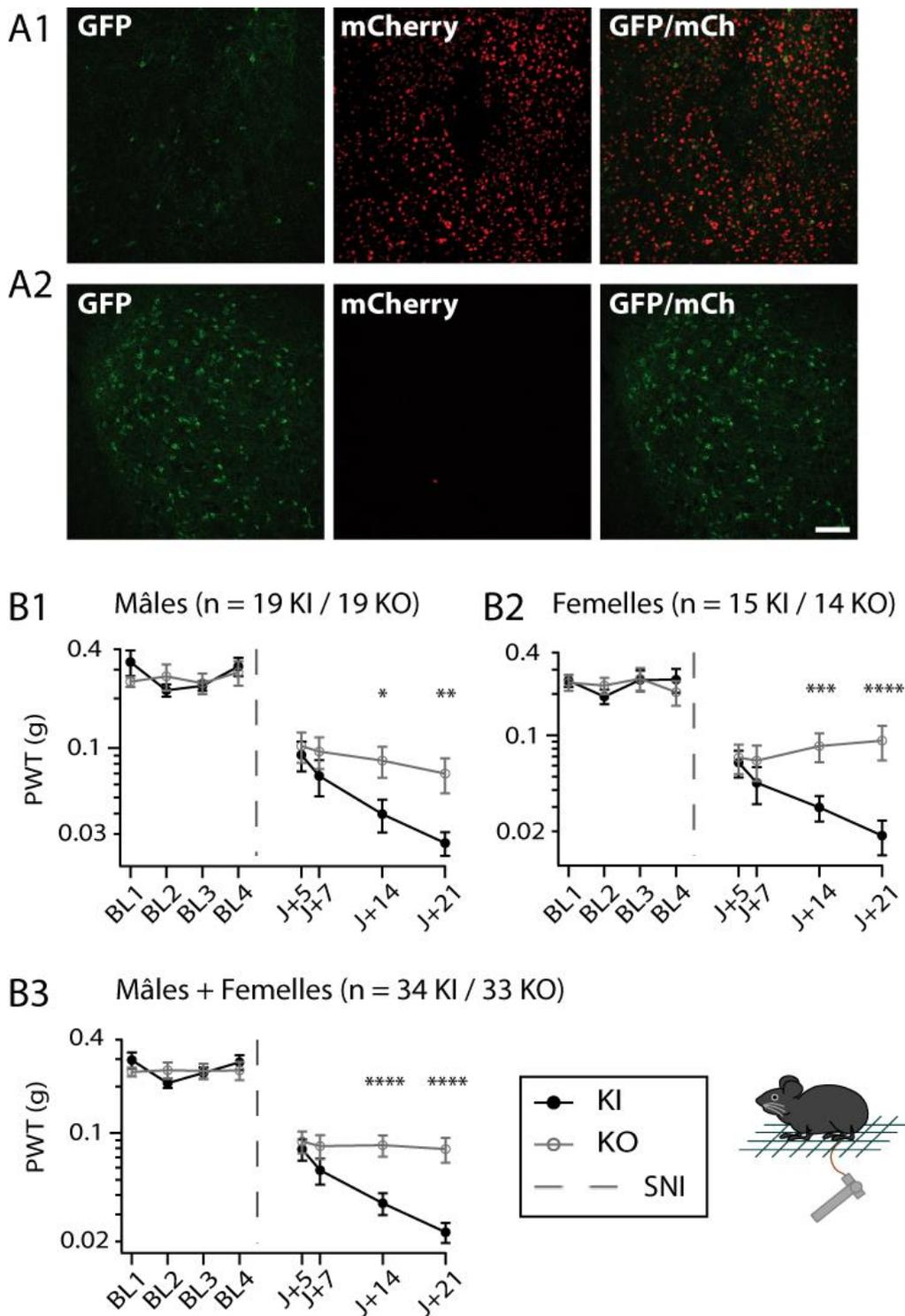
## 2. Impact comportemental de la délétion du canal Cav3.2 dans $\text{l}\alpha\text{APN}$

### 2.1. Impact de la délétion du canal Cav3.2 dans $\text{l}\alpha\text{APN}$ sur la sensibilité mécanique

Pour étudier le rôle du canal Cav3.2 exprimé dans les neurones de  $\text{l}\alpha\text{APN}$  dans la perception mécanique, nous avons injecté un virus AAV-Cre-mCherry bilatéralement dans  $\text{l}\alpha\text{APN}$  de souris KI, afin de produire une délétion locale du canal Cav3.2 et d'en tester l'impact sur les seuils de retrait de la patte (PWT : *Paw Withdrawal Threshold*) mesurés à l'aide de filaments de Von Frey. Ce virus a été préalablement testé chez des souris KI (n=2 mâles) par injection unilatérale.  $\text{l}\alpha\text{APN}$  injecté (Figure 23A1), exprimant la mCherry, montre un nombre de neurones GFP+ très inférieur à celui de  $\text{l}\alpha\text{APN}$  non injecté (Figure 23A2), témoignant d'une délétion putative du canal Cav3.2. Ayant ainsi montré l'efficacité de cette approche, trois cohortes comportementales ont été générées, comportant un groupe de souris KO injectées avec  $\text{l}\alpha\text{AAV-mCherry-Cre}$  (total des 3 cohortes, n=19 mâles ; n=15 femelles) et un groupe de souris KI contrôles, injectées avec un AAV-mCherry (total des 3 cohortes, n=19 mâles ; n=14 femelles).

Afin de déterminer l'impact de cette délétion sur la perception mécanique aiguë, nous avons mesuré les PWT de la patte arrière gauche lésée de ces souris KI et KO. La sensibilité mécanique basale était testée pendant 4 semaines suivant les injections (BL, 25B). Les résultats obtenus sont semblables chez les mâles et les femelles. Aucune différence significative n'a été détectée entre les PWT en BL au sein de chaque groupe. La sensibilité des animaux reste donc stable tout au long de l'expression des virus. Aucune différence significative n'a été détectée entre les PWT KI et KO en BL (Figure 23B). La délétion du canal Cav3.2 dans la région de  $\text{l}\alpha\text{APN}$  n'a donc pas d'impact sur la perception mécanique aiguë des souris.

Suite aux mesures BL, des ligatures du nerf sciatique (SNI) étaient pratiquées pour observer l'impact de la délétion du canal Cav3.2 sur la mise en place de la neuropathie. Les souris ont été testées pendant 3 semaines post-SNI. Chez les souris KI et KO, on observe une chute des PWT à J+5 qui se poursuit jusqu'à J+21 (Figure 23B). Nous avons souhaité vérifier la stabilité de ces effets en effectuant une mesure supplémentaire en SNI à J+28 sur une des trois cohortes (groupe KI : n = 6 mâles et 4 femelles ; groupe KO : n = 5 mâles et 4 femelles). Aucune différence significative n'apparaît entre les mesures J+21 et J+28 chez les souris KI et KO (p=0.5 et p=0.28 respectivement, en test de Wilcoxon-Mann-Whitney pairé avec  $\alpha=0.05$ ).



**Figure 23 | La délétion du canal Cav3.2 dans l $\alpha$ APN atténue l'allodynie mécanique.**

(A) Marquage anti-GFP (vert) et mCherry (rouge) dans l $\alpha$ APN d'une souris KI injectée unilatéralement avec l $\alpha$ AAV-Cre-mCherry, observé en microscopie confocale. Echelle : 100  $\mu$ m, pour toutes les images. (A1) Hémisphère injecté ; (A2) Hémisphère non injecté.

(B) Mesures des PWT évalués en Von Frey selon la méthode up-down (Chaplan et al., 1994) chez des souris KI et KO mâles (B1) et femelles (B2), avant (BL) et après la lésion SNI. (B3) Cumul des souris mâles et femelles.

\*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.025$  ; \*\*\*  $p < 0.01$  ; \*\*\*\*  $p < 0.001$

## RESULTATS

Tous les PWT en SNI sont significativement différents de l'ensemble des PWT en BL, attestant de la mise en place d'une allodynie mécanique dans les deux groupes (Figure 23, cf Tableau 9). Cependant, cette diminution du PWT est atténuée chez les souris KO. En effet, une différence significative avec le groupe KI apparaît chez les KO dès J+14 (cf. Tableau 10). Cette atténuation de l'allodynie atteint 27% à J+21 (et est toujours présente à J+28 sur la cohorte testée, cf. Tableau 10). Le canal Cav3.2 exprimé dans l'APN semble donc participer à l'installation de l'allodynie mécanique dans le modèle de neuropathie SNI, chez les souris mâles et femelles. Il est à noter que l'effet anti-allodynique est plus marqué chez les femelles (35% d'atténuation, Figure XB2) que chez les mâles (22% d'atténuation, Figure 23B1).

	KI			KO		
	Mâles	Femelles	Mâles + Femelles	Mâles	Femelles	Mâles + Femelles
<b>J+5</b>	6.23x10 <sup>-9</sup>	2.81x10 <sup>-8</sup>	2.44x10 <sup>-15</sup>	4.93x10 <sup>-7</sup>	7.61x10 <sup>-7</sup>	4.84x10 <sup>-12</sup>
<b>J+7</b>	6.85x10 <sup>-11</sup>	1.02x10 <sup>-9</sup>	< 10 <sup>-15</sup>	5.92x10 <sup>-8</sup>	8.50x10 <sup>-7</sup>	3.59x10 <sup>-13</sup>
<b>J+14</b>	5.31x10 <sup>-14</sup>	2.12x10 <sup>-11</sup>	< 10 <sup>-15</sup>	1.91x10 <sup>-8</sup>	1.41x10 <sup>-5</sup>	1.21x10 <sup>-12</sup>
<b>J+21</b>	3.77x10 <sup>-15</sup>	3.21x10 <sup>-12</sup>	< 10 <sup>-15</sup>	1.77x10 <sup>-9</sup>	5.08x10 <sup>-5</sup>	6.77x10 <sup>-13</sup>

**Tableau 9 | Valeurs p issues des tests de comparaison des PWT SNI avec l'ensemble des PWT BL.** Test de Wilcoxon-Mann-Whitney (WMW) non pairé,  $\alpha=0.05$ . Toutes ces valeurs sont significatives.

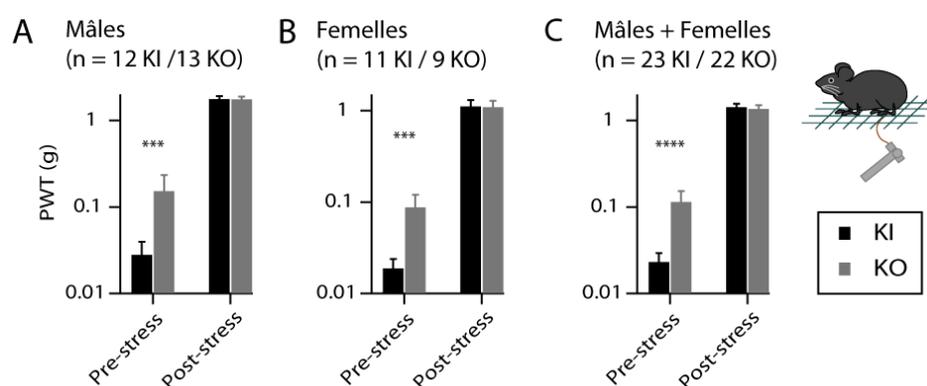
	Mâles	Femelles	Mâles + Femelles
<b>J+5</b>	0.34	0.44	0.35
<b>J+7</b>	0.16	0.22	0.10
<b>J+14</b>	<b>2.48x10<sup>-2</sup></b>	<b>1.48x10<sup>-3</sup></b>	<b>4.23x10<sup>-4</sup></b>
<b>J+21</b>	<b>1.32x10<sup>-2</sup></b>	<b>1.2x10<sup>-4</sup></b>	<b>1.84x10<sup>-5</sup></b>
<b>J+28 (1 cohorte)</b>	<b>3.89x10<sup>-2</sup></b>	<b>4.17x10<sup>-2</sup></b>	<b>8.31x10<sup>-3</sup></b>

**Tableau 10 | Valeurs p issues des tests de comparaison entre les PWT KI et KO**  
Test de WMW non pairé,  $\alpha=0.05$ . Les valeurs significatives sont indiquées en gras.

## RESULTATS

### 2.2. Impact de la délétion du canal Cav3.2 de l $\alpha$ APN sur l'analgésie par le stress

Nous avons voulu déterminer si la délétion du canal Cav3.2 dans la région de l $\alpha$ APN interférait avec le phénomène d'analgésie induite par le stress. Nous avons pour cela effectué un test de nage forcée sur deux des trois cohortes comportementales de souris neuropathiques KI (n=12 mâles ; n=11 femelles) et KO (n=13 mâles ; n=9 femelles) à J+21. Suite à cette nage forcée, les PWT ont été de nouveau testés en Von Frey (Figure 24). La mesure « pré-stress » correspond donc à la mesure J+21 (Figure 23). Après la nage forcée, les PWT « post-stress » augmentent significativement par rapport à la mesure « pré-stress » aussi bien chez les KI que chez les KO et dépassent les PWT de BL (cf. Tableau 11). La nage forcée induit donc bien une analgésie dans les deux groupes. Cependant les PWT « post-stress » ne diffèrent pas significativement entre KI et KO (cf. Tableau 12). La délétion du canal Cav3.2 exprimé dans la région de l $\alpha$ APN ne semble donc pas modifier les phénomènes d'analgésie induite par le stress.



**Figure 24 | La délétion du canal Cav3.2 dans la région de l $\alpha$ APN n'a pas d'impact sur l'analgésie induite par le stress.** Mesure des PWT évalués en Von Frey chez des souris KI et KO mâles (A) et femelles (B) à J+21, avant (pré-stress) et après (post-stress) un test de nage forcée. (C) Cumul des souris mâles et femelles.

	Mâles	Femelles	Mâles + Femelles
<b>KI</b>	4.88x10 <sup>-4</sup>	9.77x10 <sup>-4</sup>	2.38x10 <sup>-7</sup>
<b>KO</b>	4.88x10 <sup>-4</sup>	3.91x10 <sup>-3</sup>	9.54x10 <sup>-7</sup>

**Tableau 11 | Valeurs p issues des tests de comparaison entre les PWT pré et post-stress.** Test de WMW pairé,  $\alpha=0.05$ . Toutes ces valeurs sont significatives.

	Mâles	Femelles	Mâles + Femelles
<b>Pré-stress</b>	<b>5.94x10<sup>-3</sup></b>	<b>8.98x10<sup>-3</sup></b>	<b>4.57x10<sup>-4</sup></b>
<b>Post-stress</b>	0.44	0.41	0.32

**Tableau 12 | Valeurs p issues des tests de comparaison entre les PWT KI et KO** Test de WMW non pairé,  $\alpha=0.05$ . Les valeurs significatives sont indiquées en gras.

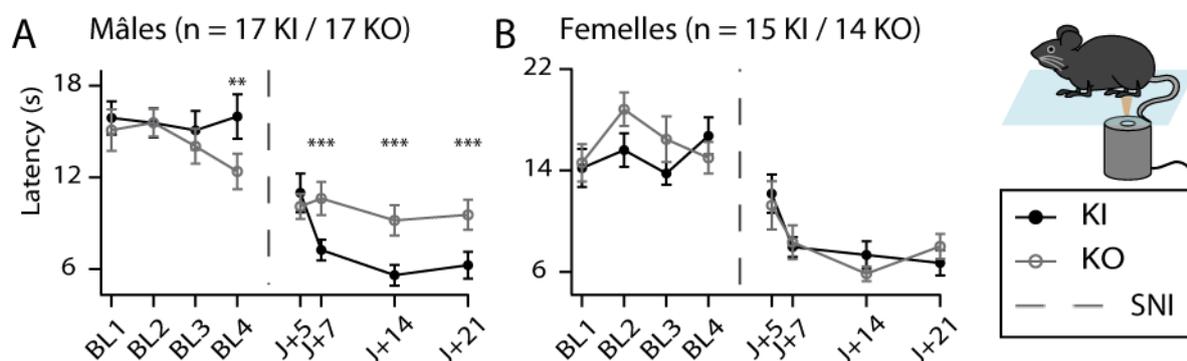
### 2.3. Impact de la délétion du canal Cav3.2 dans l'APN sur la sensibilité à la chaleur

L'impact de la délétion du canal Cav3.2 dans la région de l'APN sur la sensibilité à la chaleur a été déterminé à l'aide du test plantaire de Hargreaves. Les latences des réponses à la stimulation ont été mesurées chez les souris KI (n=17 mâles ; n=15 femelles) et KO (n=17 mâles ; n=14 femelles) avant et après SNI (Figure 25). Nous avons constaté que les résultats diffèrent entre les souris mâles et femelles. Chez les femelles (Figure 25B), les latences de réponse en BL sont statistiquement homogènes. L'expression des virus n'a donc pas d'impact sur la sensibilité basale à la chaleur des souris. Après les SNI, les latences chutent significativement à partir de J+7 chez les femelles KI et dès J+5 chez les femelles KO. Toutes les latences suivantes sont significativement différentes des latences basales, attestant de la mise en place d'une hyperalgie thermique à la chaleur dans les deux groupes (cf. Tableau 13). Cependant, aucune différence significative n'apparaît entre les latences de réponse des femelles KI et KO (Figure 25B, cf. Tableau 14). Ainsi, la délétion du canal Cav3.2 dans la région de l'APN chez les femelles semble n'avoir d'impact ni sur la perception aiguë de la chaleur ni sur la mise en place de l'hyperalgie thermique consécutive au SNI, contrairement aux effets anti-allodymiques observés sur la sensibilité mécanique.

Chez les mâles (Figure 25A), suite à la lésion SNI, on retrouve une chute significative des latences de réponse dès J+5, aussi bien pour les souris KI que KO (cf. Tableau X13). Ils présentent donc une hyperalgie thermique à la chaleur suite au SNI. Cependant, contrairement aux femelles, les mâles KO montrent des latences de réponse significativement supérieures à celles des KI dès J+7 (cf. Tableau 14). Cette atténuation de l'hyperalgie s'élève à 52% en moyenne sur les trois points de mesure. Le canal Cav3.2 exprimé dans la région de l'APN semble donc participer à la mise en place d'une hyperalgie thermique à la chaleur chez les mâles, corroborant les effets anti-allodymiques observés sur la sensibilité mécanique.

Par ailleurs, on constate également en condition basale que la dernière latence de réponse des mâles KO montre une chute significative par rapport aux trois précédents points de mesure (Figure 25A, cf. Tableau 14). A ce stade, il n'est pas possible de conclure si cette différence résulte d'une variabilité expérimentale, qui pourrait disparaître en augmentant le nombre d'animaux, ou si contrairement aux résultats observés chez les souris femelles la délétion du canal Cav3.2 dans la région de l'APN pourrait également avoir un impact sur la sensibilité aiguë à la chaleur chez les souris mâles.

## RESULTATS



**Figure 25 | La délétion du canal Cav3.2 dans la région de l'APN atténue significativement l'hyperalgie thermique à la chaleur chez les mâles mais pas chez les femelles.**

Mesure des latences de réponses des souris KI et KO mâles (A) et femelles (B) à une stimulation chaude en test plantaire de Hargreaves, avant et après lésion SNI.

	KI		KO	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles
J+5	<b><math>1.19 \times 10^{-3}</math></b>	$5.71 \times 10^{-2}$	$8.48 \times 10^{-4}$	$1.19 \times 10^{-3}$
J+7	<b><math>5.59 \times 10^{-10}</math></b>	$2.04 \times 10^{-7}$	$1.63 \times 10^{-3}$	$1.59 \times 10^{-5}$
J+14	<b><math>5.95 \times 10^{-12}</math></b>	$6.19 \times 10^{-7}$	$1.51 \times 10^{-4}$	$8.73 \times 10^{-10}$
J+21	<b><math>9.91 \times 10^{-11}</math></b>	$5.95 \times 10^{-8}$	$1.62 \times 10^{-4}$	$6.59 \times 10^{-7}$

**Tableau 13 | Valeurs p issues des tests de comparaison chaque latence en SNI et l'ensemble des latences en BL. Test de WMW non païré,  $\alpha = 0.05$ . Les valeurs significatives sont indiquées en gras.**

	Mâles	Femelles
BL4	<b><math>2.33 \times 10^{-2}</math></b>	0.23
J+5	0.34	0.29
J+7	<b><math>6.21 \times 10^{-3}</math></b>	0.47
J+14	<b><math>3.60 \times 10^{-3}</math></b>	0.27
J+21	<b><math>9.32 \times 10^{-3}</math></b>	0.12

**Tableau 14 | Valeurs p issues des tests de comparaison des latences de réponse KI et KO. Test de WMW non païré,  $\alpha = 0.05$ . Les valeurs significatives sont indiquées en gras.**

### 2.4. Impact de la délétion du canal Cav3.2 dans l'APN sur la locomotion

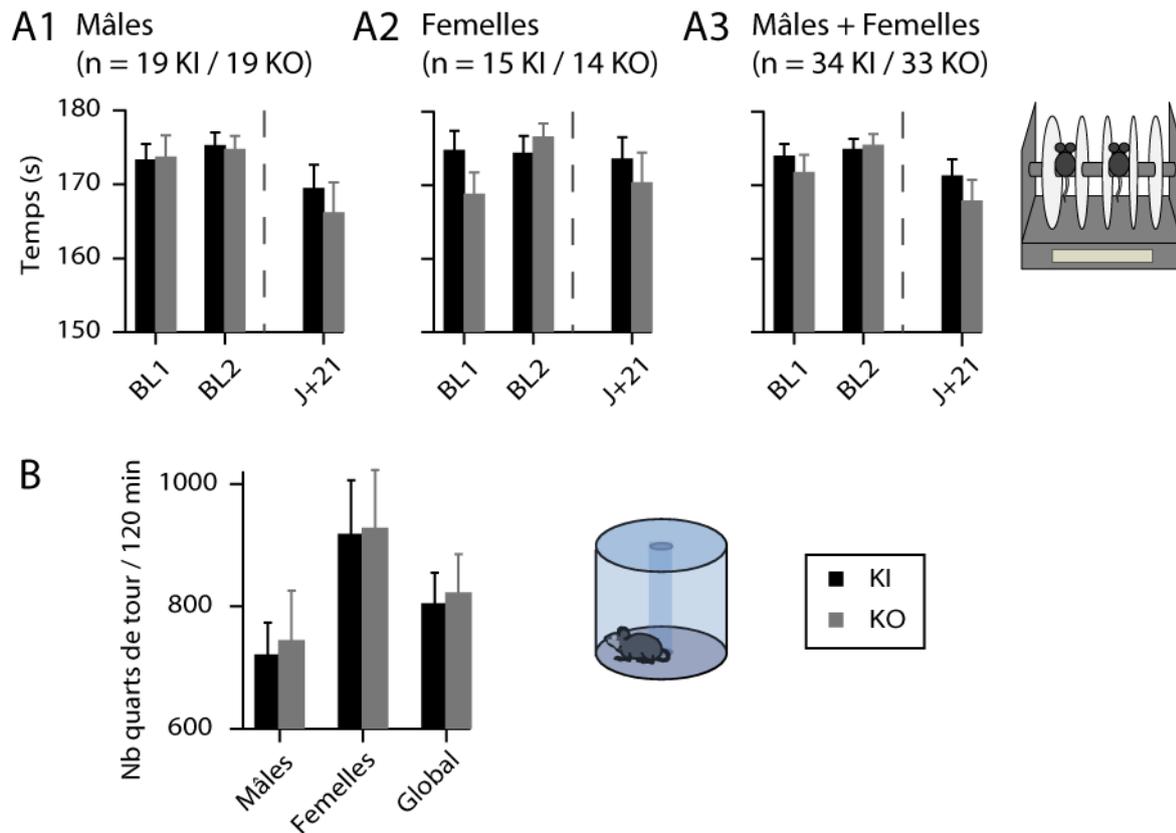
D'après les résultats obtenus avec les tests de Von Frey et de Hargreaves, la lésion SNI pratiquée chez les souris KI et KO a un impact sur les réponses comportementales aux stimuli mécaniques et thermiques chauds. Par ailleurs, la délétion du canal Cav3.2 chez les souris KO atténue dans certains cas les effets du SNI sur la douleur neuropathique. Ces effets peuvent résulter d'une modification de la perception sensorielle des souris. Cependant, ils pourraient aussi être la conséquence d'un trouble moteur, lié à la lésion SNI ou à la délétion du canal Cav3.2, altérant les réponses comportementales. Il convient donc de contrôler que les effets observés lors de ces tests résultent bien d'une modification de sensibilité et non d'un effet secondaire à un trouble locomoteur. Pour ce faire, nous avons testé la coordination motrice et la locomotion spontanée des souris des trois cohortes expérimentales.

Pour la coordination motrice, nous avons utilisé le test du rotarod. La latence avant la chute des souris KI (n=19 mâles ; n=15 femelles) et KO (19 mâles ; 14 femelles) était mesurée avec une rampe d'accélération du rotarod allant de 4 à 16 tours par minute (Figure 26A). Aucune différence significative n'apparaît entre les latences BL et SNI aussi bien chez les mâles (Figure 26A1) que chez les femelles (Figure 26A2). La lésion SNI n'a donc pas d'impact sur la coordination motrice des souris. Par ailleurs, aucune différence significative n'a été relevée entre les souris KI et KO (cf. Tableau 15). La délétion du canal Cav3.2 dans la région de l'APN n'impacte donc pas non plus la coordination motrice des souris.

Pour évaluer la locomotion spontanée nous avons utilisé le test du couloir circulaire et mesuré le nombre de quarts de tour effectués par les souris KI (n=19 mâles ; n=14 femelles) et KO (n=19 mâles, n=14 femelles) neuropathiques, après les mesures J+21 (Figure 26B). Si les femelles KI et KO tendent à être spontanément plus actives que les mâles, aucune différence significative entre les souris KI et KO n'a été relevée (cf. Tableau 16). La délétion du canal Cav3.2 n'a donc pas d'impact sur la locomotion spontanée des souris, mâles ou femelles.

Ces résultats confirment que les effets de la délétion préventive du canal Cav3.2 dans l'APN sur l'allodynie mécanique et l'hyperalgie thermique à la chaleur ne résultent pas d'un artefact locomoteur et qu'ils peuvent être imputés à une réelle modification des seuils de sensibilité des souris.

## RESULTATS



**Figure 26 | La délétion du canal Cav3.2 dans l'APN n'a pas d'impact sur la coordination motrice ou la locomotion spontanée des souris.**

(A) Mesure du temps passé par des souris KI et KO mâles (A1) et femelles (A2) (A3 : cumul des souris mâles et femelles) sur un rotarod présentant une rampe d'accélération.

(B) Mesure du nombre de quarts de tour effectués pendant 2h dans un couloir circulaire par des souris KI (n=19 mâles ; n=14 femelles) ou KO (n=19 mâles ; n=14 femelles).

	Mâles	Femelles	Mâles + Femelles
<b>BL1</b>	0.44	0.18	0.32
<b>BL2</b>	0.25	0.15	0.44
<b>J+21</b>	0.48	0.21	0.29

**Tableau 15 | Valeurs p issues des tests de comparaison des temps passés sur le rotarod entre souris KI et KO. Test de WMW non pairé,  $\alpha=0.05$ . Aucune valeur n'est significative.**

Mâles	Femelles	Mâles + Femelles
<b>0.35</b>	0.46	0.46

**Tableau 16 | Valeurs p issues des tests de comparaison des nombres de quarts de tour effectués en 120min dans les cyclotrons, entre souris KI et KO. Test de WMW non pairé,  $\alpha=0.05$ . Aucune valeur n'est significative**

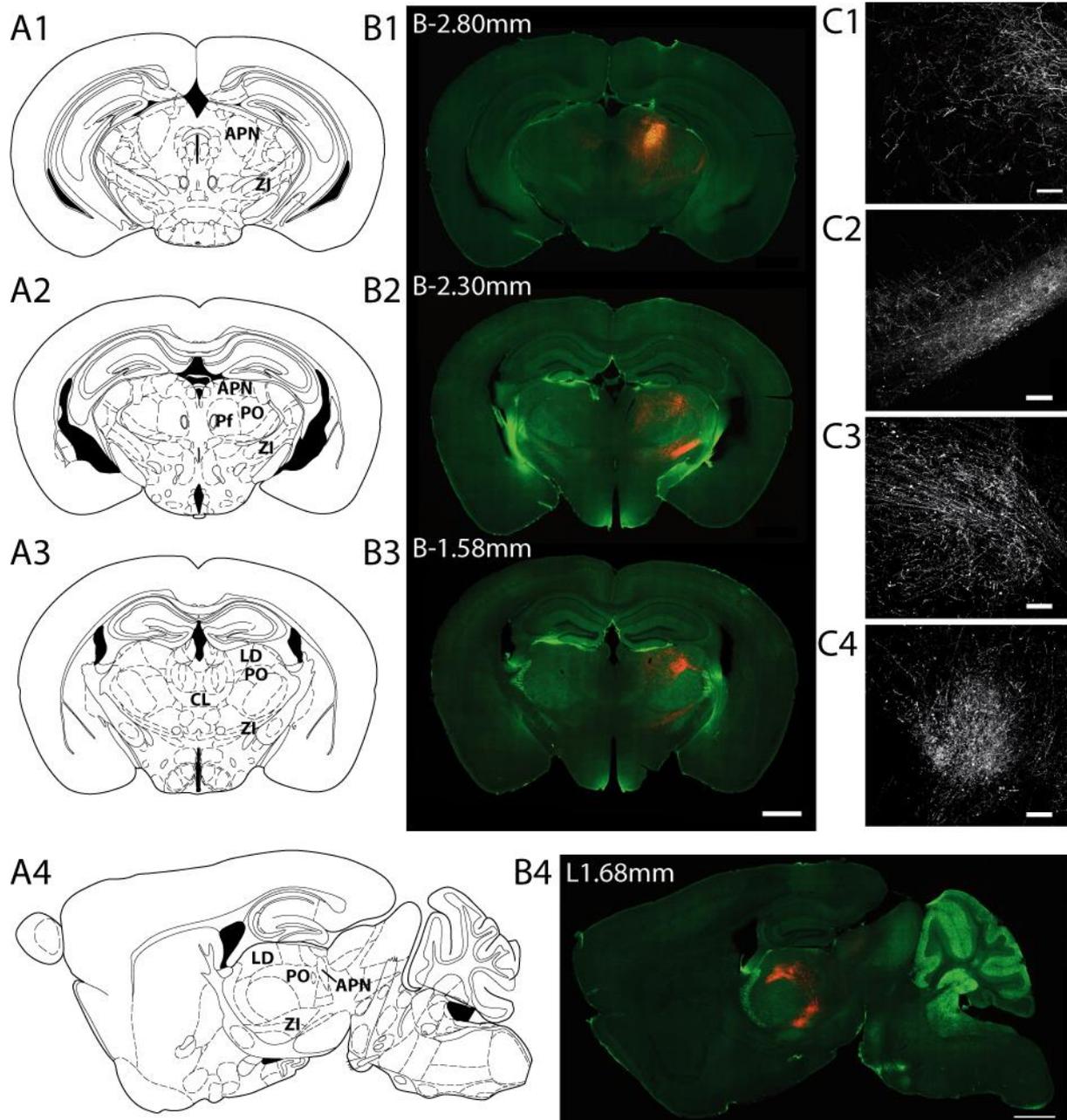
### 3. Structures cibles des neurones PV-positifs de l $\alpha$ APN

#### 3.1. Traçages antérogrades

Afin de comprendre les effets comportementaux de la délétion du canal Cav3.2 dans les neurones de la région de l $\alpha$ APN, il convient dans un premier temps de caractériser les neurones Cav3.2-GFP+. Pour ce faire, nous avons observé leurs projections anatomiques à l'aide d'injections virales et étudié leur excitabilité par enregistrements intracellulaires *in vitro*.

Nous avons tout d'abord voulu déterminer si ces neurones projettent vers d'autres structures ou s'il s'agit d'interneurones, en utilisant des injections virales pour effectuer des marquages antérogrades. Cependant, aucun outil génétique ne nous a permis de cibler spécifiquement les neurones Cav3.2-GFP+ de l $\alpha$ APN. Nous avons donc choisi une autre stratégie, profitant des résultats obtenus dans nos expériences de comptages cellulaires montrant que 87% des neurones GFP+ de l $\alpha$ APN co-expriment la PV. Nous avons donc utilisé la lignée murine PV-Cre ce qui nous permet de cibler avec une bonne probabilité la population de neurones Cav3.2-GFP+.

Nous avons donc effectué des injections unilatérales du virus AAV-Flex-tdTomato dans l $\alpha$ APN de souris PV-Cre, afin de visualiser les axones des cellules PV+ de l $\alpha$ APN (n=5 mâles, Figure 27). La spécificité des sites d'injection était systématiquement vérifiée (Figure 27B1). Des axones étaient visibles à l'extérieur de l $\alpha$ APN, dans l'hémisphère ipsilatéral à l'injection ainsi que dans l'hémisphère contralatéral, dans une moindre mesure. Nous avons d'abord observé des projections axonales ascendantes. Les plus fortes correspondent à des axones partant de l $\alpha$ APN injecté vers l $\alpha$ APN contralatérale via la commissure postérieure (Figure 27B1, C1), vers la ZI ipsilatérale ainsi que vers la ZI contralatérale, (Figure 27B2, B3, B4, C2), vers les colliculi supérieurs (ColSup, Figure 27B1, B2, B4) et vers certains noyaux thalamiques : les noyaux sensoriels postérieur (PO, figure 27B2, B3, B4, C3) et latéro-dorsal (LD, figure 27B3, C4), ainsi que dans le noyau parafasciculaire (Pf, figure 27B2).



**Figure 27 | Projections ascendantes des neurones PV+ de l'APN chez des souris PV-Cre.** (A) Schémas de différents niveaux de coupes de cerveau dans le plan coronal (A1 : B-2.80mm ; A2 : B-2.30mm ; A3-1.58mm) et parasagittal (A4 : L1.68mm) adaptés de l'atlas Paxinos and Franklin, 2012.

(B) Coupes coronales (B1 à B3) et parasagittales (B4) de cerveau de souris PV-Cre, montrant le site d'injection du virus exprimant la TdTomato de façon Cre dépendante (B1) et le marquage des axones des neurones PV+ de l'APN, observés en microscopie à épifluorescence. TdTomato : rouge ; Marquage anti-PV : vert

(C) Marquages TdTomato des neurones PV+ de l'APN observés sur des tranches coronales en microscopie confocale au niveau de l'APN contralatérale (C1), de la ZI (C2), du PO (C3) et du LD (C4).

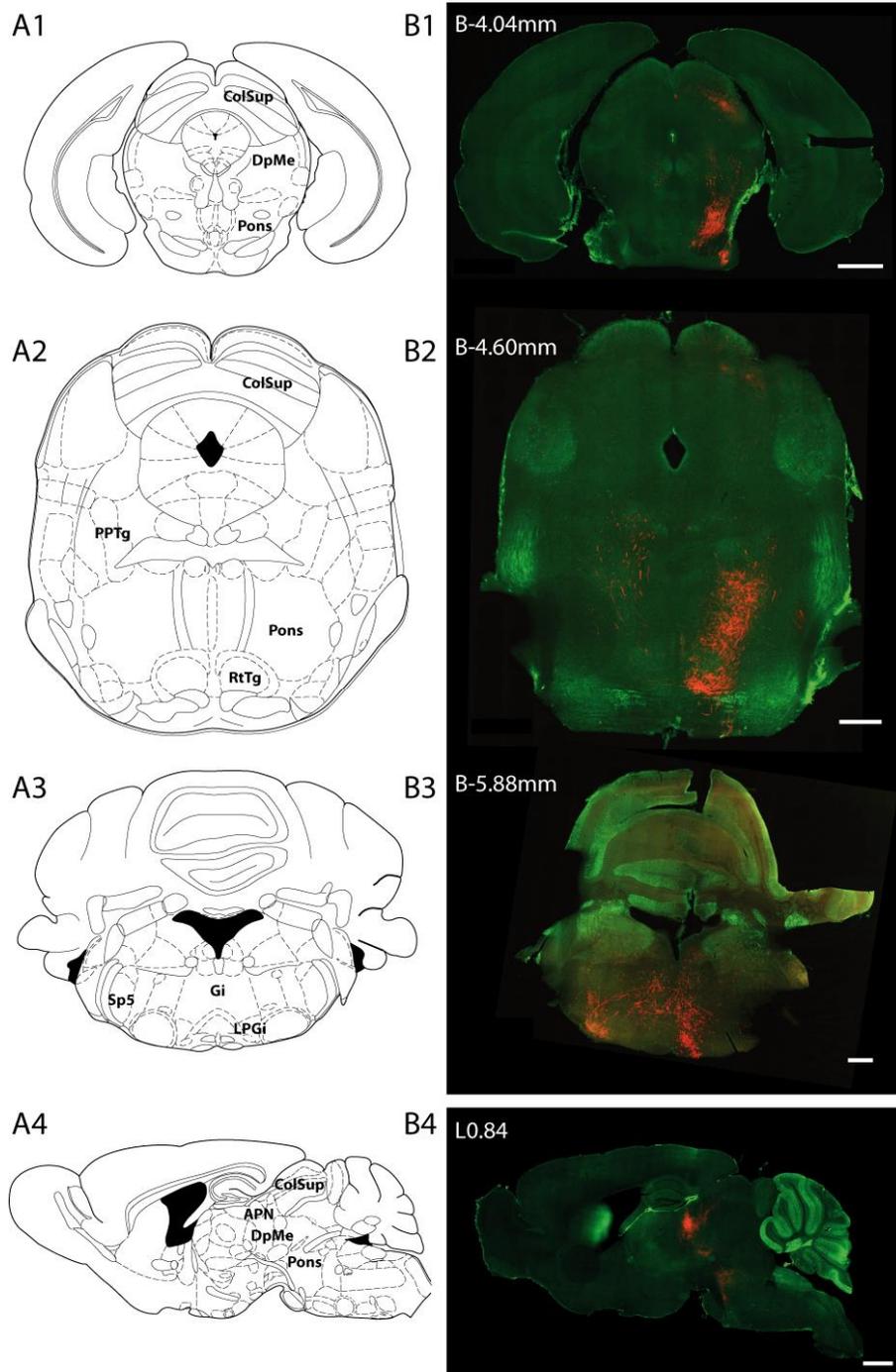
APN : Noyau Prétectal Antérieur ; CL : Noyau Centro-Latéral ; LD : Noyau Latéro-Dorsal ; Pf : Noyau Parafasciculaire ; PO : Noyau Postérieur ; ZI : Zona Incerta

## RESULTATS

---

Nous avons également observé des axones partant de l $\alpha$ APN et descendant dans des régions plus caudales, vers la formation réticulée du tronc cérébral, dans les hémisphères ipsilatéral et contralatéral (Figure 28). Des axones sont visibles dans le DpMe ipsilatéral et contralatéral (Figure 30A1, B1, A4, B4) ainsi que dans le PPTg contralatéral (Figure 28A2, B2). Une forte densité d'axones est visible dans la région du pont et autour du noyau réticulotegmental pontin (RtTg) en ipsilatéral (Figure 28A1, B1, A2, B2, A4, B4). Au niveau du bulbe rachidien, on observe des axones descendants médians dans le noyau gigantocellularis (Gi) qui semblent se séparer pour atteindre des régions différentes en fonction de l'hémisphère : des axones ventro-médians au niveau ipsilatéral, notamment dans le LPGi et des axones ventro-latéraux au niveau contralatéral notamment dans le noyau spinal trigéminal (SP5, Figure 28A3, B3).

Les neurones PV<sup>+</sup> de l $\alpha$ APN présentent donc à la fois des projections vers des structures centrales, notamment vers certains noyaux thalamiques tels que le POM, vers la ZI, vers les colliculi supérieurs, et des projections descendantes dans le pons, suggérant un rôle possible de ces neurones dans le traitement central de la douleur comme dans le contrôle descendant de la perception douloureuse. Ceci n'exclue pas la possibilité que certains neurones PV<sup>+</sup> de l $\alpha$ APN soient des interneurones, envoyant des projections au sein même de la structure.



**Figure 28 | Projections descendantes des neurones PV+ de l'APN chez des souris PV-Cre**  
 (A) Schémas de différents niveaux de coupes de cerveau dans le plan coronal (A1 : B-5.88mm ; A2 : B-4.60mm ; A3-4.04mm) et parasagittal (L0.84) adaptés de l'atlas Paxinos and Franklin, 2012.

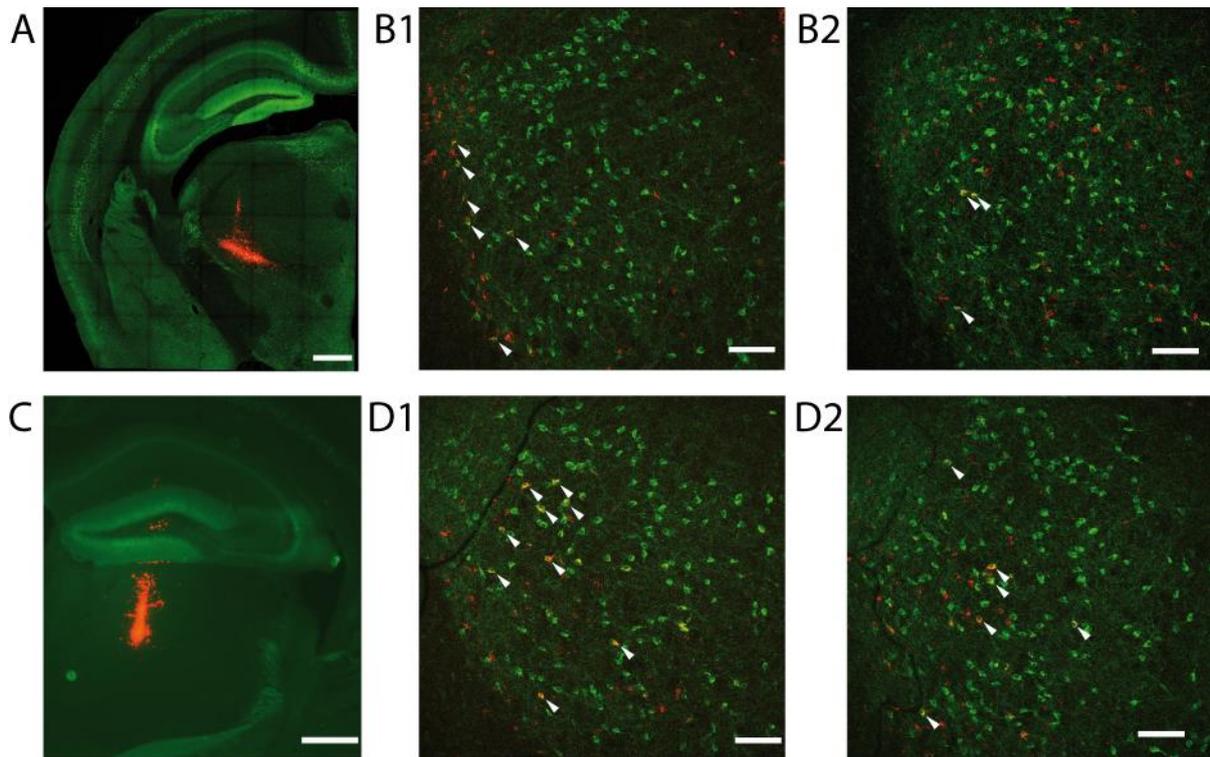
(B) Coupes coronales (B1, B2, B3) et parasagittale (B4) de cerveaux de souris PV-Cre injectées avec l'AAV-Flex-TdTomato, montrant le marquage TdTomato (rouge) des axones des neurones PV+ de l'APN, et un marquage anti-PV (vert) observés en microscopie à épifluorescence.

APN : Noyau Prétectal Antérieur ; ColSup : Colliculi Supérieur ; DpMe : Noyaux Profonds du Mésencéphal ; Gi : Noyau Paragigantocellularis ; LPGi : Noyau Latéro-Paragigantocellularis ; PPTg : Noyau Pédonculo-Pontin Tegmental ; RtTg : Noyau Réticulo-Tegmental pontin ; Sp5 : Noyau trigéminal Sp5

### 3.2. Traçages rétrogrades

La visualisation d'axones dans différentes structures ne permet pas de conclure que leurs neurones sont la cible de projections des neurones PV+ de l'APN (3.1 et Figures 26 et 28). Pour confirmer la présence de terminaisons axonales dans certaines de ces structures nous avons effectué des injections à l'aide de RedRetrobeads chez des souris KI. La connectivité de l'APN avec le PO et la ZI étant évoquée dans la littérature récente (Bokor et al., 2005; Giber et al., 2007), nous avons réalisé ces injections dans ces deux structures (Figure 29). Des marquages anti-GFP nous ont permis de repérer les neurones Cav3.2-GFP+ au niveau de l'APN afin de déterminer si ceux-ci étaient rétrogradement marqués par des RedRetrobeads, capturées par leurs terminaisons au niveau du site d'injection.

Chez les souris KI injectées dans le POM (n=3, Figure 29A,B) et dans la ZI (n=2, Figure 29C, D) la spécificité des sites d'injection a été systématiquement vérifiée (Figure 29A et C respectivement). Dans les deux cas, des cellules de l'APN sont marquées par des RedRetrobeads (Figure 29B1, B2, D1, D2), et certaines d'entre elles expriment le canal Cav3.2-GFP+ (indiquées par des flèches blanches). Ces résultats indiquent que des neurones Cav3.2-GFP+ de l'APN projettent sur des neurones du POM et de la ZI. Cependant, des neurones n'exprimant pas Cav3.2-GFP sont également marqués par les RedRetrobeads (Figure 29B1, B2, D1, D2). Les terminaisons axonales présentes dans le PO et la ZI proviennent donc de différents types neuronaux de l'APN.



**Figure 29 | Marquage rétrograde des neurones de  $l\alpha$ APN projetant vers le PO et la ZI chez des souris KI**

(A, C) Photos du site d'injection des RedRetrobeads (rouge) dans la ZI (A) ou dans le PO (C) d'une souris KI, avec marquage anti-GFP (vert), observées en microscopie confocale. Barre d'échelle : 500 $\mu$ m.

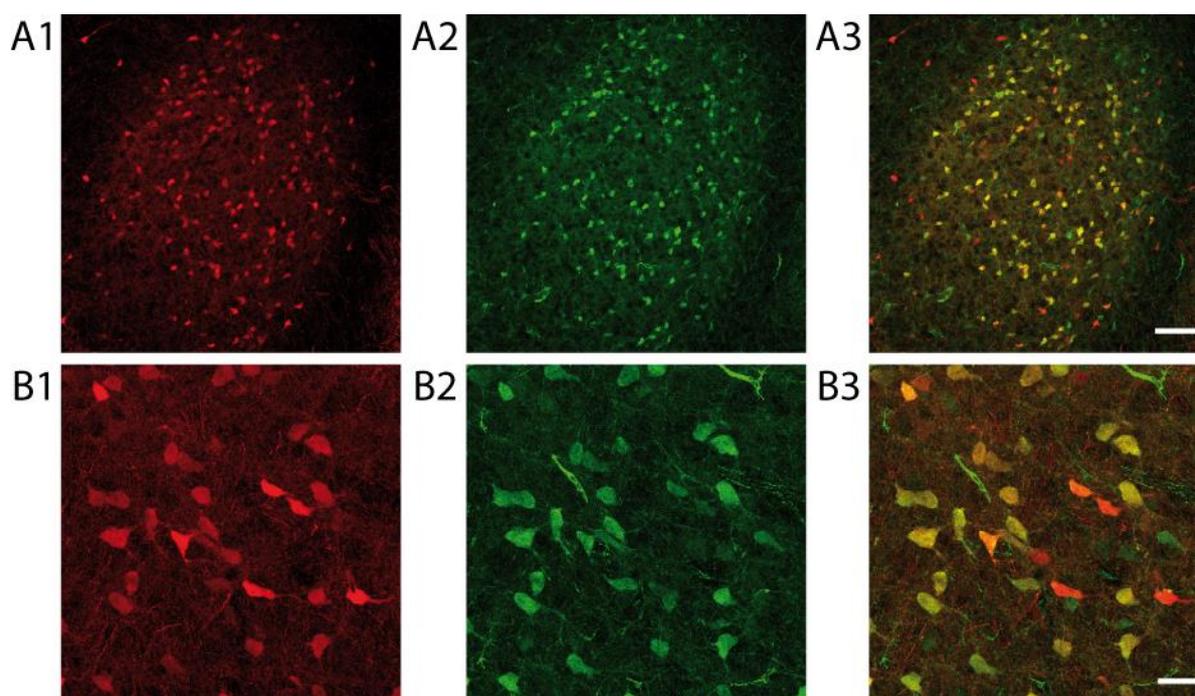
(B, D) Deux exemples (B1, B2 et D1, D2) de marquage anti-GFP (vert) avec des RedRetrobeads (rouge) dans  $l\alpha$ APN de souris KI injectées dans la ZI (B1, B2) ou dans le PO (D1, D2) observés en microscopie confocale. Des cellules Cav3.2-GFP+ rétrogradement marquées par les RedRetrobeads sont indiquées par des flèches blanches. Barre d'échelle : 100 $\mu$ m pour les deux photos.

## 4. Caractérisation des neurones PV+ de $\lambda$ APN

### 4.1. Modèle PVcre-Ai14

L'atténuation de l'allodynie mécanique et de l'hyperalgie thermique observée suite à la délétion préventive du canal Cav3.2 pourrait être due à une modification de l'excitabilité des neurones exprimant ce canal. Dans le but d'étudier cette hypothèse et de caractériser les neurones Cav3.2-GFP+ de  $\lambda$ APN, nous avons souhaité réaliser des enregistrements électrophysiologiques de ces neurones sur des tranches de cerveau *in vitro*. Cependant, la fluorescence intrinsèque du tag GFP ne permet pas de visualiser les neurones Cav3.2-GFP+ de  $\lambda$ APN en tranche lors des expériences d'électrophysiologie et aucun outil génétique ne nous permet de cibler spécifiquement ces neurones afin d'y surexprimer un marqueur fluorescent. Ainsi, de la même façon que pour le traçage axonal des neurones PV+ de  $\lambda$ APN (cf 3.1), nous avons tiré avantage du fort recouvrement observé entre les populations neuronales exprimant le canal Cav3.2 et la PV en réalisant un croisement entre la lignée de souris PV-Cre et la lignée reportrice Ai14 chez laquelle une TdTomato floxée permet l'expression Cre dépendante de cette protéine fluorescente. Les animaux issus du croisement entre des PV-Cre et des Ai14, respectivement homozygotes, étaient donc hétérozygotes pour les deux locus. Cette approche nous permet de cibler avec une bonne probabilité la population de neurones Cav3.2-GFP+, sachant que 92% des neurones PV+ de  $\lambda$ APN co-expriment le canal Cav3.2-GFP chez les KI (cf. 1).

Afin de valider ce modèle de croisement, nous avons réalisé des marquages anti-PV et visualisé l'expression de la TdTomato chez ces souris PV-Cre-Ai14 (n=3 mâles, Figure 30). Des comptages cellulaires ont été réalisés afin d'évaluer le pourcentage de cellules qui co-expriment la PV et la TdTomato (cf. Tableau 17). Parmi les cellules PV+, 79.52  $\pm$  2.55 % co-expriment la TdTomato (cf. Tableau 17). La Cre est donc présente dans une sous-population très importante de PV+. Cependant, uniquement 81.10  $\pm$  2.44 % des cellules TdTomato+ co-expriment la PV (cf. Tableau 17). Ainsi lors des enregistrements intracellulaires *in vitro* de neurones présumés PV chez des souris PV-Cre-Ai14, nous avons la possibilité d'enregistrer une population de neurones représentant 81% de la population PV+ avec un risque de d'enregistrer 19% de neurones TdTomato+ non PV+ (faux-positifs). Il n'est pas exclu qu'un problème de détection lors de l'immunohistochimie biaise ces résultats. Cependant, ce risque technique pourrait jouer aussi bien en faveur d'un manque de détection que pour un marquage non spécifique.



**Figure 30 | Expression de la TdTomato et de la PV dans les neurones de lAPN de souris double hétérozygotes issues du croisement PV-Cre x Ai14, observée en microscopie confocale**

Expression de la TdTomato (rouge, A1, B1) et de la PV (vert, A2, B2) dans lAPN, observée au grossissement 20X (A) et 63X (B). A3 et B3 : superposition des deux canaux. Barre d'échelle en A : 100µm. Barre d'échelle en B : 30µm

Population	Pourcentage moyen (%)	SEM (%)
% neurones PV+ co-exprimant la TdTomato	79.52	0.03
% neurones exprimant seulement la PV	20.48	0.03
% neurones TdTomato+ co-exprimant la PV	81.10	0.02
% neurones exprimant seulement la TdTomato	18.90	0.02

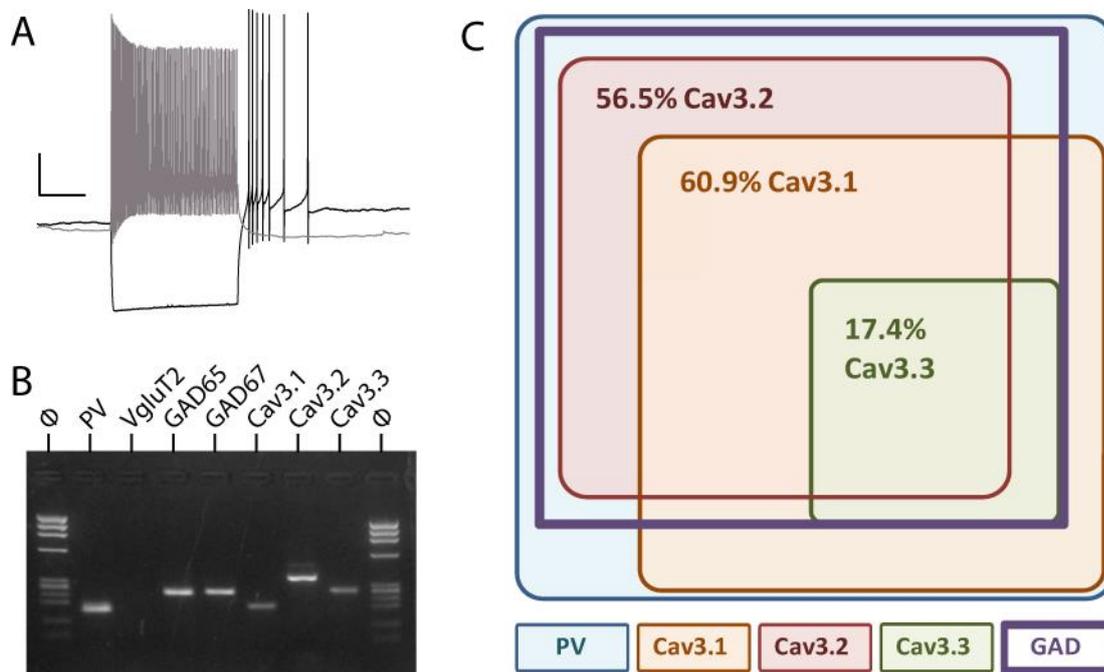
**Tableau 17 | Pourcentages moyens de neurones de lAPN exprimant la PV et/ou la TdTomato obtenus par comptage cellulaires à l'aide d'un marquage anti-PV chez les souris double hétérozygotes PV-Cre-Ai14.**

### 4.2. Caractérisation moléculaire des neurones PV+ de l $\alpha$ APN

Afin de déterminer la nature GABAergique vs glutamatergique des neurones PV+ de l $\alpha$ APN nous avons utilisé la RT-PCR multiplex sur cellule unique dans les neurones TdTomato+ des souris PV-Cre-Ai14 (n=4 mâles et 2 femelles de P15 à P21) enregistrés en intracellulaire *in vitro* (Figure 31A). La présence des ARNm correspondants à la PV, au transporteur du glutamate Vglut2, aux enzymes GAD65 et GAD67 ainsi qu'aux 3 isoformes des canaux T, Cav3.1 Cav3.2 et Cav3.3 a été recherchée pour chaque cellule TdTomato+PV+ enregistrée (Figure 31B, Tableaux 18, 19).

Nos études immunohistochimiques indiquent que les neurones TdTomato+ correspondent à des neurones PV+ dans 80% des cas (cf. 4.1), nous avons donc tout d'abord vérifié la présence du transcrite de la PV. Nos résultats indiquent qu'il est présent dans 67.6% des neurones enregistrés (n=23/34 neurones TdTomato+) confirmant l'expression ectopique de la TdTomato dans des cellules non PV+. La différence entre ce pourcentage et celui issu des comptages cellulaires effectués lors des expériences d'immunohistochimie peut être due à un biais d'échantillonnage ou à la limitation inhérente à la technique de RT-PCR sur cellule unique. En effet, cette technique reste tributaire de l'efficacité limitée de la récolte du cytoplasme des cellules enregistrées entraînant une détection imparfaite des ARNm présents dans le neurone. La suite des analyses PCR n'a donc été réalisée que sur les neurones où l'ARNm de la PV a pu être positivement détecté.

Afin d'évaluer la co-expression des différentes isoformes des canaux T dans les neurones PV+, nous avons sondé la présence des transcrits de Cav3.1, Cav3.2 et Cav3.3 (Figure 31B). Nous avons constaté que 60.9% des neurones PV+ présentent le transcrite du Cav3.1 (n=14/23 neurones PV+), 56.5% le transcrite du Cav3.2 + (n=13/23 neurones PV+) et 17.4% celui du Cav3.3 (n=4/23 neurones PV+, Figure 31C, cf. Tableaux 18, 19). De plus, parmi les neurones PV-Cav3.2+, 69.2% co-expriment le transcrite du Cav3.1 (n=9/13 neurones Cav3.2+) et 23.1% co-expriment Cav3.3 (n=3/13 neurones Cav3.2+). 30.8% de neurones Cav3.2+ ne co-expriment aucune autre isoforme des canaux T (n=4/13 neurones Cav3.2+, cf. Tableaux 18, 19). En conclusion, lorsque plusieurs isoformes des canaux T sont exprimées, Cav3.2 est majoritairement co-exprimé avec Cav3.1, Cav3.3 étant peu présent.



**Figure 31 | RT-PCR multiplex sur cellule unique.**

(A) Enregistrement en mode courant imposé d'une cellule TdTomato+ de l'APN de type régulier lors de l'injection d'un courant hyperpolarisant (trace noire, -250 pA) ou dépolarisant (trace grise ; +200 pA). Echelle : 20 mV, 200 ms.

(B) Analyse sur gel d'agarose des produits de RT-PCR du neurone enregistré en A.  
: marqueur de taille de 100pb.

(C) Diagramme illustrant les proportions de neurones PV+ exprimant les transcrits de la GAD65/67 et des 3 isoformes des canaux T. Noter le recouvrement entre l'expression des 3 isoformes des canaux T, ainsi que l'expression exclusive du transcrit du Cav3.2 dans des neurones GABAergiques. La proportion de neurones extérieure au cadre indiquant l'expression de la GAD65/67 correspond au groupe de neurones glutamatergiques. Noter que seule l'isoforme Cav3.1 y a été détectée.

## RESULTATS

Afin de déterminer quel type de neurotransmetteur était présent dans ces neurones, nous avons également sondé la présence des transcrits du transporteur vésiculaire du glutamate Vglut2 et des enzymes de synthèse du GABA, GAD65 et GAD67. 73.9% des neurones PV+ expriment les transcrits des GAD65 et/ou GAD67 (n=17/23 neurones, cf Tableau 19) et 26.1% expriment le transcrit de Vglut2 (n=6/23 neurones, cf. Tableau 18). Les neurones PV de l'APN sont donc en majorité GABAergiques mais une petite sous-population est glutamatergique. Ainsi, tous les neurones présentant le transcrit du canal Cav3.2 semblent GABAergiques. Les transcrits des isoformes Cav3.1 et Cav3.3 sont exprimés aussi bien dans des cellules GABAergiques et glutamatergiques.

Cellule	Cav3.1	Cav3.2	Cav3.3	Vglut2	GAD65	GAD67
2						
7						
8						
9						
13						
18						

**Tableau 18 | Répartitions des transcrits des 3 isoformes des canaux T, sondés par scRT-PCR dans les 6 cellules TdTomato+ enregistrées où les transcrits PV et Vglut2 ont été détectés.** Les cases grisées indiquent que le transcrit a été détecté.

Cellule	Cav3.1	Cav3.2	Cav3.3	Vglut2	GAD65	GAD67
1						
3						
4						
5						
6						
10						
11						
12						
14						
15						
16						
17						
19						
20						
21						
22						
23						

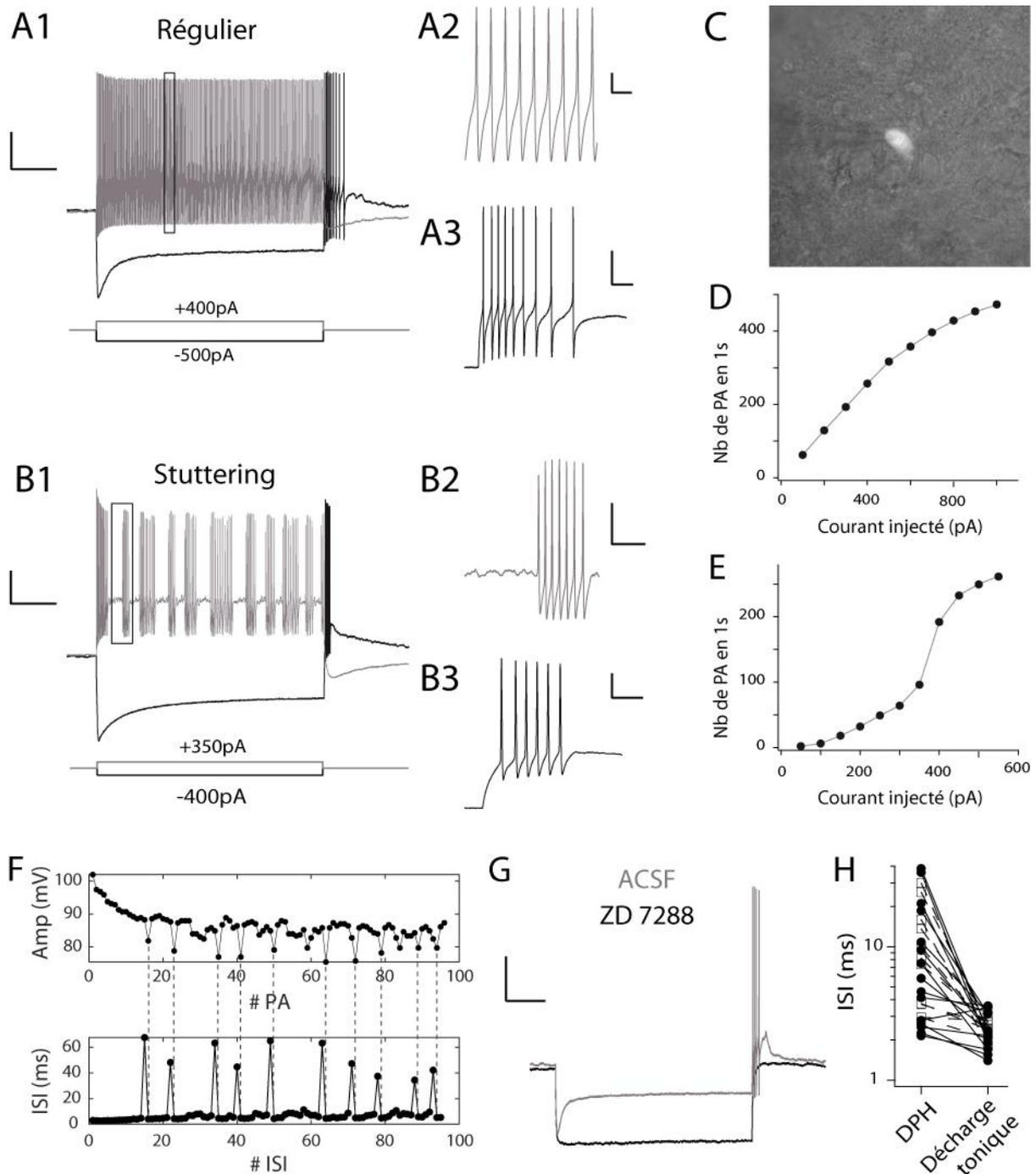
**Tableau 19 | Répartitions des transcrits des 3 isoformes des canaux T, sondés par scRT-PCR dans les 17 cellules TdTomato+ enregistrées où les transcrits PV et GAD65/67 ont été détectés.** Les cases grisées indiquent que le transcrit a été détecté.

### 4.3. Caractérisation électrophysiologique *in vitro* des neurones PV+ de l $\alpha$ APN

Dans le cadre de la caractérisation des neurones Cav3.2-GFP+ de l $\alpha$ APN, nous avons réalisé des enregistrements électrophysiologiques *in vitro* des neurones TdTomato+ de souris PV-Cre x Ai14 par *patch-clamp* dans la configuration cellule entière en mode courant imposé (n=11 mâles ; n=9 femelles ; n=40 neurones ; Figure 32C).

Deux populations principales de neurones identifiables par leur patron de décharge lors de l'injection de créneaux de courants dépolarisants (Figure 32A, B) sont clairement apparues. La majorité des neurones enregistrés émettent des potentiels d'action (PA) de manière régulière continue et le nombre de PA augmente progressivement avec l'intensité du courant injecté (Figure 32A1, A2, D) ; ces neurones sont donc dits *réguliers* (n=21/40). Cependant un peu moins d'un tiers des neurones présentent un comportement plus complexe (n=12/40). Pour une certaine gamme de courants injectés, ils déchargent en effet de manière régulière mais intermittente (Figure 32B1, B2). Lorsque l'intensité du courant injecté est augmentée la plupart de ces neurones adoptent également un mode de décharge régulier continu (n=9/12). Ce phénomène se traduit par une courbe « entrée-sortie » sigmoïde (Figure 32E). Pour les 3 neurones restant un blocage de l'émission des PA probablement dû à l'inactivation des canaux sodiques a été observé lors de l'injection de forts courants dépolarisants, sans apparition d'une décharge tonique régulière. En référence aux neurones présentant un mode de décharge similaire décrit dans d'autres structures, les neurones caractérisés par une décharge intermittente ont été appelés *stutterings* (Ascoli et al., 2008). Enfin, quelques neurones (n=7/40) présente un mode de décharge hétérogène (bistable ou oscillant) difficilement classable, (données non montrées). Lors de l'injection de créneaux de courants dépolarisants, l'émission des PA par les neurones *réguliers* et *stutterings* peut monter à de très hautes fréquences instantanées (cf Tableau 20). Malgré une tendance à atteindre de plus hautes fréquences pour les neurones *réguliers*, il n'y a pas de différence significative selon le patron de décharge.

## RESULTATS



**Figure 32 | Propriétés électrophysiologiques des neurones PV+ de loAPNin vitro.**

(A, B) Enregistrements en mode courant imposé du potentiel de membrane d'un neurone TdTomato+ de type *régulier* (A1) ou *stuttering* (B2) lors de l'injection d'un créneau de courant hyperpolarisant (noir) ou dépolarisant (gris). Les PA des neurones présentés en A1 et B1 (délimités par un rectangle noir) sont représentés à une plus grande échelle en A2 et B2. Les décharges post-hyperpolarisation (DPH) sont également représentées à plus grande échelle pour le neurone *régulier* (A3) et *stuttering* (B3).

Potentiels de départ :  $V_m = -58$  mV en A1 ;  $-60$  mV en B1.

Echelles A1, B1, B2 : 20mV, 20ms / A2 : 10mV, 5ms / A3 : 20mV, 20ms / B3 : 20mV, 10ms.

## RESULTATS

---

(C) Photo d'un neurone fluorescent TdTomato+ enregistré en configuration cellule entière dans l'APN.

(D, E) Courbe « entrée-sortie » du neurone *régulier* présenté en A (D) ou *stuttering* présenté en B (E) représentant le nombre de PA émis lors de l'injection de créneaux de courant d'intensités croissantes pendant une seconde.

(F) Amplitude des PA (en haut) et durée des intervalles inter-spikes (ISI, en bas) au cours de la décharge intermittente du neurone représentée en B. Noter que les PA de plus faibles amplitudes arrivent systématiquement après un ISI de longue durée, comme indiqué par la ligne pointillée.

(G) Enregistrement en mode courant imposé du potentiel de membrane d'un neurone TdTomato+ lors de l'injection d'un créneau de courant hyperpolarisant (-400pA), avant (gris) et après 12 minutes d'application de ZD 7288 (noir).

Echelle : 20 mV, 20 ms. Potentiels de départ :  $V_m = -60$  mV

(H) Diagramme en chevron des ISI minimaux enregistrés lors de la DPH et lors de la décharge tonique pour chaque neurone *régulier* ( , trait plein, n=15) et *stuttering* ( , tirets, n=11).

Nous avons également caractérisé l'adaptation de la fréquence et de l'amplitude des PA chez les neurones *réguliers* (n=20/21) et chez les neurones *stutterings* capables de décharger de manière régulière tonique (n=9/12) lors de l'injection la plus intense de courant. Une proportion des neurones *réguliers* (n=13/20) montrent une légère accélération de la fréquence des PA visible dans les 9 premiers intervalles inter-spikes (ISI) (rapport entre le premier ISI et l'ISI minimal  $>1$  ; moyenne :  $1.28 \pm 0.07$ ). Les autres neurones *réguliers* ne montrent pas d'accélération de décharge (n=7/20). Tous les neurones *stutterings* analysés montrent une accélération de décharge dans les 4 premiers ISI (cf. Tableau 20) qui ne diffère pas significativement du rapport moyen observé chez les neurones *réguliers* présentant une accélération de décharge (p=0.45). Chez les neurones *réguliers* comme *stutterings* on observe par la suite une diminution de la fréquence des PA (rapport moyen entre le 100<sup>ème</sup> ISI et l'ISI minimal :  $1.53 \pm 0.09$  et  $1.57 \pm 0.14$ , *régulier* et *stuttering* respectivement). Au cours de la décharge on observe également une très légère diminution de l'amplitude des PA (de l'ordre de 10% sur 100 PA) pour les 2 types de neurones (cf Tableau 20).

Nous avons par la suite analysé plus particulièrement le mode de décharge intermittent des neurones *stutterings* (n=12). De façon particulièrement caractéristique, on observe une augmentation rapide de l'amplitude des PA au début de chaque salve d'activité. De même, l'amplitude du premier PA de la salve est systématiquement inférieure à l'amplitude du dernier PA de la salve (cf. Tableau 21 et Figure 32B2 et F). Par ailleurs, le 1<sup>er</sup> ISI de chaque salve est toujours inférieur au dernier ISI de la salve précédent (n=19 ; cf. Tableau 21).

## RESULTATS

Chaque salve reprend donc avec une fréquence de décharge supérieure ou égale à la fin de la salve précédente. Bien que non quantifié, on observe également dans de très nombreux cas que la période de silence séparant les salves montre des oscillations à hautes fréquences du potentiel de membrane. Ces caractéristiques montrent donc une interruption brutale suivie d'une reprise rapide de la décharge à haute fréquence avec une augmentation de l'amplitude du PA suggérant un recrutement progressif mais rapide des canaux sodiques.

Nous avons également caractérisé la réponse des neurones PV+ à l'injection de courants hyperpolarisants. Lors de l'injection de créneaux hyperpolarisants, tous les neurones enregistrés montrent une hyperpolarisation maximale suivie d'une dépolarisation lente, appelée *sag* (Figure 32A1, B1). Cette signature électrophysiologique est caractéristique de l'activation du courant cationique HCN (*Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-gated channels*). L'application de l'antagoniste spécifique des courants HCN, le ZD 7288, sur quelques neurones a confirmé la nature de ce courant en supprimant le développement du *sag* (Figure 32G). L'importance de la composante HCN a été estimée en calculant l'amplitude du *sag* mesurée comme la différence entre le potentiel de membrane minimal en début d'hyperpolarisation et le potentiel atteint à la fin de l'injection du courant hyperpolarisant (cf. Tableau 20). Afin de pouvoir comparer l'amplitude du *sag* entre les différents neurones, nous avons choisi de calculer celle-ci en sélectionnant pour chaque neurone le créneau de courant pour lequel l'hyperpolarisation maximale du potentiel de membrane atteint  $-100 \pm 5$  mV. L'amplitude du *sag*, de l'ordre de 15mV, indique la présence d'un fort courant HCN et ne diffère pas significativement entre les neurones *réguliers* et *stutterings*.

Paramètre	Réguliers	Stutterings	Valeur p
Fréquence instantanée maximale (Hz)	450.64 ± 29.70	407.19 ± 17.02	0.11
Adaptation précoce : $ISI_{\#1} / ISI_{\text{minimal}}$	1.18 ± 0.05	1.34 ± 0.10	0.06
Adaptation tardive : $ISI_{\#100} / ISI_{\text{minimal}}$	1.53 ± 0.09	1.57 ± 0.14	0.35
Adaptation d'amplitude sur 100 PA (%)	10.40 ± 2.09	13.56 ± 2.91	0.14
Amplitude du <i>sag</i> (mV)	15.85 ± 1.47	17.18 ± 1.95	0.39
Résistance membranaire estimée (M $\Omega$ )	255 ± 31	205 ± 39	0.11
Nb PA pendant la DPH	5.90 ± 0.95	6.45 ± 1.06	0.37
$ISI_{\text{minimal}}$ pendant la DPH (ms)	12.35 ± 3.11	11.28 ± 2.80	0.35

**Tableau 20 | Comparaison des paramètres moyens décrivant les propriétés électrophysiologiques des neurones TdTomato+ réguliers et *stutterings* enregistrés dans l'APN de souris PVcre-Ai14.** Valeurs p calculées avec le test de WMW sur données non paires = 0.05.

## RESULTATS

---

Il est à noter que l'existence d'un *sag* important et la nécessité de maintenir les neurones PV+ à un potentiel relativement hyperpolarisé (potentiel de maintien : -60mV) afin d'éviter l'activité spontanée entre les créneaux de courant, ont rendu impossible l'estimation des propriétés purement passives des neurones. Leurs résistances membranaires ont donc été estimées en injectant des créneaux de courants hyperpolarisants d'intensité telle que le *sag* résiduel soit inférieur à 5mV. Les valeurs de résistances ainsi calculées (de l'ordre de 200M $\Omega$ ) ne diffèrent pas significativement entre les neurones *réguliers* et *stutterings* (cf. Tableau 20).

Parmi les neurones enregistrés, la grande majorité présentait une activité de décharge post-hyperpolarisation (DPH, n=34/40). Elle se caractérise par l'émission transitoire de PA à la repolarisation (Figure 32A3, B3). La DPH est très variable en terme de nombre de PA émis (1 à 21 PA ; n=34 neurones) et de fréquence de décharge (26 à 465 Hz ; n=33 neurones). Il n'y a pas de différence significative dans le nombre et la fréquence des PA émis lors de la DPH entre les neurones *réguliers* et *stutterings*. On remarque que pour chacun des neurones enregistrés, la fréquence de DPH maximale reste inférieure à la fréquence de décharge tonique maximale (Figure 32). Par conséquent la décharge tonique lors de la dépolarisation transitoire accompagnant la fermeture des canaux HCN peut complètement expliquer la DPH et nous ne pouvons pas à ce stade suggérer l'activation d'une autre conductance suite à l'hyperpolarisation, telle que le courant T, qui ferait basculer le neurone dans un autre mode de décharge.

Enfin, nous avons réalisé des enregistrements continus à un potentiel membranaire légèrement supraliminaire permettant l'émission spontanée de PA à basse fréquence. Ces enregistrements nous ont permis d'analyser les caractéristiques des PA et des potentiels post-hyperpolarisation (AHP). On remarque, en accord avec la haute fréquence de décharge observée dans ces neurones, que la durée du PA quantifiée par la *half-width* est faible (n=12, cf. Tableau 22). Par ailleurs les AHP présentent une composante rapide (constante de temps d'environ 0.5ms) et une composante beaucoup plus lente (constante de temps environ 40ms ; n=9, cf. Tableau 22).

Paramètre	Valeurs
Amplitude $PA_{\#1} / PA_{\text{maximal}}$ (%)	$88.33 \pm 2.35$
Amplitude $PA_{\#1} / PA_{\#-1}$ (%)	$91.75 \pm 1.70$
$ISI_{\#1} / ISI_{\#-1}$	$72.86 \pm 5.28$

**Tableau 21 | Adaptation de l'amplitude des PA et de la fréquence des ISI lors des salves de décharge intermittente des neurones TdTomato+ *stutterings* enregistrés dans l'APN.**

Amplitude  $PA_{\#1} / PA_{\text{maximal}}$  : moyenne du rapport d'amplitude entre le 1<sup>er</sup> PA et le plus grand PA d'une salve.

Amplitude  $PA_{\#1} / PA_{\#-1}$  : moyenne du rapport d'amplitude entre le 1<sup>er</sup> PA d'une salve et le dernier PA de la salve précédente.

Paramètre du potentiel d'action	Valeurs
Seuil de déclenchement des PA (mV)	$-43 \pm 2$
Half-width (ms)	$0.27 \pm 0.02$
Constante de temps de l'APH rapide (ms)	$0.56 \pm 0.17$
Constante de temps de l'APH lente (ms)	$43.21 \pm 11.13$

**Tableau 22 | Paramètres décrivant l'émission des PA des neurones TdTomato+ *réguliers* et *stutterings* enregistrés dans l'APN.**

En conclusion, deux classes de neurones ont été identifiées, toutes deux caractérisées par une capacité à monter à de très hautes fréquences de décharge lors de l'injection d'un courant dépolarisant, un fort *sag* lors de l'injection de courant hyperpolarisant, suivie d'une décharge post-hyperpolarisation variable vraisemblablement due à la fermeture des canaux HCN.

## 5. Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons démontré que le canal Cav3.2-GFP est exprimé dans 20% des neurones de l'APN des souris KI-Cav3.2-eGFPflox et qu'il est fortement co-exprimé avec la PV, à hauteur d'environ 90%. Nous avons également montré que la délétion du canal Cav3.2 de l'APN n'impacte pas la perception somatosensorielle basale mais qu'elle a un effet anti-allodynie mécanique clair. Un effet anti-hyperalgie thermique à la chaleur a été observé mais avec un dimorphisme sexuel en faveur des mâles. L'étude des neurones PV+ de l'APN nous a permis de commencer à appréhender le mécanisme sous-jacent aux effets de cette délétion sur la douleur neuropathique. Nous avons ainsi montré que les neurones PV+ de l'APN ne sont pas des interneurons puisqu'ils présentent des projections ascendantes, notamment vers certains noyaux thalamiques (PO, LD) et vers la ZI, ainsi que des projections descendantes (DpMe, Pons, PPTg, LPGi). Ces neurones PV+ présentent également des profils moléculaires et électrophysiologiques hétérogènes. En effet, environ 75% seraient GABAergiques, tandis que les 25% restants seraient glutamatergiques. Le canal Cav3.2 semble être exclusivement présent dans les neurones GABAergiques, souvent co-exprimé avec l'isoforme Cav3.1 et plus rarement avec Cav3.3. Enfin, ces neurones PV présentent des patrons de décharge hétérogènes, *régulier* ou *stuttering*. Une étude plus approfondie est nécessaire pour déterminer si ces différents profils électrophysiologiques sont liés ou non à l'expression du canal Cav3.2 et quel rôle tient ce dernier dans l'atténuation de la douleur neuropathique observée lors de sa délétion.



# DISCUSSION



### 1. Localisation du canal Cav3.2 dans le cerveau

#### 1.1. Expression de Cav3.2 dans l'APN

Des travaux récents ont montré que les canaux calciques Cav3.2 ont un rôle essentiel dans la perception douloureuse aiguë et neuropathique, notamment ceux exprimés aux niveaux périphérique et spinal (Candelas et al., 2019; Francois et al., 2013; François et al., 2015; Kerckhove et al., 2014; Shen et al., 2015). Cependant, aucune étude n'avait investigué spécifiquement au niveau supra-spinal leur localisation et leur impact sur la perception douloureuse.

Dans cette optique, nous avons cartographié l'expression du canal Cav3.2 dans le cerveau par marquage immunohistochimiques anti-GFP chez des souris KI-Cav3.2-eGFP<sup>flox</sup>. Ce modèle murin a été développé et validé par nos collaborateurs dans l'équipe d'Emmanuel Bourinet (Equipe Dynamique Cellulaire des Canaux Calciques et Nociception, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier). Il leur a permis de montrer que le canal Cav3.2-GFP est exprimé dans les fibres sensorielles primaires C-LTMR et A<sub>δ</sub>-LTMR au niveau périphérique, ainsi que dans une population hétérogène de neurones spinaux de la couche II (Candelas et al., 2019; François et al., 2015). Au niveau supra-spinal, nous avons montré que le canal Cav3.2 est exprimé de façon discrète dans plusieurs structures, dans la «*pain matrix*» principalement : S1, S2, ACC, insula, amygdale et dans le thalamus au niveau du nRT. Le canal Cav3.2 est donc exprimé tout le long des voies de la nociception. Nous avons également remarqué un marquage important dans l'APN. Le rôle de ce noyau diencephalique dans la perception douloureuse a été établi dès les années 80, avec la mise en évidence d'effets analgésiques de sa stimulation électrique ou chimique en douleur aiguë (Rees and Roberts, 1993). De rares études suggèrent qu'il serait également impliqué dans la douleur persistante ainsi que dans la douleur neuropathique, particulièrement dans les mécanismes d'initiation de celle-ci, les études récentes ayant été réalisées essentiellement chez le rat (Murray et al., 2010; Rossaneis and Prado, 2015; Rossaneis et al., 2015; Villarreal et al., 2003, 2004a). Cependant cette structure n'est pas reconnue comme faisant partie de la «*pain matrix*». Ceci nous a donc conduits à choisir d'étudier plus précisément l'expression du canal Cav3.2 dans cette structure et son rôle dans la perception somatosensorielle basale et neuropathique.

## DISCUSSION

---

### 1.1.1. Données immunohistochimiques

Nos résultats immunohistochimiques montrent que le canal Cav3.2 est exprimé dans 20% des neurones de l'APN dont 87% co-expriment la PV. La localisation des ARNm codant pour les trois isoformes des canaux T par hybridation *in situ* réalisée chez le rat est cohérente avec ce résultat puisque elle avait montré l'expression des trois transcrits dans le noyau prétektal, en particulier du Cav3.2, dans des cellules dispersées dans l'APN (Talley et al., 1999). Il est à noter que nos résultats d'immunohistochimie permettent d'identifier les neurones exprimant le Cav3.2-GFP, mais pas d'étudier sa localisation subcellulaire. En effet, bien que la GFP soit présente en extracellulaire, la perméabilisation des membranes est nécessaire pour visualiser un marquage correctement (données non montrées), de sorte que ce dernier peut également correspondre à des canaux présents en intracellulaire.

La caractérisation plus précise de ces neurones nécessitait de pouvoir les identifier dans des tissus vivants. Malheureusement le tag GFP des souris KI-Cav3.2-eGFP<sup>flox</sup> n'est pas visible par immunofluorescence en absence d'anticorps anti-GFP. Au niveau spinal, nos collaborateurs ont utilisé un AAV-DJ exprimant la Cre et/ou la mCherry sous le contrôle du promoteur du Cav3.2, afin de cibler spécifiquement ces neurones (François et al., 2015). L'utilisation de ce virus dans l'APN s'est révélée inefficace. Pour contourner cet obstacle, nous avons donc tiré profit du fait que 92% des neurones PV de l'APN co-expriment le canal Cav3.2 et utilisé la lignée de souris PV-Cre. Afin de valider cette approche, nous avons réalisé des croisements entre la lignée KI et la lignée PV-Cre. Des co-marquages anti-GFP anti-PV chez des souris issues de ce croisement, hétérozygotes pour ces deux locus, ont été effectués pour déterminer dans quelle proportion le marquage GFP disparaît de l'APN (Annexe 2). Nos résultats indiquent cependant qu'une proportion non négligeable de neurones PV<sup>+</sup> co-exprime encore le Cav3.2-GFP et correspond donc à une sous-population de cellule PV<sup>+</sup> n'exprimant pas la Cre. L'utilisation des souris PV-Cre ne nous permet donc a priori que de caractériser une sous population représentant environ 50% des neurones PV<sup>+</sup> de l'APN. De plus, d'après les comptages effectués sur les souris issues du croisement PV-Cre-Ai14, une expression ectopique de la Cre, en dehors des neurones PV est également à prendre en considération et représente 19% des neurones TdTomato<sup>+</sup>. Malgré ces limitations, la caractérisation des neurones PV-Cre de l'APN est la seule méthode à l'heure actuelle permettant de définir plus avant les propriétés anatomo-fonctionnelles de neurones APN exprimant le canal Cav3.2.

## DISCUSSION

---

### *1.1.2. Données de RT-PCR multiplex sur cellule unique*

Les résultats de RT-PCR multiplex sur cellule unique (scRT-PCR) réalisés chez les souris PV-Cre-Ai14 montrent que 56.5% des neurones PV-TdTomato+ expriment le transcrite du Cav3.2. Ce résultat est bien inférieur aux 92% de neurones PV+ co-exprimant le canal Cav3.2-GFP observés par immunohistochimie. Cette différence peut s'expliquer par plusieurs facteurs, probablement de manière conjointe : l'existence de la sous-population de neurones PV+ ne co-exprimant pas le canal Cav3.2 ; l'expression ectopique de la Cre dans des neurones non PV+ ; l'expression de la Cre dans seulement 50% de la population PV+, qui pourrait par ailleurs être biaisée en faveur des neurones PV- exprimant la Cre ; enfin, surtout l'efficacité limitée de la technique de scRT-PCR (récolte du cytoplasme, détection des ARNm, cf. Résultats ó 4.2).

Nous avons constaté par ailleurs que les transcrits des trois isoformes peuvent être co-exprimés dans l'APN. La localisation des transcrits des canaux T avait montré que les 3 isoformes étaient exprimées dans l'APN mais aucune étude n'avait mis en évidence leur co-expression dans les mêmes neurones (Talley et al., 1999). Par ailleurs, la forte co-expression entre Cav3.1 et Cav3.2 dénote du reste du cerveau où l'expression de ces isoformes se recouvre rarement, à l'exception des cellules de Purkinje du cervelet (Aguado et al., 2016).

Enfin, les résultats de scRT-PCR montrent que la population de neurones PV+ de l'APN est hétérogène puisqu'on distingue une sous-population GABAergique pouvant exprimer le canal Cav3.2, et une sous-population glutamatergique. Cette observation est cohérente avec le fait que l'APN serait capable d'envoyer des entrées excitatrices dans la VLM et vers les neurones des couches superficielles de la moëlle épinière (Terenzi et al., 1991). Le faible pourcentage de neurones PV+ ne co-exprimant pas le Cav3.2 selon nos résultats immunohistochimiques pourrait correspondre à des neurones glutamatergiques.

### 1.2. Expression de Cav3.2 dans le thalamus et le cortex

Dans nos coupes immunohistochimiques, nous avons également observé l'expression du canal Cav3.2-GFP au niveau du nRT et du cortex. Le nRT est en effet un noyau GABAergique exerçant un contrôle inhibiteur sur les noyaux thalamiques et modulant leur interaction avec les aires corticales (Crick, 1984; Halassa and Acsády, 2016; Wimmer et al., 2015). Il contrôlerait ainsi le passage des informations sensorielles vers le cortex qui génère la perception consciente des stimuli. Dans le nRT, nous avons concentré nos observations sur la région médiane, projetant vers les noyaux somatosensoriels VPM et PO du thalamus (Guillery et al., 1998; Pinault and Deschênes, 1998). L'expression de la PV dans cette région du nRT est bien connue (Clemente-perez et al., 2017). Nous avons en effet constaté que la grande majorité de ces neurones expriment la PV, avec un fort taux de co-expression du canal Cav3.2-GFP (Annexe 1, Tableau, Figure A, B,). Ce résultat est aussi cohérent avec les études de hybridation *in situ* montrant l'expression des transcrits des canaux Cav3.2 et Cav3.3 dans le nRT (Talley et al., 1999). Ces deux populations de neurones prépondérantes dans cette région du nRT présentent de fait un fort taux de recouvrement (Annexe 1, Tableau A). Seulement  $4.62 \pm 3.60$  % de neurones Cav3.2-GFP+ ne co-expriment pas la PV. Le pourcentage négligeable pourrait être lié à une erreur de détection du marquage immunohistochimique, et l'on pourrait considérer que ces deux populations se recouvrent parfaitement. Il est d'ailleurs intéressant de noter que chez les souris issues du croisement entre la lignée KI et la lignée PV-Cre, l'expression du canal Cav3.2-GFP est totalement abolie dans le nRT suggérant que 100% des neurones PV du nRT exprime la Cre dans ce modèle contrairement à l'APN (Annexe 3).

Au niveau cortical, dans la bande GFP+ située dans la couche V, une sous-population de neurones pyramidaux semble exprimer le canal Cav3.2-GFP. (Annexe 1, Figure A, C). La co-expression avec la PV, caractérisant des interneurons inhibiteurs, est négligeable et pourrait correspondre à des faux-positifs ou à des neurones excitateurs de la couche VI capables d'exprimer également la PV. En effet, les neurones co-exprimant Cav3.2-GFP et la PV étaient souvent observés à l'interface entre la bande GFP+ et la couche inférieure et ne présentaient pas une morphologie pyramidale.

Ainsi, contrairement à l'APN et au nRT où le canal Cav3.2-GFP est en grande majorité co-exprimé avec la PV, très peu de neurones de la bande GFP+ du cortex co-expriment Cav3.2-GFP et la PV. L'hybridation *in situ* avait révélé que, si les isoformes Cav3.1 et Cav3.3 des

## DISCUSSION

---

canaux T sont uniformément réparties dans toutes les couches corticales, avec une expression plus dense dans la couche IV, la distribution du Cav3.2 est à l'inverse beaucoup plus précise. En effet, les auteurs ont rapporté un marquage important dans une sous région profonde de la couche V, dans les neurones pyramidaux et en faible quantité dans la couche II, ce qui corrobore nos observations (Talley et al., 1999).

Des injections virales de la Cre dans ces structures chez des souris KI pourraient permettre d'étudier le rôle du canal Cav3.2 dans l'excitabilité des neurones réticulaires et corticaux, et l'impact sur la transmission et l'intégration de l'information sensorielle. En effet, les neurones du nRT co-expriment les isoformes Cav3.2 et Cav3.3 des canaux T (Talley et al., 1999). Si la cinétique lente du Cav3.3 explique la décharge en rebond de ces neurones, participant aux oscillations *pacemaker*, on ignore encore le rôle du canal Cav3.2 dans ces neurones (Pellegrini et al., 2016; Tschertter et al., 2011). Le KO constitutif du Cav3.2 montre au niveau thalamique une diminution du nombre de neurones répondants à des stimuli nociceptifs dans le nRT et le VP avec une modification du profil de décharge, témoignant d'une implication du nRT dans la nociception (Liao et al., 2011). Par ailleurs, l'augmentation de la décharge en bouffée dans les noyaux relais du thalamus observée lors de douleurs neuropathiques ne correspondrait pas à une hyperactivité de ces noyaux mais à une augmentation d'inhibition, permettant l'hyperpolarisation des neurones thalamiques et favorisant la dé-inactivation des canaux T soutenant cette décharge en bouffée (Garcia-Larrea and Peyron, 2013; Lenz et al., 1989; Llinás et al., 1999). Cette inhibition pourrait provenir du nRT, de l'APN ou de la ZI. Il serait intéressant de déterminer dans quelle mesure l'activité du nRT et de la couche V du cortex est altérée dans les états neuropathiques, l'impact sur l'activité thalamocorticale et le rôle du canal Cav3.2 dans ce contexte. Par ailleurs, un virus AAV-DJ exprimant la Cre et la mCherry sous le contrôle du promoteur du canal Cav3.2, mis au point par nos collaborateurs aux niveaux périphérique et spinal, s'est montré efficace dans le cortex uniquement (Candelas et al., 2019; François et al., 2015). Cette approche permettrait de cibler facilement les neurones corticaux Cav3.2+ pour étudier l'impact de ce canal sur l'intégration des informations sensorielles en provenance du thalamus dans les couches superficielles et profondes.

### 2. Caractérisation des neurones PV+ de l $\alpha$ APN

Dans le but de caractériser les neurones PV+ de l $\alpha$ APN co-exprimant majoritairement le canal Cav3.2, nous avons réalisé des marquages antérogrades et rétrogrades des neurones PV+ de l $\alpha$ APN par injection de l $\alpha$ AAV1-TdTomato-flex dans l $\alpha$ APN de souris PV-Cre ou de RedRetrobeads, respectivement, dans des structures cibles chez des souris KI. Les résultats obtenus confirment certaines données de la littérature sur la connectivité anatomique et fonctionnelle récoltées chez le chat (Berman, 1977; Itoh, 1977), la musaraigne (Weber and Harting, 1980), le rat (Bokor et al., 2005; Cadusseau and Roger, 1991; Terenzi et al., 1995; Zagon et al., 1995), et sont observées pour la première fois chez la souris.

#### 2.1. Projections anatomiques

##### 2.1.1. Projections descendantes

Plusieurs études préliminaires sur les effets analgésiques de la stimulation de l $\alpha$ APN avaient montré que celle-ci repose sur une excitation des neurones spinaux des couches superficielles et une inhibition des neurones spinaux à champs récepteurs multiples des couches profondes (Rees and Roberts, 1989; Rees et al., 1995). Des études plus récentes ont démontré que cette projection serait indirecte, reposant sur une signalisation opioïde et sérotoninergique (Prado and Faganello, 2000; Rees and Roberts, 1987; Rees et al., 1995). Nous avons observé des projections descendantes vers le LPGi ipsilatéral ainsi que le PPTg et le DpMe contralatéraux. Ces résultats ne démontrent pas qu'une connexion existe avec ces structures mais corroborent parfaitement les études selon lesquelles la lésion de ces noyaux atténue l'effet antinociceptif de la stimulation électrique ou chimique de l $\alpha$ APN (Genaro and Prado, 2016; Genaro et al., 2019; Zagon et al., 1995). Ces résultats sont cohérents avec le postula selon lequel l $\alpha$ APN projetterait indirectement sur des cibles spinales en impliquant les signalisations opioïde et sérotoninergique et suggérant que l $\alpha$ APN secrèterait ces neuromodulateurs (Prado and Faganello, 2000; Rees and Roberts, 1987; Rees et al., 1995).

### 2.1.2. Projections ascendantes

Nos expériences de traçage antérograde et rétrograde montrent, pour la première fois chez la souris, que l'APN est connecté au niveau supra-spinal avec le thalamus, notamment le LD, le LP et le PO, ainsi qu'avec la ZI. Ces deux dernières sont les cibles les mieux décrites de l'APN chez le rat (Bokor et al., 2005; Giber et al., 2008). Leurs marquages rétrogrades montrent que les neurones de projection de l'APN sont entremêlés dans tout le noyau. En ce qui nous concerne, nos marquages sont essentiellement localisés dans la région ventro-latérale de l'APN, mais une seule série de coordonnées a été utilisée et des injections localisées dans d'autres régions du PO et de la ZI pourraient marquer rétrogradement d'autres régions de l'APN et mettre en évidence une topographie, bien que celle-ci ait été décrite comme peu marquée chez le rat (Giber et al., 2008). Toutefois, l'APN dorso-rostrale innoverait la région latérale, visuelle de la ZI, tandis que la région ventro-caudale innoverait la région médio-centrale, somatosensorielle de la ZI (Giber et al., 2008). Nos injections rétrogrades situées préférentiellement dans la région médiane de la ZI montrant un marquage ventro-latéral dans l'APN sont cohérents avec ces observations. L'analyse des terminaisons de l'APN dans la ZI par microscopie électronique montre qu'elles sont à 60.5% GABA<sup>-</sup> et à 38.2% GABA<sup>+</sup> (Giber et al., 2008). Ce résultat ne donne aucune indication sur la proportion de neurones GABA<sup>-</sup> ou GABA<sup>+</sup> de l'APN projetant vers la ZI, mais indiquent que cette projection pourrait être majoritairement excitatrice. Des enregistrements électrophysiologiques sont nécessaires pour déterminer la balance excitation-inhibition de cette connexion ainsi que l'effet net sur l'excitabilité des neurones de la ZI. Par ailleurs, la région de la ZI ventrale innervée par l'APN correspondrait à celle projetant vers le thalamus (Lavalée et al., 2005; Trageser et al., 2006). L'impact de l'activité de l'APN sur la ZI pourrait donc indirectement affecter l'excitabilité du PO.

La projection directe de l'APN vers le PO serait à 82% GABAergique, suggérant qu'elle serait majoritairement inhibitrice (Bokor et al., 2005). Ces terminaisons GABAergiques ont été décrites comme regroupées le long d'un seul dendrite, établissant plusieurs contacts chacune. Cette voie APT-thalamus directe et focale, serait donc stratégiquement positionnée pour exercer une forte action inhibitrice sur les neurones relais des noyaux thalamiques d'ordre supérieur. En effet, les enregistrements *in vitro* de neurones du PO lors de stimulations électriques de l'APN montrent que celle-ci évoque un courant inhibiteur GABA<sub>A</sub> qui semble monosynaptique aux vues de la distribution unimodale des latences de ces réponses (2.9ms) et de l'amplitude tout ou rien de ces CPSI. Cette synapse montre une faible

*paired pulse depression*, favorable à l'inhibition à haute fréquence des neurones thalamiques. Les IPSP résultant de cette stimulation sont capables d'induire une dépolarisation en rebond, parfois associée à une bouffée de PA, et d'atténuer voir d'inhiber la fréquence de décharge des neurones thalamiques (Bokor et al., 2005). Cette inhibition extra-réticulaire diffère morphologiquement et fonctionnellement de l'inhibition thalamique exercée par le nRT (Wanaverbecq et al., 2008). De plus, les terminaisons de l'APN ciblent spécifiquement les noyaux thalamiques d'ordre supérieur et forment des synapses multiples sur les dendrites proximaux, capables de soutenir une transmission inhibitrice soutenue lors de taux de décharges présynaptique à haute fréquence, jusqu'à 100Hz (Bokor et al., 2005; Wanaverbecq et al., 2008). Ce dernier point est fonctionnellement très important si on considère que nos enregistrements électrophysiologiques *in vitro* ont montré que les neurones de l'APN avaient des propriétés intrinsèques capables de soutenir une décharge à haute fréquence, allant jusqu'à 450 Hz. Par ailleurs les enregistrements *in vivo* de ces neurones réalisés actuellement au laboratoire corroborent ce résultat en montrant que ces neurones peuvent atteindre des fréquences de décharge de 300Hz chez l'animal anesthésié.

### 2.2. Caractérisation électrophysiologique

#### 2.2.1. *In vitro*

Les enregistrements *in vitro* des neurones PV+ de l'APN de souris PV-Cre-Ai14 ont montré qu'ils sont tous caractérisés par une dépolarisation lente due aux canaux HCN lors de l'injection d'un créneau de courant hyperpolarisant, et une DPH variable. Cependant, deux groupes de neurones se distinguent par leur profil de décharge tonique en réponse à l'injection d'un créneau de courant dépolarisant. En effet, certains neurones émettent des PA de manière régulière, tandis que d'autres sont capables de montrer un profil de décharge intermittent.

Le profil de décharge *régulier* observé se apparente à celui des neurones *fast-spiking* décrits dans certains interneurons locaux du néocortex. En effet, les neurones *fast-spiking*, majoritairement inhibiteurs dans le cortex, répondent à une injection de courant dépolarisant par une décharge tonique de PA courts (<1ms) émis à haute fréquence (jusqu'à 400 Hz) sans adaptation (Steriade 2004). Beaucoup d'interneurones *fast-spiking* du cortex sont par ailleurs GABAergiques et PV+.

## DISCUSSION

---

Le profil de décharge *stuttering* a été décrit dans la terminologie Petilla, détaillant les modes de décharge des interneurons corticaux. Il est défini par la présence de groupes de PA émis à haute fréquence, séparés par des périodes de silence imprédictibles, sur une large gamme d'injection prolongée de courant. Des injections de courants plus intenses produisent une décharge continue de type *fast-spiking*, comme ce que nous avons observé dans la grande majorité des neurones *stuttering* de l'APN (Ascoli et al., 2008; Markram et al., 2004). Selon ces études, ce mode de décharge s'apparenterait au mode *Fast Rhythmic Bursting* (FRB) décrit dans les interneurons de type *basket cells* néocorticales (Steriade, 2004). Une transition d'une décharge *stuttering* à la rhéobase vers une décharge *fast-spiking* lors de stimulations plus intenses a été rapportée dans des interneurons PV+ des couches II/III dans le cortex visuel (Akgul and Wollmuth, 2013; Helm et al., 2012), dans une sous-population d'interneurons corticaux SOM+ de la couche IV (Ma et al., 2006), dans les cornes d'Ammon de l'hippocampe (Maniezzi et al., 2019), dans le présubiculum (Abbasi and Kumar, 2013), dans le bulbe olfactif (Burton and Urban, 2014), dans des neurones striataux (Klaus et al., 2011; Sciamanna and Wilson, 2011) et dans certains neurones GABAergiques PV+ de l'amygdale latérale (Song et al., 2013; Sosulina et al., 2010),

Dans ces études, ces neurones sont généralement moins excitables que les autres neurones des mêmes noyaux, avec une résistance membranaire plus faible et un seuil de déclenchement des PA supérieurs, et présentent des PA plus larges, des AHP moins grands et peuvent décharger à plus haute fréquence que les neurones « réguliers » (Akgul and Wollmuth, 2013; Helm et al., 2012). Dans l'APN, les résistances membranaires et les fréquences de décharge que nous avons observées ne diffèrent pas entre les populations PV+ *régulière* et *stuttering*. Etant observé que la grande majorité des neurones *stuttering* que nous avons enregistré est capable de décharger de manière *régulière*, il est en définitive possible qu'il s'agisse d'un même type de neurones et que la décharge *stuttering* ne soit visible que dans certaines conditions. C'est d'ailleurs une hypothèse qui pourrait expliquer que la décharge *stuttering* existant dans les interneurons PV corticaux n'ait été caractérisée que tardivement. Il est également possible que, de la même manière que dans le cortex visuel, deux types de *stutterings* existent, dont l'un se révèle à des potentiels plus proches de la rhéobase, le rendant difficile à déceler avec les créneaux de courant appliqués et aux vues des fortes résistances membranaires. Ces neurones auraient donc été classés dans notre étude comme *réguliers*. Des données supplémentaires sont nécessaires pour comparer les paramètres du PA des deux types de neurones de l'APN et préciser ces hypothèses (*half width*, amplitude et cinétique des APH).

## DISCUSSION

---

Plusieurs études rapportent un lien entre la décharge *stuttering* et les canaux potassiques Kv1 (Klaus et al., 2011; Povysheva et al., 2008; Sciamanna and Wilson, 2011; Toledo-Rodriguez et al., 2004). L'inactivation lente des canaux Kv1 expliquerait la dépolarisation lente et les oscillations sous-liminaire observées pendant les phases de silence. En effet, lors de la décharge, l'AHP permettrait de dé-inactiver progressivement les canaux potassiques, de sorte que le courant qui en résulte augmente au fur et à mesure de la décharge, pouvant expliquer l'adaptation fréquentielle observée pendant chaque salve. Suite à un certain nombre de PA, le courant potassique net devenu suffisant interromprait la décharge. Ce mécanisme expliquerait également la disparition de l'adaptation fréquentielle lors de l'injection de courants plus élevés. La fréquence de décharge serait en effet trop importante pour permettre la dé-inactivation des canaux potassiques. Il expliquerait également l'augmentation de la durée des silences au cours de la stimulation.

Si les neurones enregistrés dans l'APN correspondent à une seule et même population, le courant Kv1 pourrait être insuffisant pour permettre d'observer une décharge *stuttering* dans les neurones exclusivement *réguliers*. Cette hypothèse justifierait également le fait que certains neurones soient difficilement classables dans l'une ou l'autre catégorie, constituant un continuum dans les patrons de décharge observés, entre des *stutterings* exclusifs, ne montrant jamais de décharge *régulière* mais un blocage de l'émission des PA lors de l'injection de courants plus intenses, des *stutterings* pouvant décharger de manière *régulière* à des courant plus élevés, et des neurones exclusivement *réguliers*.

Dans le striatum, les neurones SOM+ montrant une décharge de type *Low Threshold Spike* (LTS) peuvent décharger de manière *stuttering*. Cela serait également lié à des conductances potassiques, cette fois-ci calcium-dépendantes, à savoir les BK (*Big calcium-dependent K channels*) et les SK (*Small calcium-dependent K channels*), modulés par la somatostatine elle-même. Elle réduirait le courant SK et augmenterait le courant BK, favorisant la composante rapide des AHP et le déclenchement du *stuttering* (Galarraga et al., 2007). En effet, une interaction fonctionnelle entre les canaux SK et les canaux calciques de type T a été montrée chez le rongeur dans la génération du patron de décharge *pacemaker* des neurones du Locus coeruleus, ainsi que dans les neurones dopaminergiques de la substance noire, contribuant à l'amplitude des AHP et activés par les influx calciques via les canaux T (Matschke et al., 2015, 2018; Wolfart and Roeper, 2002). Une interaction physique a également été mise en évidence entre l'isoforme Cav3.2 et les canaux BK dans les muscles lisses vasculaires (Hashad et al., 2018).

Dans l'amygdale, l'effet post-synaptique d'une telle décharge a été observé. Il évoquerait des courants post-synaptiques de plus grande amplitude, avec des latences et des cinétiques plus rapides, réduisant la dépression à court terme (*paired pulse depression*) et la suppression de décharge post-synaptique. Ces éléments contribueraient à la forte influence inhibitrice entre les neurones de l'amygdale, suggérant un *gating* du passage de l'information dans cette structure (Song et al., 2013). Ce mécanisme pourrait avoir lieu également à la synapse inhibitrice puissante entre l'APN et le PO (Bokor et al., 2005; Groh et al., 2014).

### 3. Rôle du canal Cav3.2 de l'APN dans la mise en place de la neuropathie

#### 3.1. Impact comportemental de la délétion du Cav3.2 de l'APN

La sous-population de neurones PV+ caractérisée co-exprime en grande majorité le canal Cav3.2. Nous avons étudié le rôle de ce dernier dans la perception somatosensorielle aiguë et neuropathique. Nos résultats montrent un rôle essentiel du canal Cav3.2 dans le développement de l'allodynie mécanique dans le modèle SNI. Ces résultats ont par ailleurs été reproduits par nos collaborateurs dans l'équipe d'Alain Eschalié (Laboratoire de Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur, Université Clermont Auvergne). En revanche, un dimorphisme sexuel a été observé dans le cadre de l'hyperalgie thermique à la chaleur qui n'était atténuée par la délétion que chez les mâles. Ce dimorphisme a été également observé lors de la délétion du Cav3.2 au niveau spinal dans le même modèle, par nos collaborateurs dans l'équipe d'Emmanuel Bourinet. Il repose donc probablement sur une différence dans le développement de l'hyperalgie thermique ou dans le rôle du canal Cav3.2 entre les mâles et les femelles.

En effet, l'expression du canal Cav3.2 est modulée positivement ou négativement par l'hormone féminine 17-oestradiol selon la structure étudiée. Ainsi, dans le myomètre et la glande pituitaire, cette hormone diminue l'expression du canal, alors que dans l'hypothalamus, elle augmente son expression (Banciu et al., 2018; Bosch et al., 2009; Zhang et al., 2009). Par ailleurs, cette hormone inhiberait la transmission synaptique glycinergique dans des cellules en culture du CA1 hippocampique de la moëlle épinière de rat (Jiang et al., 2009). Elle possède également un effet analgésique sur l'inflammation induite par la

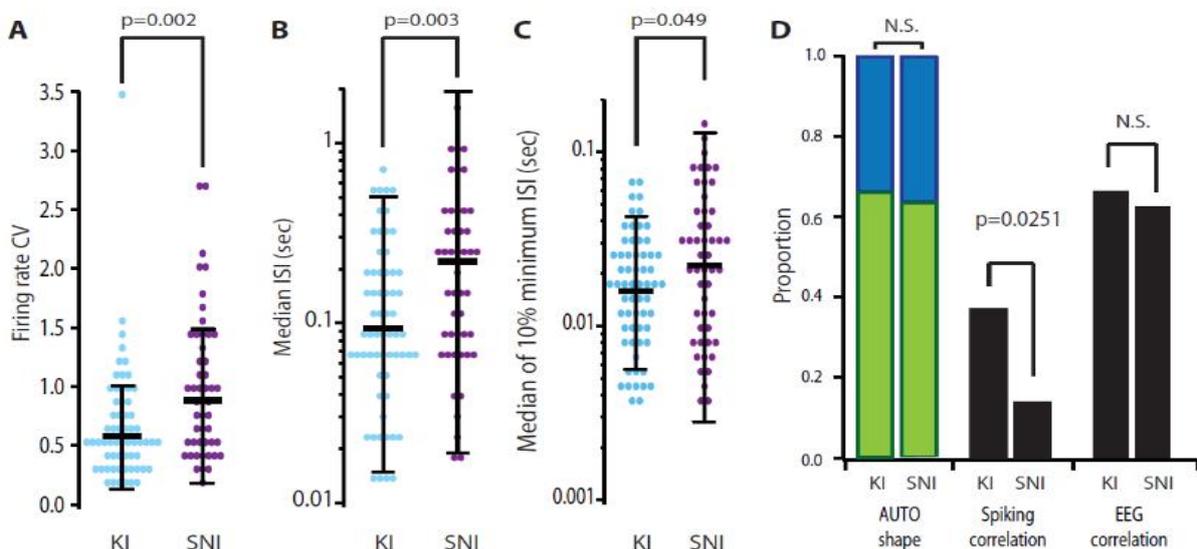
formaline au niveau du LPGi qui est par ailleurs une cible des neurones PV+ de l'APN (Khakpay et al., 2016, 2017). Une comparaison de l'expression, de la régulation et du rôle du canal Cav3.2 dans l'APN de souris mâles et femelles permettrait de comprendre ce dimorphisme. De plus en plus d'études mettent par ailleurs en évidence des dimorphismes sexuels dans la perception douloureuse, soulignant l'importance de l'analyse des deux sexes indépendamment (Nazarian et al., 2014; Rosen et al., 2017; Sorge et al., 2015).

Par ailleurs, la neuropathie induite par SNI est classiquement considérée comme capable d'induire une allodynie mécanique et thermique au froid. Les effets sur la perception de la chaleur seraient moindre, voire inexistant (Decosterd and Woolf, 2000; Shields et al., 2003). Mais un nombre croissant de travaux, y compris notre étude, remettent en cause ce dogme (François et al., 2015).

### 3.2. Impact du SNI sur l'excitabilité et l'activité de l'APN

Afin de déterminer les mécanismes pouvant expliquer les effets de la délétion du Cav3.2 sur le développement de la douleur neuropathique, nous avons d'abord souhaité étudier l'impact du SNI sur l'activité des neurones PV+ de l'APN. Les enregistrements préliminaires menés *in vitro* sur les souris PV-Cre-Ai14 n'ont pas montré de différence apparente dans l'excitabilité des neurones de l'APN pour l'instant. Si ce résultat, encore très préliminaire se confirme, ceci suggérerait que les propriétés intrinsèques de ces neurones ne seraient pas directement modifiées. On peut cependant imaginer que d'autres populations neuronales ou que la connectivité de l'APN seraient altérés par le SNI, avec par exemple une diminution des entrées synaptiques provenant de la périphérie ou du cortex. Mais nous n'excluons pas encore l'hypothèse d'un impact sur l'excitabilité intrinsèque de ces neurones pour l'instant. Les enregistrements extracellulaires *in vivo* réalisés actuellement au laboratoire sur des souris KI montrent une diminution de l'activité de décharge de neurones de l'APN suite au SNI (Figure 33). Une diminution de l'activité des neurones PV+ avait été rapportée dans le cortex somatosensoriel primaire dans ce modèle neuropathique (Cichon et al., 2017). Cette baisse d'activité de l'APN contribue probablement à la mise en place de la douleur neuropathique par la connectivité descendante et/ou ascendante de l'APN.

En effet, l $\alpha$ APN semble projeter vers le LPGi ipsilatéral (Genaro and Prado, 2016; Genaro et al., 2019). Il a été montré chez le rat que des projections sérotoninergiques en provenance du LPGi innervent préférentiellement les couches spinales superficielles I et II ipsilatérales (Gautier et al., 2017). Or la stimulation de l $\alpha$ APN semble évoquer une excitation des neurones situés dans cette région (Rees et al., 1995). Ce circuit APN-LPGi-moëlle pourrait faire partie de la modulation descendante de la perception douloureuse, médiant les effets analgésiques de la stimulation de l $\alpha$ APN. Cette connectivité descendante pourrait par ailleurs être altérée dans des conditions neuropathiques, de la même manière que pour le DNIC, ne filtrant plus le passage de l'information nociceptive, facilitant sa transmission (cf Introduction, Chapitre I ó 3.2.3).



**Figure 33 | Effet de la lésion SNI sur l'activité des neurones de l'APN contralatérale.**

Souris KI naïves : bleu ; souris KI-SNI : violet

(A) Coefficient de variation du taux de décharge des neurones de l $\alpha$ APN de souris KI naïves (n=62, 8 animaux) et ayant subi un SNI (KI-SNI ; n=50, 7 animaux). Noter l'augmentation du coefficient de variation du taux de décharge des neurones de l $\alpha$ APN suite au SNI.

(B) Les ISI médians observés lors de l'activité spontanée des neurones de l $\alpha$ APN de souris KI sont deux fois supérieurs à ceux des KI-SNI, traduisant une diminution de l'activité de décharge suite à la lésion SNI.

(C) Les médianes des 10% d'ISI minimaux des souris KI sont supérieures à celles des souris KI-SNI, traduisant une diminution des fréquences de décharge suite à la lésion SNI.

(D) Histogramme comparant plusieurs paramètres de l'activité des neurones de l $\alpha$ APN chez des souris KI (barres de gauche) ou KI-SNI (barres de droite) : comparaison des effets sur la proportion de neurones réguliers (verts) ou déchargeant en bouffées (bleu, à gauche), sur la proportion de neurones montrant une corrélation d'activité avec d'autres neurones de l $\alpha$ APN (au centre) et avec l'EEG (à droite). Noter la diminution de la corrélation d'activité entre neurones de l $\alpha$ APN.

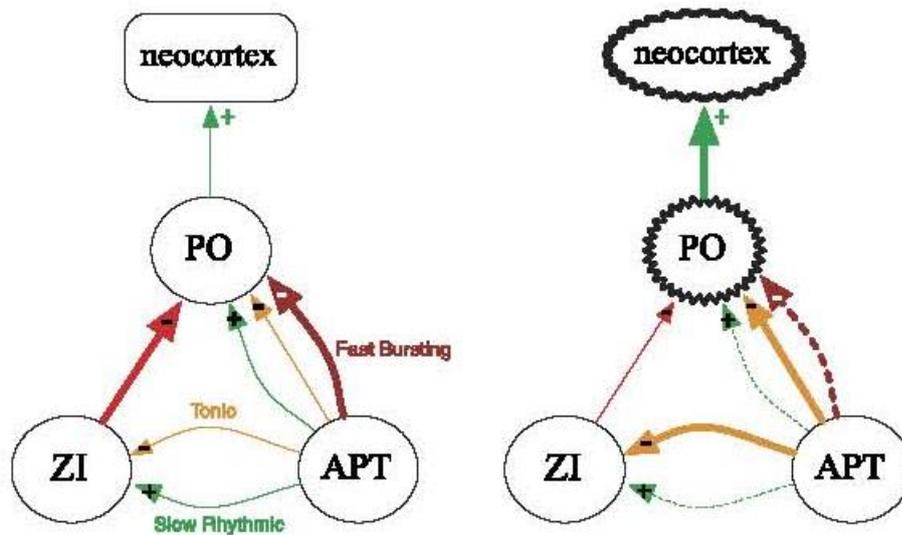
## DISCUSSION

---

La connectivité directe et indirecte entre l'APN et le thalamus pourrait aussi être impliquée dans ces effets. En effet, les enregistrements des neurones du PO chez le rat montrent que leurs réponses aux stimulations des vibrisses augmentent suite à une lésion de la ZI. Cette désinhibition suggère que la ZI exerce une inhibition *feed-forward* sur le PO et donc le thalamus somatosensoriel (Lavalée et al., 2005; Trageser and Keller, 2004). De plus, la région de la ZIv innervée par l'APN est riche en PV et a été identifiée comme projetant vers le thalamus. L'APN pourrait donc exercer une modulation complexe de l'activité du PO, via une afférence directe majoritairement inhibitrice d'une part, et par une désinhibition via son input majoritairement excitateur sur la ZI d'autre part.

Or, dans des modèles de douleur centrale, une augmentation de l'activité spontanée et évoquée des neurones du PO a été rapportée chez le rat, associée à une diminution de l'activité spontanée et évoquée de la ZI (Masri et al., 2009). Les afférences de l'APN vers ces deux noyaux pourraient être également impliquées dans la pathophysiologie des douleurs centrales : l'augmentation d'activité du PO en CPS pourrait être due soit à une diminution de l'afférence inhibitrice directe de l'APN vers le PO, soit à une augmentation de l'afférence excitatrice vers la ZI, désinhibant le PO. Des enregistrements extracellulaires de l'APN *in vivo* chez le rat anesthésié ayant subi une lésion spinale électrolytique montrent une augmentation du taux de décharge de certains neurones (Murray et al., 2010). Ce résultat s'inscrit en faveur de la seconde hypothèse. Cependant, celle-ci est difficilement conciliable avec l'inhibition exercée par l'APN sur le PO. Leurs auteurs expliquent cette contradiction par la possibilité que cette projection APN-PO soit insuffisante pour inhiber la décharge du PO (Figure 34). Cette hypothèse est en contradiction avec nos résultats *in vivo* chez des KI-SNI mais cohérente avec celle d'une levée d'inhibition vers le PO dans la douleur centrale.

L'impact de la délétion du Cav3.2 que nous avons observé sur la neuropathie post SNI pourrait donc jouer sur la connectivité entre l'APN et le thalamus, mais aussi sur les projections descendantes. Nous ignorons encore si le mécanisme impliqué diffère de celui évoquant une analgésie aiguë d'après les études de SPA. Mais il s'agit là d'un contexte neuropathique impliquant des mécanismes drastiquement différents où l'état de connectivité supra-spinale est altéré.



**Figure 34 | Schéma des changements d'activité dans les différents types de neurones de l'APN dans le syndrome de douleur centrale (d'après Murray et al., 2010).** L'augmentation de l'activité GABAergique des neurones toniques (orange) projetant vers le PO ou la ZI induit une diminution de l'afférence inhibitrice en provenance de la ZI vers le PO d'une part contribuant à l'augmentation du taux de décharge du PO. D'autre part, l'afférence inhibitrice vers le PO provenant directement des neurones toniques de l'APN augmente. Les neurones *slow rhythmic* excitateurs et *fast bursting* inhibiteurs montrent une augmentation de la prévalence des décharges en bouffée, mais leur taux de décharge globale reste inchangé. Leur implication n'est donc pas considérée. L'augmentation de l'afférence inhibitrice directe de l'APN vers le PO ne suffirait pas à contrer la désinhibition exercée via la ZI, ce qui résulterait globalement en une augmentation de l'activité du PO, pouvant augmenter l'activation des aires corticales somatosensorielles.

APT : Noyau Prétectal Antérieur ; PO : Noyau Postérieur ; ZI : Zona Incerta

### 3.3. Contribution du Cav3.2 de l'APN

Le rôle direct du canal Cav3.2 dans l'excitabilité et la connectivité de l'APN n'a pas encore été élucidé, ni en condition normale, ni en condition pathologique. Ceci est en partie lié à l'impossibilité d'étudier sa localisation subcellulaire dans ces neurones. Le canal Cav3.2, ainsi que les autres isoformes co-exprimées (notamment le Cav3.1) pourraient être responsables d'un courant de fenêtre influençant la probabilité de décharge de ces neurones, via une expression à l'AIS ou le potentiel de repos de ces neurones et donc leur excitabilité (Bessaïh et al., 2008; Dreyfus et al., 2010). Il pourrait également influencer l'intégration dendritique des afférences somatosensorielles et nociceptives. L'existence d'un fort *sag* dans ces cellules témoignant de la présence de canaux HCN qui possèdent une interaction fonctionnelle avec les canaux Cav3.2 présynaptiques dans le cortex enthorinal, dans la libération de glutamate (Huang et al., 2011). Il est également envisageable qu'une augmentation de l'expression du canal Cav3.2 survienne dans les neurones de l'APN lors de la neuropathie, impliquée dans sa mise en place, tel que cela a été observé dans les DRG et dans l'ACC, ce qui justifierait également l'atténuation des symptômes neuropathiques lors de sa délétion préventive (Kang et al., 2018; Shen et al., 2015). Beaucoup d'hypothèses subsistent donc quant au rôle du canal Cav3.2 exprimé dans l'APN dans le développement de la neuropathie, et aucune n'est privilégiée à l'heure actuelle.

Des enregistrements *in vitro* des neurones de l'APN chez des KO-Cav3.2-APN ne nous permettent pas d'étudier l'effet de cette délétion. En effet, les injections virales employées pour déléter le canal Cav3.2 du l'APN ne permettent pas de visualiser spécifiquement les neurones qui exprimaient initialement le Cav3.2, de par l'ubiquité du promoteur employé. Par ailleurs, l'expression du canal étant observé dans seulement 20% des neurones, l'enregistrement des neurones de l'APN à l'aveugle chez des KO-Cav3.2-APN présenterait un rendement trop faible pour détecter une éventuelle altération de leurs propriétés. Pour contourner cet obstacle nous réalisons actuellement des tests pharmacologiques *in vitro*, avec le Pr. Régis Lambert et le Dr. Nathalie Leresche, en appliquant soit du TTA-P2 soit du nickel qui, à basse concentration, ciblerait uniquement les canaux Cav3.2 dont l'affinité est la plus forte, afin de déterminer l'effet de la délétion du canal Cav3.2 sur l'excitabilité des neurones. Nous effectuerons des enregistrements *in vivo* des neurones de l'APN chez des souris KO-Cav3.2-APN afin de déterminer si la délétion permet de « sauver » la baisse d'activité globale liée à la neuropathie. De par ses propriétés biophysiques et sa localisation subcellulaire, le

## DISCUSSION

---

canal Cav3.2 semble en effet impliqué dans l'excitabilité cellulaire neuropathique aux niveaux périphérique et spinal (Candelas et al., 2019; François et al., 2015).

Si le canal Cav3.2 participe à la décharge des neurones de l'APN, ce dernier pourrait influencer la connectivité de l'APN avec le PO ou la ZI, et/ou la connectivité descendante spinale. La réalisation du KO non pas antérieurement au SNI mais postérieurement nous permettrait de préciser quelques hypothèses. En effet, si la délétion *a posteriori* permet de retrouver les mêmes effets d'atténuation de la douleur neuropathique, il est fort probable que ces derniers reposent sur un effet électrogénique direct du canal Cav3.2, influençant en temps réel l'afférence sensorielle ou nociceptive en provenance de la périphérie ou son traitement au niveau thalamique. En revanche, si ces effets ne sont pas retrouvés, il serait plus probable que le canal Cav3.2 soit impliqué dans un phénomène de plasticité entre l'APN et une de ses cibles post-synaptiques, nécessaire à l'installation de la douleur neuropathique, dans son initiation ou son maintien. Un effet tardif de la délétion sur la douleur neuropathique pencherait en faveur d'un rôle du canal Cav3.2 dans le maintien de ce phénotype. Dans cette problématique, il est intéressant de noter qu'une étude a montré que l'APN serait impliquée dans l'initiation de la neuropathie mais pas dans son maintien (Rossaneis et al., 2015)

### 4. Conclusion

Cette étude a permis de mettre en évidence, spécifiquement, l'implication du canal Cav3.2 exprimé au niveau supra-spinal dans le développement de la douleur neuropathique. Elle montre pour la première fois l'expression du canal *per se* dans le cerveau de souris et l'effet de sa délétion sur le développement de la douleur neuropathique dans une structure peu étudiée, impliquée dans la nociception, le Noyau Prétectal Antérieur. L'ensemble de nos résultats suggère que l'APN exerce un contrôle inhibiteur ascendant et /ou descendant du système somatosensoriel nociceptif. L'excitabilité de ce réseau inhibiteur dépendrait de façon critique de l'activité du canal calcique de type-T Cav3.2 lors de la mise en place et/ou du maintien de la douleur neuropathique. Le mécanisme sous-jacent à ces effets est encore sous étude et semble reposer sur une altération de l'activité de l'APN, pouvant contribuer à une modification de la connectivité cérébrale et descendante. Il pourra permettre de déterminer un des rôles du canal Cav3.2 exprimé au niveau supra-spinal. De manière générale, ces travaux contribuent à considérer le canal Cav3.2 comme un élément crucial de la neuropathie et une cible thérapeutique attractive.

Les tests cliniques des futurs traitements des neuropathies reposent sur les études précliniques menées principalement sur des animaux, en supposant que ces modèles présentent suffisamment de points communs avec la biologie du corps humain pour être représentatifs des douleurs neuropathiques observées cliniquement. Les composantes émotionnelle et cognitive de la douleur sont difficilement mesurables chez les animaux, de même que de nombreux symptômes cliniques des neuropathies tels que les paresthésies et dysthésies. Par ailleurs, les résultats de chaque étude sont obtenus dans des conditions expérimentales particulières, sur des animaux d'une souche, d'une espèce, d'âges et de sexes spécifiques nécessaires pour la reproductibilité des données mais masquant les impacts des facteurs environnementaux et des différences interindividuelles impactant également la perception douloureuse. Les résultats issus de ces expérimentations animales sont donc nécessaires mais doivent donc être replacés dans leur contexte et jugés avec précaution. La convergence de multiples études sur le rôle des canaux T, notamment Cav3.2 dans la neuropathie ont motivé la synthèse de molécules antagonistes et leurs tests cliniques chez l'Homme. De nouvelles substances ciblant les canaux T sont ainsi testées, en phases cliniques I et II, telles que certains dérivés du Triazinone, parmi lesquelles les plus efficaces montrent un impact particulier sur les canaux Cav3.2 (Nam, 2018; Serra et al., 2015; Ziegler et al., 2015).

## DISCUSSION

---

Les éventuels effets secondaires associés demandent à être déterminés, puisque une étude suggère d'ores et déjà une implication du Cav3.2 dans l'anxiété, la mémoire et la sensibilité à certains psychostimulants (Gangarossa et al., 2014). Il est nécessaire de connaître l'impact de ces substances aux différents niveaux de la nociception pour anticiper d'éventuels effets secondaires préjudiciables







# **BIBLIOGRAPHIE**



## BIBLIOGRAPHIE

---

- Abbasi, S., and Kumar, S.S. (2013). Electrophysiological and morphological characterization of cells in superficial layers of rat presubiculum. *J. Comp. Neurol.* *521*, 311663132.
- Abraira, V.E., Kuehn, E.D., Chirila, A.M., Springel, M.W., Toliver, A.A., Zimmerman, A.L., Orefice, L.L., Boyle, K.A., Bai, L., Song, B.J., et al. (2017). The Cellular and Synaptic Architecture of the Mechanosensory Dorsal Horn. *Cell* *168*, 295-310.e19.
- Aguado, C., García-Madrona, S., Gil-Minguez, M., and Luján, R. (2016). Ontogenic Changes and Differential Localization of T-type Ca<sup>2+</sup> Channel Subunits Cav3.1 and Cav3.2 in Mouse Hippocampus and Cerebellum. *Front. Neuroanat.* *10*, 83.
- Aissouni, Y., El Guerrab, A., Hamieh, A.M., Ferrier, J., Chalus, M., Lemaire, D., Grégoire, S., Etienne, M., Eschalié, A., Ardid, D., et al. (2017). Acid-Sensing Ion Channel 1a in the amygdala is involved in pain and anxiety-related behaviours associated with arthritis. *Sci. Rep.* *7*, 1613.
- Aizenman, C.D., Manis, P.B., and Linden, D.J. (1998). Polarity of long-term synaptic gain change is related to postsynaptic spike firing at a cerebellar inhibitory synapse. *Neuron* *21*, 8276835.
- Akgul, G., and Wollmuth, L.P. (2013). Synapse-Associated Protein 97 Regulates the Membrane Properties of Fast-Spiking Parvalbumin Interneurons in the Visual Cortex. *J. Neurosci.* *33*, 12739612750.
- Amir, R., Michaelis, M., and Devor, M. (2018). Membrane Potential Oscillations in Dorsal Root Ganglion Neurons: Role in Normal Electrogenesis and Neuropathic Pain. *J. Neurosci.* *19*, 858968596.
- Apkarian, V. (2012). The brain in chronic pain: clinical implications. *Pain Manag* *1*, 5776586.
- Apkarian, Hashmi, and Baliki (2011). Pain and the brain: Specificity and plasticity of the brain in clinical chronic pain. *Pain* *193*, 1186125.
- Apkarian, A.V., Bushnell, M.C., Treede, R.D., and Zubieta, J.K. (2005). Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur. J. Pain* *9*, 4636484.
- Armstrong, C.M., and Matteson, D.R. (1985). Two distinct populations of calcium channels in a clonal line of pituitary cells. *Science* (80- ). *227*, 65667.
- Aronoff, R., Matyas, F., Mateo, C., Ciron, C., Schneider, B., and Petersen, C.C.H. (2010). Long-range connectivity of mouse primary somatosensory barrel cortex. *Eur. J. Neurosci.* *31*, 222162233.
- Artola, A., and Singer, W. (1993). Long-term depression of excitatory synaptic transmission and its relationship to long-term potentiation. *Trends Neurosci.* *16*, 4806487.
- Ascoli, G. a, Alonso-Nanclares, L., Anderson, S. a, Barrionuevo, G., Benavides-Piccione, R., Burkhalter, A., Buzsáki, G., Cauli, B., Defelipe, J., Fairén, A., et al. (2008). Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 5576568.
- Astori, S., and Lüthi, A. (2013). Synaptic plasticity at intrathalamic connections via CaV3.3 T-type Ca<sup>2+</sup> channels and GluN2B-containing NMDA receptors. *J. Neurosci.* *33*, 6246630.
- Attal, N., and Bouhassira, D. (2004). Can pain be more or less neuropathic? *Pain* *110*, 5106 511.
- Avendaño, C., and Juretschke, M.A. (1980). The pretectal region of the cat: A structural and topographical study with stereotaxic coordinates. *J. Comp. Neurol.* *193*, 69688.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Baba, H., Goldstein, P.A., Okamoto, M., Tatsuro, K., Toyofumi, A., Yoshimura, M., and Shimoji, K. (2000a). Norepinephrine Facilitates Inhibitory Transmission in Substantia Gelatinosa of Adult Rat Spinal Cord (Part 2). *Aesthesiology* 067.
- Baba, H., Shimoji, K., and Yoshimura, M. (2000b). Norepinephrine Facilitates Inhibitory Transmission in Substantia Gelatinosa of Adult Rat Spinal Cord (Part 1) Effects.
- Bajic, D., and Proudfit, H.K. (1999). Projections of Neurons in the Periaqueductal Gray to Pontine and Medullary Catecholamine Cell Groups Involved in the Modulation of Nociception. *J Comp Neurol* 379, 3596379.
- Bal, T., and McCormick, D.A. (1997). Synchronized Oscillations in the Inferior Olive Are Controlled by the Hyperpolarization-Activated Cation Current  $I_h$ . *J. Neurophysiol.* 0022.
- Banciu, A., Banciu, D.D., Mustaciosu, C.C., Radu, M., Cretoiu, D., Xiao, J., Cretoiu, S.M., Suci, N., and Radu, B.M. (2018). Beta-estradiol regulates voltage-gated calcium channels and estrogen receptors in telocytes from human Myometrium. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1618.
- Bannister, K., and Dickenson, A.H. (2017). The plasticity of descending controls in pain: translational probing. *J. Physiol.* 595, 415964166.
- Barbara, G., Alloui, A., Lory, P., Eschalier, A., Bourinet, E., and Chemin, J. (2009). T-Type Calcium Channel Inhibition Underlies the Analgesic Effects of the Endogenous Lipoamino Acids. *J. Neurosci.* 29, 13106613114.
- Le Bars, D., Gozariu, M., and Cadden, S.W. (2001). Animal Models of Nociception. *Pharmacol. Rev.* 2216235.
- Barthó, P., Freund, T.F., and Acsády, L. (2002). Selective GABAergic innervation of thalamic nuclei from zona incerta. *Eur. J. Neurosci.* 16, 99961014.
- Barton, M.E., Eberle, E.L., and Shannon, H.E. (2005). The antihyperalgesic effects of the T-type calcium channel blockers ethosuximide, trimethadione, and mibefradil. *Eur. J. Pharmacol.* 521, 79685.
- Basbaum, A.I., and Fields, H.L. (1984). ENDOGENOUS PAIN CONTROL SYSTEMS : Brainstem Spinal Pathways and Endorphin Circuitry. *Ann. Rev. Neurosci* 7, 309.
- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., and Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* 139, 2676284.
- Bean, B.P. (2004). Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J. Gen. Physiol.* 86, 1630.
- Bender, K.J., and Trussell, L.O. (2009). Axon Initial Segment  $Ca^{2+}$  Channels Influence Action Potential Generation and Timing. *Neuron* 61, 2596271.
- Bender, K.J., Ford, C.P., and Trussell, L.O. (2010). Dopaminergic Modulation of Axon Initial Segment Calcium Channels Regulates Action Potential Initiation. *Neuron* 68, 5006511.
- Bennett, G.J., and Xie, Y.-K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33.
- Berit, A. (1998). Central Pain and Dysesthesia Syndrome. *Neuropathic Pain Syndr.* 16, 8996918.
- Berkley, K.J., and Mash, D.C. (1978). Somatic sensory projections to the pretectum in the cat. *Brain Res.* 158, 4456449.
- Berman, N. (1977). Connections of the pretectum in the cat. *J. Comp. Neurol.* 174, 2276254.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Bessaïh, T., Leresche, N., and Lambert, R.C. (2008). T current potentiation increases the occurrence and temporal fidelity of synaptically evoked burst firing in sensory thalamic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *105*, 11376611381.
- Bezudnaya, T., and Keller, A. (2008). Laterodorsal nucleus of the thalamus: A processor of somatosensory inputs. *J. Comp. Neurol.* *507*, 197961989.
- Bezprozvanny, I., and Tsien, R.W. (1995). Voltage-dependent blockade of diverse types of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels expressed in *Xenopus* oocytes by the Ca<sup>2+</sup> channel antagonist mibefradil (Ro 40-5967). *Mol. Pharmacol.* *48*, 540 LP ó 549.
- Blom, S.M., Pfister, J.-P., Santello, M., Senn, W., and Nevian, T. (2014). Nerve Injury-Induced Neuropathic Pain Causes Disinhibition of the Anterior Cingulate Cortex. *J. Neurosci.* *34*, 575465764.
- Bokor, H., Frère, S.G. a, Eyre, M.D., Slézia, A., Ulbert, I., Lüthi, A., and Acsády, L. (2005). Selective GABAergic control of higher-order thalamic relays. *Neuron* *45*, 9296940.
- Borostyánkoi-Baldauf, Z., and Herczeg, L. (2002). Parcellation of the human pretectal complex: A chemoarchitectonic reappraisal. *Neuroscience* *110*, 5276540.
- Bosch, M.A., Hou, J., Fang, Y., Kelly, M.J., and Rønnekleiv, O.K. (2009). 17 -estradiol regulation of the mRNA expression of t-type calcium channel subunits: Role of estrogen receptor and estrogen receptor . *J. Comp. Neurol.* *512*, 3476358.
- Bouhassira, D., Attal, N., Fermanian, J., Alchaar, H., Gautron, M., Masquelier, E., Rostaing, S., Lanteri-Minet, M., Collin, E., Grisart, J., et al. (2004). Development and validation of the Neuropathic Pain Symptom Inventory. *Pain* *108*, 2486257.
- Bouhassira, D., Lantéri-Minet, M., Attal, N., Laurent, B., and Touboul, C. (2008). Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* *136*, 3806387.
- Bourinet, E., Alloui, A., Monteil, A., Barrère, C., Couette, B., Poirot, O., Pages, A., McRory, J., Snutch, T.P., Eschalier, A., et al. (2005). Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *EMBO J.* *24*, 3156324.
- Bourinet, E., Altier, C., Hildebrand, M.E., Trang, T., Salter, M.W., and Zamponi, G.W. (2014). Calcium-permeable ion channels in pain signaling. *Physiol. Rev.* 816140.
- Bourquin, A.-F., Suveges, M., Pertin, M., Gilliard, N., Sardy, S., Davison, A.C., Spahn, D.R., and Decosterd, I. (2006). Assessment and analysis of mechanical allodynia-like behavior induced by spared nerve injury ( SNI ) in the mouse. *Pain* *122*, 1614.
- Breivik, H., Collett, B., Ventafridda, V., Cohen, R., and Gallacher, D. (2006). Survey of chronic pain in Europe: Prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur. J. Pain* *10*, 287.
- Burgess, D.E., Crawford, O., Delisle, B.P., and Satin, J. (2002). Mechanism of inactivation gating of human T-type (low-voltage activated) calcium channels. *Biophys. J.* *82*, 189461906.
- Burton, S.D., and Urban, N.N. (2014). Greater excitability and firing irregularity of tufted cells underlies distinct afferent-evoked activity of olfactory bulb mitral and tufted cells. *J. Physiol.* *592*, 209762118.
- Bushnell, M.C., eko, M., and Low, L.A. (2013). Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci.* *14*, 5026511.
- Butler, R.K., and Finn, D.P. (2009). Stress-induced analgesia. *Prog. Neurobiol.* *88*, 1846202.
- Cadusseau, J., and Roger, M. (1991). Cortical and subcortical connections of the pars compacta of the anterior pretectal nucleus in the rat. *Neurosci. Res.* *12*, 836100.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Candelas, M., Reynders, A., Arango-Lievano, M., Neumayer, C., Fruquière, A., Demes, E., Hamid, J., Lemmers, C., Bernat, C., Monteil, A., et al. (2019). Cav3.2 T-type calcium channels shape electrical firing in mouse Lamina II neurons. *Sci. Rep.* *9*, 1618.
- Carbone, E., and Lux, H.D. (1984). A low voltage-activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurons. *Biophys. J.* *46*, 4136418.
- Carpenter, M.B., and Pierson, R.J. (1973). Pretectal Region and the Pupillary Light Reflex. An Anatomical Analysis in the Monkey. *J Comp Neurol* *149*, 2716300.
- Carstens, E., Leah, J., Lechner, J., and Zimmermann, M. (1990). Demonstration of extensive brainstem projections to medial and lateral thalamus and hypothalamus in the rat. *Neuroscience* *35*, 6096626.
- Carter, A.G., and Sabatini, B.L. (2004). State-dependent calcium signaling in dendritic spines of striatal medium spiny neurons. *Neuron* *44*, 4836493.
- Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., and Yaksh, T.L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Methods* *53*, 55663.
- Chaplan, S.R., Guo, H.-Q., Lee, D.H., Luo, L., Liu, C., Kuei, C., Velumian, A.A., Butler, M.P., Brown, S.M., and Dubin, A.E. (2003). Neuronal Hyperpolarization-Activated Pacemaker Channels Drive Neuropathic Pain. *J. Neurosci.* *23*, 116961178.
- Chausson, P., Leresche, N., and Lambert, R.C. (2013). Dynamics of Intrinsic Dendritic Calcium Signaling during Tonic Firing of Thalamic Reticular Neurons. *PLoS One* *8*.
- Chemin, J., Monteil, A., Perez-Reyes, E., Bourinet, E., Nargeot, J., and Lory, P. (2002). Specific contribution of human T-type calcium channel isoforms ( $\alpha(1G)$ ,  $\alpha(1H)$  and  $\alpha(1I)$ ) to neuronal excitability. *J. Physiol.* *540*, 3614.
- Chiang, C.Y., Dostrovsky, J.O., and Sessle, B.J. (1990). Role of anterior pretectal nucleus in somatosensory cortical descending modulation of jaw-opening reflex in rats. *Brain Res.* *515*, 2196226.
- Chiang, C.Y., Dostrovsky, J.O., and Sessle, B.J. (1991). Periaqueductal gray matter and nucleus raphe magnus involvement in anterior pretectal nucleus-induced inhibition of jaw-opening reflex in rats. *Brain Res.* *544*, 71678.
- Chiang, C.Y., Chen, I.C., Dostrovsky, J.O., and Sessle, B.J. (1992). Anterior pretectal nucleus-induced modulatory effects on trigeminal brainstem somatosensory neurons. *Neurosci. Lett.* *134*, 2336237.
- Choe, W., Messinger, R.B., Leach, E., Eckle, V.-S., Obradovic, A., Salajegheh, R., Jevtovic-Todorovic, V., and Todorovic, S.M. (2011). TTA-P2 is a potent and selective blocker of T-type calcium channels in rat sensory neurons and a novel antinociceptive agent. *Mol. Pharmacol.* *80*, 9006910.
- Choi, S., Na, H.S., Kim, J., Lee, J., Lee, S., Kim, D., Park, J., Chen, C.C., Campbell, K.P., and Shin, H.S. (2007). Attenuated pain responses in mice lacking Cav3.2 T-type channels. *Genes, Brain Behav.* *6*, 4256431.
- Choi, S., Yu, E., Hwang, E., and Llinás, R.R. (2016). Pathophysiological implication of Ca v 3.1 T-type Ca<sup>2+</sup> channels in trigeminal neuropathic pain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201600418.
- Chuang, H., Prescott, E.D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S.-E., Basbaum, A.I., Chao, M. V, and Julius, D. (2001). Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature* *411*, 9576962.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Cichon, J., Blanck, T.J.J., Gan, W.-B., and Yang, G. (2017a). Activation of cortical somatostatin interneurons prevents the development of neuropathic pain. *Nat Neurosci* *20*, 112261132.
- Cichon, J., Blanck, T.J.J., Gan, W., and Yang, G. (2017b). Activation of cortical somatostatin interneurons prevents the development of neuropathic pain. *Nat. Neurosci.*
- Clemente-perez, A., Makinson, S.R., Higashikubo, B., Deisseroth, K., and Paz, J.T. (2017). Distinct Thalamic Reticular Cell Types Differentially Modulate Normal and Pathological Cortical Rhythms Article Distinct Thalamic Reticular Cell Types Differentially Modulate Normal and Pathological Cortical Rhythms. *Cell Rep.* 213062142.
- Cliffer, K.D., Burstein, R., and Giesler, G.J. (1991). Distributions of spinothalamic, spinohypothalamic, and spinotelencephalic fibers revealed by anterograde transport of PHA-L in rats. *J. Neurosci.* *11*, 8526868.
- Cohen, R.S., and Melzack, R. (1986). Habenular stimulation produces analgesia in the formalin test. *Neurosci. Lett.* *70*, 1656169.
- Contreras, D., Curro Dossi, R., and Steriade, M. (1993). Electrophysiological properties of cat reticular thalamic neurons in vivo. *J. Physiol.* *470*, 2736294.
- Coull, J.A.M., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M.W., and Koninck, Y. De (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* *438*, 101761021.
- Craig, P.J., Beattie, R.E., Folly, E.A., Reeves, M.B., Priestley, J. V, Carney, S.L., Sher, E., Perez-Reyes, E., and Volsen, S.G. (1999). Distribution of the voltage-dependent calcium channel 1G subunit mRNA and protein throughout the mature rat brain. *Eur. J. Neurosci.* *11*, 294962964.
- Crandall, S.R., Govindaiah, G., and Cox, C.L. (2010). Low-Threshold Ca<sup>2+</sup> Current Amplifies Distal Dendritic Signaling in Thalamic Reticular Neurons. *J Neurosci* *30*, 15419615429.
- Cribbs, L.L., Lee, J., Yang, J., Satin, J., Zhang, Y., Daud, A., Barclay, J., Williamson, M.P., Fox, M., Rees, M., et al. (1998). Cloning and Characterization of alpha1H From Human Heart, a Member of the T-Type Ca<sup>2+</sup> Channel Gene Family. *Circ Res* 1036109.
- Crick, F. (1984). Function of the thalamic reticular complex: The searchlight hypothesis Neurobiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *81*, 458664590.
- Crunelli, V., and Leresche, N. (2003). Block of Thalamic T-Type Ca<sup>2+</sup> Channels by Ethosuximide Is Not the Whole Story. *Epilepsy Curr.* *2*, 53656.
- Crunelli, V., Tibor, I.T., Cope, D.W., Blethyn, K., and Hughes, S.W. (2005). The  $\div$  window  $\emptyset$  T-type calcium current in brain dynamics of different behavioural states. *J. Physiol.* *1*, 1216129.
- Crunelli, V., David, F., Leresche, N., and Lambert, R.C. (2014). Role for T-type Ca<sup>2+</sup> channels in sleep waves. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* *466*, 7356745.
- Cueni, L., Canepari, M., Adelman, J.P., and Lüthi, A. (2009). Ca<sup>2+</sup> signaling by T-type Ca<sup>2+</sup> channels in neurons. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* *457*, 116161172.
- Davis, J.A., Robinson, R.L., Le, T.K., and Xie, J. (2011). Incidence and impact of pain conditions and comorbid illnesses. *J. Pain Res.* *4*, 3316345.
- Decosterd, I., and Woolf, C.J. (2000). Spared nerve injury: An animal model of persistent

## BIBLIOGRAPHIE

---

- peripheral neuropathic pain. *Pain* 87, 1496158.
- Deleuze, C., David, F., Behuret, S., Sadoc, G., Shin, H.-S., Uebele, V.N., Renger, J.J., Lambert, R.C., Leresche, N., and Bal, T. (2012). T-Type Calcium Channels Consolidate Tonic Action Potential Output of Thalamic Neurons to Neocortex. *J. Neurosci.* 32, 122286-12236.
- Delfini, M., Mantilleri, A., Gaillars, S., Hao, J., Reynders, A., Malapert, P., Delfini, M., Mantilleri, A., Alonso, S., Franc, A., et al. (2013). TAFA4, a Chemokine-like Protein, Modulates Injury-Induced Mechanical and Chemical Pain Hypersensitivity in Mice. *Cell Rep.* 5, 3786388.
- DeSalles, A.A.F., Katayama, Y., Becker, D.P., and Hayes, R.L. (2009). Pain suppression induced by electrical stimulation of the pontine parabrachial region. *J. Neurosurg.* 62, 3976-407.
- Destexhe, A., Sejnowski, T.J., Contreras, D., Steriade, M., and Huguenard, J.R. (1996). In vivo, in vitro, and computational analysis of dendritic calcium currents in thalamic reticular neurons. *J. Neurosci.* 16, 1696185.
- Destexhe, A., Neubig, M., Ulrich, D., and Huguenard, J. (1998). Dendritic Low-Threshold Calcium Currents in Thalamic Relay Cells. *J. Neurosci.* 18, 357463588.
- Deval, E., Noël, J., Gasull, X., Delaunay, A., Alloui, A., Eschalier, A., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2011). Acid-Sensing Ion Channels in Postoperative Pain. *J. Neurosci.* 31, 605966066.
- Devienne, G., Le Gac, B., Piquet, J., and Cauli, B. (2018). Single Cell Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction After Patch-clamp. *J. Vis. Exp.* 1612.
- Devor, M., Keller, C.H., Deerinck, T.J., Levinson, R.S., and Ellisman, M.H. (1989). Na<sup>+</sup> channel accumulation on axolemma of afferent endings in nerve end neuromas in *Apterionotus*. *Neurosci. Lett.* 102, 1496154.
- Diana, M.A., Otsu, Y., Maton, G., Collin, T., Chat, M., and Dieudonné, S. (2007). T-type and L-type Ca<sup>2+</sup> conductances define and encode the bimodal firing pattern of vestibulocerebellar unipolar brush cells. *J. Neurosci.* 27, 382363838.
- Diochot, S., Baron, A., Salinas, M., Douguet, D., Scarzello, S., Dabert-Gay, A.-S., Debayle, D., Friend, V., Alloui, A., Lazdunski, M., et al. (2012). Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain. *Nature* 490, 552.
- Dogrul, A., Gardell, L.R., Ossipov, M.H., Tulunay, F.C., Lai, J., and Porreca, F. (2003). Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers. *Pain* 105, 1596168.
- Dogrul, A., Ossipov, M.H., and Porreca, F. (2009). Differential mediation of descending pain facilitation and inhibition by spinal 5HT-3 and 5HT-7 receptors. *Brain Res.* 1280, 52659.
- Dolphin, A.C. (2006). A short history of voltage-gated calcium channels. *Br. J. Pharmacol.* 147, 56662.
- Dolphin, A.C., Wyatt, C.N., Richards, J., Beattie, R.E., Craig, P., Lee, J.-H., Cribbs, L.L., Volsen, S.G., and Perez-Reyes, E. (1999). The effect of  $\alpha_2$ - and other accessory subunits on expression and properties of the calcium channel  $\alpha_1G$ . *J. Physiol.* 519, 35645.
- Domich, B.Y.L., Oakson, G., and Steriade, M. (1986). Thalamic Burst Patterns in the Naturally Sleeping Cat: A Comparison Between Cortically Projecting and Reticularis

## BIBLIOGRAPHIE

---

Neurones. *J. Physiol.* 379, 4296449.

Dreyfus, F.M., Tschertter, A., Errington, A.C., Renger, J.J., Shin, H., Uebele, V.N., Crunelli, V., Lambert, C., Leresche, N., Curie-paris, P.M., et al. (2010). Selective T-Type Calcium Channel Block in Thalamic Neurons Reveals Channel Redundancy and Physiological Impact of I Twindow. *J. Neurosci.* 30, 996109.

Dubel, S.J., Altier, C., Chaumont, S., Lory, P., Bourinet, E., and Nargeot, J. (2004). Plasma membrane expression of T-type calcium channel  $\alpha_1$  subunits is modulated by high voltage-activated auxiliary subunits. *J. Biol. Chem.* 279, 29263629269.

Dubreuil, A., Boukhaddaoui, H., Desmadryl, G., Martinez-salgado, C., Moshourab, R., Lewin, G.R., Carroll, P., Valmier, J., and Scamps, F. (2004). Role of T-Type Calcium Current in Identified D-Hair Mechanoreceptor Neurons Studied In Vitro. 24, 848068484.

Edlund, M.J., Austen, M.A., Sullivan, M.D., Martin, B.C., Williams, J.S., Fortney, J.C., and Hudson, T.J. (2014). Patterns of opioid use for chronic noncancer pain in the Veterans Health Administration from 2009 to 2011. *Pain* 155.

Egger, V., Svoboda, K., and Mainen, Z.F. (2003). Mechanisms of lateral inhibition in the olfactory bulb: Efficiency and modulation of spike-evoked calcium influx into granule cells. *J. Neurosci.* 23, 755167558.

Egger, V., Svoboda, K., and Mainen, Z.F. (2005). Dendrodendritic synaptic signals in olfactory bulb granule cells: Local spine boost and global low-threshold spike. *J. Neurosci.* 25, 352163530.

Emery, E.C., Young, G.T., Berrocso, E.M., Chen, L., and McNaughton, P.A. (2011). HCN2 Ion Channels Play a Central Role in Inflammatory and Neuropathic Pain. *Science* (80- ). 333, 146261466.

Engbers, J.D.T., Anderson, D., Asmara, H., Rehak, R., Mehaffey, W.H., Hameed, S., McKay, B.E., Kruskic, M., Zamponi, G.W., and Turner, R.W. (2012). Intermediate conductance calcium-activated potassium channels modulate summation of parallel fiber input in cerebellar Purkinje cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 260162606.

Errington, A.C., Renger, J.J., Uebele, V.N., and Crunelli, V. (2010). State-Dependent Firing Determines Intrinsic Dendritic  $Ca^{2+}$  Signaling in Thalamocortical Neurons. *J. Neurosci.* 30, 14843614853.

Faber, C.G., Lauria, G., Merckies, I.S.J., Cheng, X., and Han, C. (2012). Gain-of-function Nav1.8 mutations in painful neuropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 267.

Fatt, P., and Ginsborg, B.L. (1958). The ionic requirements for the production of action potentials in crustacean muscle fibers. *J Physiol.*

Fatt, P., and Katz, B. (1952). The electrical properties of crustacean muscle fibers. *J Physiol* 120, 1716204.

Fedulova, S.A., Kostyuk, P.G., and Veselovsky, N.S. (1985). Two Types of Calcium Channels in the Somatic Membrane of New-Born Rat Dorsal Root Ganglion Neurones. *J Physiol* 4316446.

Ferrini, F., Trang, T., Mattioli, T.M., Laffray, S., Guidice, T. Del, Lorenzo, L., Castonguay, A., Doyon, N., Zhang, W., Godin, A.G., et al. (2013). Morphine hyperalgesia gated through microglia- mediated disruption of neuronal  $Cl^{-}$  homeostasis. *Nat. Neurosci.* 16, 1836192.

Finnerup, N.B., Haroutounian, S., Kamerman, P., Baron, R., Bennett, D.L.H., Bouhassira, D.,

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Cruccu, G., Freeman, R., Hansson, P., Nurmikko, T., et al. (2016). Neuropathic pain: An updated grading system for research and clinical practice. *Pain* *157*, 1.
- Flatters, S.J.L., and Bennett, G.J. (2004). Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain* *109*, 1506161.
- Flockerzi, V., Oeken, H.-J., Hofmann, F., Pelzer, D., Cavalié, A., and Trautwein, W. (1986). Purified dihydropyridine-binding site from skeletal muscle t-tubules is a functional calcium channel. *Nature* *323*, 66668.
- Foerster, B.R., Petrou, M., Edden, R.A.E., Sundgren, P.C., Schmidt-Wilcke, T., Lowe, S.E., Harte, S.E., Clauw, D.J., and Harris, R.E. (2012). Reduced insular  $\gamma$ -aminobutyric acid in fibromyalgia. *Arthritis Rheum.* *64*, 5796583.
- Foster, G.A., Sizer, A.R., Rees, H., and Roberts, M.H.T. (1989). Afferent projections to the rostral anterior pretectal nucleus of the rat: a possible role in the processing of noxious stimuli. *Neuroscience* *29*, 6856694.
- Francois, A., Kerckhove, N., Meleine, M., Alloui, A., Barrere, C., Gelot, A., Uebele, V.N., Renger, J.J., Eschalier, A., Ardid, D., et al. (2013). State-dependent properties of a new T-type calcium channel blocker enhance CaV3.2 selectivity and support analgesic effects. *Pain* *154*, 2836293.
- François, A., Schüetter, N., Laffray, S., Sanguesa, J., Pizzoccaro, A., Dubel, S., Mantilleri, A., Nargeot, J., Noël, J., Wood, J.N., et al. (2015). The Low-Threshold Calcium Channel Cav3.2 Determines Low-Threshold Mechanoreceptor Function. *Cell Rep.* *10*, 3706382.
- François, A., Low, S.A., Sypek, E.I., Christensen, A.J., Sotoudeh, C., Beier, K.T., Ramakrishnan, C., Ritola, K.D., Sharif-Naeini, R., Deisseroth, K., et al. (2017). A Brainstem-Spinal Cord Inhibitory Circuit for Mechanical Pain Modulation by GABA and Enkephalins. *Neuron* *93*, 822-839.e6.
- Friedman, D.P., and Murray, E.A. (1986). Thalamic connectivity of the second somatosensory area and neighboring somatosensory fields of the lateral sulcus of the macaque. *J. Comp. Neurol.* *252*, 3486373.
- Galarraga, E., Vilchis, C., Tkach, T., Salgado, H., Tecuapetla, F., Perez-Rosello, T., Perez-Garci, E., Hernández-Echeagaray, E., Surmeier, D., and Bargas, J. (2007). Somatostatinergic modulation of firing pattern and calcium-activated potassium currents in medium spiny neostriatal neurons. *Neuroscience* *146*, 5376554.
- Gangarossa, G., Laffray, S., Bourinet, E., and Valjent, E. (2014). T-type calcium channel Cav3.2 deficient mice show elevated anxiety, impaired memory and reduced sensitivity to psychostimulants. *Front. Behav. Neurosci.* *8*, 92.
- García-Caballero, A., Gadotti, V.M., Stemkowski, P., Weiss, N., Souza, I.A., Hodgkinson, V., Bladen, C., Chen, L., Hamid, J., Pizzoccaro, A., et al. (2014). The Deubiquitinating Enzyme USP5 Modulates Neuropathic and Inflammatory Pain by Enhancing Cav3.2 Channel Activity. *Neuron* *83*, 114461158.
- Garcia-Larrea, L., and Bastuji, H. (2018). Pain and consciousness. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* *87*, 1936199.
- Garcia-Larrea, L., and Magnin, M. (2008). Pathophysiology of neuropathic pain: review of experimental models and proposed mechanisms. *Press. Medicale* *37*, 3156340.
- Garcia-Larrea, L., and Peyron, R. (2013). Pain matrices and neuropathic pain matrices: A review. *Pain* *154*, S296S43.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Garey, L.J., and Powell, T.P.S. (1968). The projection of the retina in the cat. *J. Anat.* 1896 222.
- Gasser, H.S., and Erlanger, J. (1927). The role played by the sizes of the constituent fibers of a nerve trunk in determining the form of its action potential wave. *Am. J. Physiol.* 80, 5226 547.
- Gassmann, M., Shaban, H., Sansig, G., Haller, C., Barbieri, S., Humeau, Y., Mu, M., Kinzel, B., Klebs, K., Schmutz, M., et al. (2004). Redistribution of GABA B ( 1 ) Protein and Atypical GABA B Responses in GABA B ( 2 ) -Deficient Mice. *24*, 608666097.
- Gautier, A., Geny, D., Bourgoin, S., Bernard, J.F., and Hamon, M. (2017). Differential innervation of superficial versus deep laminae of the dorsal horn by bulbo-spinal serotonergic pathways in the rat. *IBRO Reports* 2, 72680.
- Gebhart, G.F., Sandkuhler, J., Thalhammer, J.G., and Zimmermann, M. (1983). Inhibition of spinal nociceptive information by stimulation in midbrain of the cat is blocked by lidocaine microinjected in nucleus raphe magnus and medullary reticular formation. *J. Neurophysiol.* 50, 144661459.
- Genaro, K., and Prado, W.A. (2016). Neural Correlates of the Antinociceptive Effects of Stimulating the Anterior Pretectal Nucleus in Rats. *J. Pain* 17, 115661163.
- Genaro, K., Fabris, D., and Prado, W.A. (2019). The antinociceptive effect of anterior pretecal nucleus stimulation is mediated by distinct neurotransmitter mechanisms in descending pain pathways. *Brain Res. Bull.* 146, 1646170.
- Giber, K., Slézia, A., Bokor, H., Bodor, A.L., Ludanyi, A., Katona, I., and Acsady, L. (2008). Heterogeneous Output Pathways Link the Anterior Pretectal Nucleus With the Zona Incerta and the Thalamus in Rat. *J Comp Neurol* 506, 1226140.
- Gomora, J.C., Enyeart, J.A., and Enyeart, J.J. (1999). Mibefradil Potently Blocks ATP-Activated K<sup>+</sup> Channels in Adrenal Cells. *Mol. Pharmacol.* 56, 119261197.
- Gregory, K.M. (1985). The Dendritic Architecture of the Visual Pretectal Nuclei of the Rat : A Study With the Golgi-Cox Method. *J Comp Neurol* 135, 1226135.
- Groh, A., Bokor, H., Mease, R.A., Plattner, V.M., Hangya, B., Stroh, A., Deschenes, M., and Acsády, L. (2014). Convergence of cortical and sensory driver inputs on single thalamocortical cells. *Cereb. Cortex* 24, 316763179.
- Guillery, R.W., and Sherman, S.M. (2002). Thalamic Relay Functions and Their Role in Corticocortical Communication: Generalizations from the Visual System. *Neuron* 33, 1636 175.
- Guillery, R.W., Feig, S.L., and Lozsádi, D.A. (1998). Paying attention to the thalamic reticular nucleus. *Trends Neurosci.* 2236, 28632.
- Gustin, S.M., Peck, C.C., Wilcox, S.L., Nash, P.G., Murray, G.M., and Henderson, L.A. (2011). Different pain, different brain: thalamic anatomy in neuropathic and non-neuropathic chronic pain syndromes. *J Neurosci* 31, 595665964.
- Hagiwara, S. (1975). Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J. Gen. Physiol.* 65, 6176644.
- Hagiwara, N., Irasawa, H., and Kameyama, M. (1988). Contribution of Two Types of Calcium Currents to the Pacemaker Potentials of Rabbit Sino-Atrial Node Cells. *J. Physiol.* 2336253.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Halassa, M.M., and Acsády, L. (2016). Thalamic inhibition: Diverse sources, diverse scales. *Trends Neurosci.* *39*, 6806693.
- Hamidi, G.A., Ramezani, M.H., Arani, M.N., Talaei, S.A., Mesdaghinia, A., and Banafshe, H.R. (2012). Ethosuximide reduces allodynia and hyperalgesia and potentiates morphine effects in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* *674*.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* *391*, 856100.
- Hardy, S.G. (1985). Analgesia elicited by prefrontal stimulation. *Brain Res.* *339*, 2816284.
- Hashad, A., Harraz, O., Brett, S., Romero, M., Kassman, M., Puglisi, J., Wilson, S., Gollasch, M., and Welsh, D. (2018). Caveolae Link CaV3.2 Channels to BKCa-Mediated Feedback in Vascular Smooth Muscle. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *38*, 237162381.
- von Hehn, C.A., Baron, R., and Woolf, C.J. (2012). Deconstructing the Neuropathic Pain Phenotype to Reveal Neural Mechanisms. *Neuron* *73*, 6386652.
- Helm, J., Akgul, G., and Wollmuth, L.P. (2012). Subgroups of parvalbumin-expressing interneurons in layers 2/3 of the visual cortex. *J. Neurophysiol.* *109*, 160061613.
- Helmstetter, F.J., Tershner, S.A., Poore, L.H., and Bellgowan, P.S.F. (1998). Antinociception following opioid stimulation of the basolateral amygdala is expressed through the periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. 1046118.
- Henderson, L.A., Peck, C.C., Petersen, E.T., Rae, C.D., Youssef, A.M., Reeves, J.M., Wilcox, S.L., Akhter, R., Murray, G.M., and Gustin, S.M. (2013). Chronic Pain: Lost Inhibition? *J. Neurosci.* *33*, 757467582.
- Heppenstall, P.A., and Lewin, G.R. (2006). A role for T-type Ca<sup>2+</sup> channels in mechanosensation. *Cell Calcium* *40*, 1656174.
- Hering, J., Feltz, A., and Lambert, R.C. (2004). Slow inactivation of the Ca(V)3.1 isotype of T-type calcium channels. *J. Physiol.* *555*, 3316344.
- Hildebrand, M.E., Isope, P., Miyazaki, T., Nakaya, T., Garcia, E., Feltz, A., Schneider, T., Kano, M., Sakimura, K., Watanabe, M., et al. (2009). Functional Coupling between mGluR1 and Ca<sup>v</sup>3.1 T-Type Calcium Channels Contributes to Parallel Fiber-Induced Fast Calcium Signaling within Purkinje Cell Dendritic Spines. *J. Neurosci.* *29*, 966869682.
- Hilton, B.Y.S.M., and Redfern, W.S. (1986). A search for brain stem cell groups integrating the defence reaction in the rat. *J Physiol* 2136228.
- Hodgkin, A.L., and Huxley, A.F. (1952). The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* *116*, 4736496.
- Hong, S., Morrow, T.J., Paulson, P.E., Isom, L.L., and Wiley, J.W. (2004). Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in tetrodotoxin-sensitive and -resistant sodium channels in dorsal root ganglion neurons in the rat. *J. Biol. Chem.* *279*, 29341629350.
- Huang, Z., Lujan, R., Kadurin, I., Uebele, V.N., Renger, J.J., Dolphin, A.C., and Shah, M.M. (2011). Presynaptic HCN1 channels regulate Cav3.2 activity and neurotransmission at select cortical synapses. *Nat. Neurosci.* *14*, 4786486.
- Hutchins, B. (1991). Evidence for a direct retinal projection to the anterior pretectal nucleus in the cat. *Brain Res.* *22*, 59667.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Hutchins, B., and Weber, J.T. (1985). The pretectal complex of the monkey: A reinvestigation of the morphology and retinal terminations. *J. Comp. Neurol.* 232, 4256442.
- Ibuki, T., Hama, A.T., Wang, X., Pappas, G.D., and Sagen, J. (1997). Loss of GABA immunoreactivity in the spinal dorsal horn of rats with peripheral nerve injury and promotion of recovery by adrenal medullary grafts. *Neuroscience* 76, 8456858.
- Iggo, A. (1959). Cutaneous Heat and Cold Receptors With Slowly Conducting (C) Afferent Fibres. *Q. J. Exp. Physiol. Cogn. Med. Sci.* 44, 3626370.
- Iggo, A. (1960). Cutaneous mechanoreceptors with afferent C fibers. *J. Physiol.* 3376353.
- International Association for the Study of Pain (1986). Classification of chronic pain: Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. (Netherlands: Elsevier Science).
- Ishibashi, H., Murai, Y., and Akaike, N. (1998). Effect of nilvadipine on the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Brain Res.* 813, 1216 127.
- Itoh, K. (1977). Brain Efferent Projections of the Pretectum in the Cat. *Exp. Brain Res.* 105, 896105.
- Jagodic, M.M., Pathirathna, S., Nelson, M.T., Mancuso, S., Joksovic, P.M., Rosenberg, E.R., Bayliss, D.A., Jevtovic-Todorovic, V., and Todorovic, S.M. (2007). Cell-Specific Alterations of T-Type Calcium Current in Painful Diabetic Neuropathy Enhance Excitability of Sensory Neurons. *J. Neurosci.* 27, 330563316.
- Jagodic, M.M., Pathirathna, S., Joksovic, P.M., Lee, W., Nelson, M.T., Naik, A.K., Su, P., Jevtovic-todorovic, V., Todorovic, S.M., Ak, N., et al. (2008). Upregulation of the T-Type Calcium Current in Small Rat Sensory Neurons After Chronic Constrictive Injury of the Sciatic Nerve. *J. Neurophysiol.* 315163156.
- Jahnsen, B.Y.H., and Llinas, R. (1984). Ionic basis for the electroresponsiveness and oscillatory properties of guinea-pig thalamic neurones in vitro. *J. Physiol.* 2276247.
- Jeanmonod, D., Magnin, M., and Morel, A. (1996). Low-threshold calcium spike bursts in the human thalamus. Common physiopathology for sensory, motor and limbic positive symptoms. *Brain* 119, 3636375.
- Jensen, T.S., Baron, R., Haanpää, M., Kalso, E., Loeser, J.D., Rice, A.S.C., and Treede, R.D. (2011). A new definition of neuropathic pain. *Pain* 152, 220462205.
- Ji, R., Samad, T.A., Jin, S., Schmoll, R., and Woolf, C.J. (2002). p38 MAPK Activation by NGF in Primary Sensory Neurons after Inflammation Increases TRPV1 Levels and Maintains Heat Hyperalgesia. *Neuron* 36, 57668.
- Jiang, P., Kong, Y., Zhang, X.B., Wang, W., Liu, C.F., and Xu, T. Le (2009). Glycine receptor in rat hippocampal and spinal cord neurons as a molecular target for rapid actions of 17- $\beta$ -estradiol. *Mol. Pain* 5, 1614.
- Jones, E.G. (1985). The Epithalamus. *The Thalamus* 7356757.
- Julius, D., and Basbaum, A.I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 2036210.
- Kampa, B.M., Letzkus, J.J., and Stuart, G.J. (2006). Cortical feed-forward networks for binding different streams of sensory information. *Nat. Neurosci.* 9, 147261473.
- Kanaseki, T., and Sprague, J.M. (1974). Anatomical organization of pretectal nuclei and tectal

## BIBLIOGRAPHIE

---

laminae in the cat. *J. Comp. Neurol.* 158, 3196337.

Kang, X.J., Chi, Y.N., Chen, W., Liu, F.Y., Cui, S., Liao, F.F., Cai, J., and Wan, Y. (2018). Increased expression of CaV3.2 T-type calcium channels in damaged DRG neurons contributes to neuropathic pain in rats with spared nerve injury. *Mol. Pain* 14, 1611.

Kanyshkova, T., Pawlowski, M., Meuth, P., Dube, C., Bender, R.A., Brewster, A.L., Baumann, A., Baram, T.Z., Pape, H.-C., and Budde, T. (2009). Postnatal Expression Pattern of HCN Channel Isoforms in Thalamic Neurons: Relationship to Maturation of Thalamocortical Oscillations. *J. Neurosci.* 29, 884768857.

Kasai, H., Aosaki, T., and Fukuda, J. (1987). Presynaptic Ca-antagonist  $\omega$ -conotoxin irreversibly blocks N-type Ca-channels in chick sensory neurons. *Neurosci. Res.* 4, 2286235.

Kenshalo, D.R.J., Chudler, E.H., Anton, F., and Dubner, R. (1988). SI nociceptive neurons participate in the encoding process by which monkeys perceive the intensity of noxious thermal stimulation. *Brain Res.* 454, 3786382.

Kerckhove, N., Mallet, C., François, A., Boudes, M., Chemin, J., Voets, T., Bourinet, E., Alloui, A., and Eschalier, A. (2014). Cav3.2 calcium channels: The key protagonist in the supraspinal effect of paracetamol. *Pain* 155, 7646772.

Khakpay, R., Azaddar, M., and Khakpai, F. (2016). The antinociceptive effect of 17  $\beta$ -estradiol in the nucleus paragigantocellularis lateralis of male rats may be mediated by the NMDA receptors. *Physiol. Pharmacol.* 20, 1226129.

Khakpay, R., Azaddar, M., Khakpay, F., and Nemati, H.H. (2017). Analgesic effect of 17  $\beta$ -estradiol on nucleus paragigantocellularis lateralis of male rats mediated Via GABAA receptors. *Basic Clin. Neurosci.* 8, 51660.

Kim, D. (2003). Thalamic Control of Visceral Nociception Mediated by T-Type  $Ca^{2+}$  Channels. *Science* (80- ). 302, 1176119.

Kitao, Y., and Nakamura, Y. (1987). An ultrastructural analysis of afferent terminals to the Anterior Pretectal nucleus in the cat. *J. Comp. Neurol.* 259, 3486363.

Kitao, Y., Nakamura, Y., Kudo, M., and Moriizumi, T. (1989). The cerebral and cerebellar connections of pretecto-thalamic and pretecto-olivary neurons in the anterior pretectal nucleus of the cat. *Brain Res.* 484, 3046313.

Klaus, A., Planert, H., Hjorth, J.J.J., Berke, J.D., Silberberg, G., and Kotaleski, J.H. (2011). Striatal Fast-Spiking Interneurons: From Firing Patterns to Postsynaptic Impact. *Front. Syst. Neurosci.* 5, 1617.

Klößner, U., Lee, J.-H., Cribbs, L.L., Daud, A., Hescheler, J., Pereverzev, A., Perez-Reyes, E., and Schneider, T. (1999). Comparison of the  $Ca^{2+}$  currents induced by expression of three cloned  $\alpha_1$  subunits,  $1G$ ,  $1H$  and  $1I$ , of low-voltage-activated T-type  $Ca^{2+}$  channels. *Eur. J. Neurosci.* 11, 417164178.

Kovács, K., Sík, A., Ricketts, C., and Timofeev, I. (2010). Subcellular distribution of low-voltage activated T-type  $Ca^{2+}$  channel subunits (Cav3.1 and Cav3.3) in reticular thalamic neurons of the cat. *J. Neurosci. Res.* 88, 4486460.

Kozlov, A.S., McKenna, F., Lee, J.H., Cribbs, L.L., Perez-Reyes, E., Feltz, A., and Lambert, R.C. (1999). Distinct kinetics of cloned T-type  $Ca^{2+}$  channels lead to differential  $Ca^{2+}$  entry and frequency-dependence during mock action potentials. *Eur. J. Neurosci.* 11, 414964158.

Kuhlenbeck, H., and Miller, R.N. (1949). The pretectal region of the human brain. *J. Comp.*

Neurol.

- Lallemend, F., and Ernfors, P. (2012). Molecular interactions underlying the specification of sensory neurons. *Trends Neurosci.* *35*, 3736381.
- Lambert, R.C., Bessaih, T., Crunelli, V., and Leresche, N. (2014). The many faces of T-type calcium channels. *Pflugers Arch.* *466*, 4156423.
- Latremoliere, A., and Woolf, C. (2010). Central Sensitization: a generator of pain hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *J Pain* *10*, 8956926.
- Lavallee, P., Urbain, N., Dufresne, C., Bokor, H., and Acs (2005). Feedforward Inhibitory Control of Sensory Information in Higher-Order Thalamic Nuclei. *J. Neurosci.* *25*, 748967498.
- Lee, J.H., Daud, A.N., Cribbs, L.L., Lacerda, A.E., Pereverzev, A., Klöckner, U., Schneider, T., and Perez-Reyes, E. (1999). Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J. Neurosci.* *19*, 191261921.
- Lefaucheur, J.P., Drouot, X., Ménard-Lefaucheur, I., Keravel, Y., and Nguyen, J.P. (2006). Motor cortex rTMS restores defective intracortical inhibition in chronic neuropathic pain. *Neurology* *67*, 1568 LP 6 1574.
- Legrain, V., Iannetti, G.D., Plaghki, L., and Mouraux, A. (2011). The pain matrix reloaded: A salience detection system for the body. *Prog. Neurobiol.* *93*, 1116124.
- Lenz, F.A., Kwan, H.C., Dostrovsky, J.O., and Tasker, R.R. (1989). Characteristics of the bursting pattern of action potentials that occurs in the thalamus of patients with central pain. *Brain Res.* *496*, 3576360.
- Leresche, N. (2004). Paradoxical Potentiation of Neuronal T-Type Ca<sup>2+</sup> Current by ATP at Resting Membrane Potential. *J. Neurosci.* *24*, 559265602.
- Lewis, T., and Pochin, E.E. (1937). The double pain response of the human skin to a single stimulus. *Clin. Sci.*
- Liao, Y.-F., Tsai, M.-L., Chen, C.-C., and Yen, C.-T. (2011). Involvement of the Cav3.2 T-type calcium channel in thalamic neuron discharge patterns. *Mol. Pain* *7*, 43.
- Liu, J.H., Bijlenga, P., Occhiodoro, T., Fischer-Lougheed, J., Bader, C.R., and Bernheim, L. (1999). Mibefradil (Ro 40-5967) inhibits several Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> currents in human fusion-competent myoblasts. *Br. J. Pharmacol.* *126*, 2456250.
- Liu, X.-B., Murray, K.D., and Jones, E.G. (2011). Low-threshold calcium channel subunit Cav3.3 is specifically localized in GABAergic neurons of rodent thalamus and cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* *519*, 118161195.
- Liu, Y., Latremoliere, A., Li, X., Zhang, Z., Chen, M., Wang, X., Fang, C., Zhu, J., Alexandre, C., Gao, Z., et al. (2018). Touch and tactile neuropathic pain sensitivity are set by corticospinal projections. *Nature* *561*, 5476550.
- Llinas, B.Y.R., and Yarom, Y. (1981). Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones in vitro. Different types of voltage-dependent ionic conductances. *J. Physiol.* *549* 6 567.
- Llinás, R.R., Ribary, U., Jeanmonod, D., Kronberg, E., and Mitra, P.P. (1999). Thalamocortical dysrhythmia: A neurological and neuropsychiatric syndrome characterized by magnetoencephalography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 15222615227.
- Lolignier, S., Eijkelkamp, N., and Wood, J.N. (2014). Mechanical allodynia. *Pflugers Arch.*

Eur. J. Physiol. *467*, 1336139.

Lund, R., and Webster, K. (1967). Thalamic Afferents from the Spinal Cord and Trigeminal Nuclei. An Experimental Anatomical Study in the Rat. *J Comp Neurol*.

Luo, L., Chang, L., Brown, S.M., Ao, H., Lee, D.H., Higuera, E.S., Dubin, A.E., and Chaplan, S.R. (2007). Role of peripheral hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated channel pacemaker channels in acute and chronic pain models in the rat. *Neuroscience* *144*, 147761485.

Ma, Y., Hu, H., Berrebi, A.S., Mathers, P.H., and Agmon, A. (2006). Distinct Subtypes of Somatostatin-Containing Neocortical Interneurons Revealed in Transgenic Mice. *J. Neurosci.* *26*, 506965082.

Maeda, Y., Aoki, Y., Sekiguchi, F., Matsunami, M., Takahashi, T., Nishikawa, H., and Kawabata, A. (2009). Hyperalgesia induced by spinal and peripheral hydrogen sulfide: Evidence for involvement of Cav3.2 T-type calcium channels. *Pain* *142*, 1276132.

Magee, J.C., and Johnston, D. (1995). Synaptic Activation of Voltage-Gated Channels in the Dendrites of Hippocampal Pyramidal Neurons. *Science* (80-. ). *268*, 3016304.

Magee, J.C., and Johnston, D. (1997). A Synaptically Controlled, Associative Signal for Hebbian Plasticity in Hippocampal Neurons. *Science* (80-. ). *275*, 2096213.

Mahieux, G., and Benabid, A.L. (1986). Naloxone-reversible analgesia as a result of stimulation of the habenula in the rat. *Neurochirurgie* *32*, 3606364.

Malenka, R.C., and Bear, M.F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* *44*, 5621.

Mamede Rosa, M.L.N., and Prado, W.A. (1997). Antinociception induced by opioid or 5-HT agonists microinjected into the anterior pretectal nucleus of the rat. *Brain Res.* *757*, 1336138.

Mamede Rosa, M.L.N., Oliveira, M.A., Valente, R.B., Coimbra, N.C., and Prado, W.A. (1998). Pharmacological and neuroanatomical evidence for the involvement of the anterior pretectal nucleus in the antinociception induced by stimulation of the dorsal raphe nucleus in rats. *Pain* *74*, 1716179.

Maniezzi, C., Talpo, F., Spaiardi, P., Toselli, M., and Biella, G. (2019). Oxytocin Increases Phasic and Tonic GABAergic Transmission in CA1 Region of Mouse Hippocampus. *Front. Cell. Neurosci.* *13*, 1617.

Mannion, R.J., Doubell, T.P., Coggeshall, R.E., and Woolf, C.J. (1996). Collateral sprouting of uninjured primary afferent A-fibers into the superficial dorsal horn of the adult rat spinal cord after topical capsaicin treatment to the sciatic nerve. *J. Neurosci.* *16*, 518965195.

Mao, T., Kusefoglou, D., Hooks, B.M., Huber, D., Petreanu, L., and Svoboda, K. (2011). Long-Range Neuronal Circuits Underlying the Interaction between Sensory and Motor Cortex. *Neuron* *72*, 1116123.

Marger, F., Gelot, A., Alloui, A., Matricon, J., and Sanguesa, J.F. (2011). T-type calcium channels contribute to colonic hypersensitivity in a rat model of irritable bowel syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

Markram, H., and Sakmann, B. (1994). Calcium transients in dendrites of neocortical neurons evoked by single subthreshold excitatory postsynaptic potentials via low-voltage-activated calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 520765211.

Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., and Wu, C. (2004).

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 7936807.
- Masri, R., Quilton, R.L., Lucas, J.M., Murray, P.D., Thompson, S.M., and Keller, A. (2009). Zona incerta: a role in central pain. *J. Neurophysiol.* 102, 1816191.
- Matschke, L., Bertoune, M., Roeper, J., Snutch, T., H Oertel, W., Rinné, S., and Decher, N. (2015). A concerted action of L- and T-type Ca<sup>2+</sup> channels regulates locus coeruleus pacemaking. *Mol. Cell. Neurosci.* 68.
- Matschke, L.A., Rinné, S., Snutch, T.P., Oertel, W.H., Dolga, A.M., and Decher, N. (2018). Calcium-activated SK potassium channels are key modulators of the pacemaker frequency in locus coeruleus neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 88, 3306341.
- Matthews, E. a, and Dickenson, a H. (2001). Effects of ethosuximide, a T-type Ca(2+) channel blocker, on dorsal horn neuronal responses in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 415, 1416149.
- May, P.J., Sun, W., and Hall, W.C. (1997). Reciprocal Connections Between the Zona Incerta and the Pretectum and superior colliculus of the cat. *Neuroscience* 77, 109161114.
- Mayer, D.J., and Liebeskind, J.C. (1974). Pain Reduction By Focal Electrical Stimulation of the Brain : an Anatomical and Behavioral Analysis. *Brain Res.* 68, 73693.
- Mayer, D.J., Wolfle, T.L., Akil, H., Carder, B., and Liebeskind, J.C. (1971). Analgesia from Electrical Stimulation in the Brainstem of the Rat. *Science* (80-. ). 135161354.
- McKay, B.E., McRory, J.E., Molineux, M.L., Hamid, J., Snutch, T.P., Zamponi, G.W., and Turner, R.W. (2006). CaV3 T-type calcium channel isoforms differentially distribute to somatic and dendritic compartments in rat central neurons. *Eur. J. Neurosci.* 24, 258162594.
- McRory, J.E., Santi, C.M., Hamming, K.S.C., Mezeyova, J., Sutton, K.G., Baillie, D.L., Stea, A., and Snutch, T.P. (2001). Molecular and Functional Characterization of a Family of Rat Brain T-type Calcium Channels. 276, 399964011.
- Meisner, J.G., Marsh, A.D., and Marsh, D.R. (2010). Loss of GABAergic Interneurons in Laminae I ó III of the Spinal Cord Dorsal Horn Contributes to Reduced GABAergic Tone and Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury. *J. Neurotrauma* 737, 7296737.
- Melzack, C. (1968). Sensory, motivational and central control determinants of chronic pain: a new conceptual model. *Ski. Senses.*
- Messinger, R.B., Naik, A.K., Jagodic, M.M., Nelson, M.T., Yong, W., Choe, W.J., Orestes, P., Latham, J.R., Slobodan, M., and Jevtovic-todorovic, V. (2010). In vivo silencing of CaV3.2 T-type channels in sensory neurons alleviates hyperalgesia in rats with streptozocin-induced diabetic neuropathy. *Pain* 145, 1846195.
- Miesenböck, G., De Angelis, D. a, and Rothman, J.E. (1998). Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394, 1926195.
- Millan, M.J. (2002). Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* 66, 3556474.
- Mintz, I.M., Venemat, V.J., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Bean, B.P., and Adamst, M.E. (1992). P-type calcium chanel blocked by the spider toxin w-Aga-IVA. *Nature* 355, 8276829.
- Monteil, A., Chemin, J., Bourinet, E., Mennessier, G., Lory, P., and Nargeot, J. (2000). Molecular and functional properties of the human (1G) subunit that forms T-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* 275, 609066100.
- Mouraux, A., Diukova, A., Lee, M.C., Wise, R.G., and Iannetti, G.D. (2011). A multisensory investigation of the functional significance of the öpain matrix.ö *Neuroimage* 54, 223762249.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Mulle, C., Madariaga, A., and Deschenes, M. (1986). Morphology and electrophysiological properties of reticularis thalami neurons in cat: in vivo study of a thalamic pacemaker. *J. Neurosci.* 6, 213462145.
- Murray, P.D., Masri, R., and Keller, A. (2010). Abnormal anterior pretectal nucleus activity contributes to central pain syndrome. *J. Neurophysiol.* 103, 304463053.
- Na, H.S., Choi, S., Kim, J., Park, J., and Shin, H. (2008). Attenuated Neuropathic Pain in Ca<sub>v</sub>3.1 Null Mice. *Mol. Cells* 25, 2426246.
- Nam, G. (2018). T-type calcium channel blockers: a patent review (201262018). *Expert Opin. Ther. Pat.* 28, 8836901.
- Nazarian, A., Tenayuca, J.M., Almasarweh, F., Armendariz, A., and Are, D. (2014). Sex differences in formalin-evoked primary afferent release of substance P. *Eur. J. Pain* 18, 39646.
- Nelson, M.T., Woo, J., Kang, H.-W., Vitko, I., Barrett, P.Q., Perez-Reyes, E., Lee, J.-H., Shin, H.-S., and Todorovic, S.M. (2007). Reducing Agents Sensitize C-Type Nociceptors by Relieving High-Affinity Zinc Inhibition of T-Type Calcium Channels. *J. Neurosci.* 27, 825068260.
- Nilius, B., Prenen, J., Kamouchi, M., Viana, F., Voets, T., and Droogmans, G. (1997). Inhibition by mibefradil, a novel calcium channel antagonist, of Ca<sup>2+</sup>- and volume-activated Cl<sup>-</sup> channels in macrovascular endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 121, 5476555.
- Nolano, M., Simone, D.A., Wendelschafer-Crabb, G., Johnson, T., Hazen, E., and Kennedy, W.R. (1999). Topical capsaicin in humans: parallel loss of epidermal nerve fibers and pain sensation. *Pain* 81.
- Nowycky, M.C., Fox, A.P., and Tsien, R.W. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316, 4406443.
- Okubo, K., Matsumura, M., Kawaishi, Y., Aoki, Y., Matsunami, M., Okawa, Y., Sekiguchi, F., and Kawabata, A. (1997). Hydrogen sulfide-induced mechanical hyperalgesia and allodynia require activation of both Cav3.2 and TRPA1 channels in mice. *Br. J. Pharmacol.* 166, 173861743.
- Olds, M., and Olds, J. (1963). Approach-avoidance Analysis of Rat Diencephalon. *J Comp Neurol.*
- Oleson, T.D., Kirkpatrick, D.B., and Goodman, S.J. (1980). Elevation of pain threshold to tooth shock by brain stimulation in primates. *194*, 79695.
- Onodera, S., and Hicks, T.P. (1995). Patterns of Transmitter Labelling and Connectivity of the Cat  $\delta$ s Nucleus of Darkschewitsch: A Wheat Germ Agglutinin-Horseradish Peroxidase and Immunocytochemical Study at Light and Electron Microscopical Levels. *J Comp Neurol* 573.
- Pan, Z.H., Hu, H.J., Perring, P., and Andrade, R. (2001). T-type Ca<sup>2+</sup> channels mediate neurotransmitter release in retinal bipolar cells. *Neuron* 32, 89698.
- Parajuli, L.K., Fukazawa, Y., Watanabe, M., and Shigemoto, R. (2010). Subcellular distribution of  $\alpha$ 1G subunit of T-type calcium channel in the mouse dorsal lateral geniculate nucleus. *J. Comp. Neurol.* 518, 436264374.
- Parikh, D., Hamid, A., Friedman, T.C., Nguyen, K., Tseng, A., Marquez, P., and Lutfy, K. (2013). Stress-induced analgesia and endogenous opioid peptides: the importance of stress

## BIBLIOGRAPHIE

---

- duration. *Eur. J. Pharmacol.* *185*, 9746981.
- Park, A., Uddin, O., Li, Y., Masri, R., and Keller, A. (2018). Pain After Spinal Cord Injury Is Associated With Abnormal Presynaptic Inhibition in the Posterior Nucleus of the Thalamus. *J. Pain* *19*, 727.e1-727.e15.
- Paxinos, G., and Franklin, K. (2012). Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.
- Peirs, C., and Seal, R.P. (2016). Neural circuits for pain: Recent advances and current perspectives. *Science*.
- Pellegrini, C., Lecci, S., Lüthi, A., and Astori, S. (2016). Suppression of Sleep Spindle Rhythmogenesis in Mice with Deletion of CaV3.2 and CaV3.3 T-type Ca(2+) Channels. *Sleep* *39*, 8756885.
- Perez-Reyes, E. (1999). Three for T: Molecular analysis of the low voltage-activated calcium channel family. *Cell. Mol. Life Sci.* *56*, 6606669.
- Perez-Reyes, E. (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol. Rev.* *83*, 1176161.
- Perez-Reyes, E. (2006). Molecular characterization of T-type calcium channels. *Cell Calcium* *40*, 89696.
- Perl, E.R. (2007). Ideas about pain, a historical view. *Nat. Rev. Neurosci.* *8*, 71680.
- Perl, E.R., and Whitlock, D.G. (1961). Somatic Stimuli Thalamic Exciting Neurons Spinothalamic in Cat and Projections Monkey to These. *Exp. Neurol.* *296*, 2566296.
- Petitjean, H., Pawlowski, S.A., Fraine, S.L., Sharif, B., Hamad, D., Fatima, T., Berg, J., Brown, C.M., Jan, L.Y., Ribeiro-da-Silva, A., et al. (2015). Dorsal Horn Parvalbumin Neurons Are Gate-Keepers of Touch-Evoked Pain after Nerve Injury. *Cell Rep.* *13*, 124661257.
- Pigeat, R., Chausson, P., Dreyfus, F.M., Leresche, X., Re, X., and Lambert, C. (2015). Sleep Slow Wave-Related Homo and Heterosynaptic LTD of Intrathalamic GABA Aergic Synapses: Involvement of T-Type Ca<sup>2+</sup> Channels and Metabotropic Glutamate Receptors. *J. Neurosci.* *35*, 64673.
- Pinault, D., and Deschênes, M. (1998). Projection and innervation patterns of individual thalamic reticular axons in the thalamus of the adult rat: A three-dimensional, graphic, and morphometric analysis. *J. Comp. Neurol.* *391*, 1806203.
- Plummer, M.R., Logothetis, D.E., and Hess, P. (1989). Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron* *2*, 145361463.
- Porro, C.A., Cavazzuti, M., Galetti, A., Sassatelli, L., and Barbieri, G.C. (1991). Functional activity mapping of the rat spinal cord during formalin-induced noxious stimulation. *Neuroscience* *41*, 6556665.
- Povysheva, N. V., Zaitsev, A. V., Rotaru, D.C., Gonzalez-Burgos, G., Lewis, D.A., and Krimer, L.S. (2008). Parvalbumin-positive basket interneurons in monkey and rat prefrontal cortex. *J. Neurophysiol.* *100*, 234862360.
- Prado, W.A. (1989). Antinociceptive effect of agonists microinjected into the anterior pretectal nucleus of the rat. *Brain Res.* *493*, 1476154.
- Prado, W.A., and Faganello, F.A. (2000). The anterior pretectal nucleus participates as a relay

## BIBLIOGRAPHIE

---

- station in the glutamate-, but not morphine-induced antinociception from the dorsal raphe nucleus in rats. *Pain* 88, 1696176.
- Prado, W.A., and Roberts, M.H.T. (1985). An assessment of the antinociceptive and aversive effects of stimulating identified sites in the rat brain. *Brain Res.* 340, 2196228.
- Prieto, G.J., Cannon, J.T., and Liebeskind, J.C. (1983). N. raphe magnus lesions disrupt stimulation-produced analgesia from ventral but not dorsal midbrain areas in the rat. *Brain Res.* 261, 53657.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., LaMantia, A.-S., McNamara, J.O., and Williams, M.S. (2004). *Neuroscience: Third Edition*.
- Quiquempoix, M., Fayad, S.L., Boutourlinsky, K., Leresche, N., Lambert, R.C., and Bessaih, T. (2018). Layer 2/3 Pyramidal Neurons Control the Gain of Cortical Output. *Cell Rep.* 24, 2799-2807.e4.
- Randall, A.D., and Tsien, R.W. (1997). Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels. *Neuropharmacology* 36, 8796893.
- Rasmussen, P.V., Sindrup, S.H., Jensen, T.S., and Bach, F.W. (2004). Symptoms and signs in patients with suspected neuropathic pain. *Pain* 110, 4616469.
- Rees, B.Y.H., and Roberts, M.H.T. (1989). Activation of Cells in the Anterior Pretectal Nucleus by Dorsal Column Stimulation in the Rat. *J. Physiol.* 3616373.
- Rees, H., and Roberts, M.H. (1987). Anterior pretecal stimulation alters the responses of spinal dorsal horn neurones to cutaneous stimulation in the rat. *J Physiol* 385, 4156436.
- Rees, H., and Roberts, M.H.T. (1993). The anterior pretecal nucleus: a proposed role in sensory processing. *Pain* 53, 1216135.
- Rees, H., Terenzi, M.G., and Roberts, M.H. (1995). Anterior pretecal nucleus facilitation of superficial dorsal horn neurones and modulation of deafferentation pain in the rat. *J. Physiol.* 489, 1596169.
- Reis, G.M., Rossaneis, A.C., Silveira, J.W.S., Dias, Q.M., and Prado, W.A. (2011). Stimulation-produced Analgesia from the occipital or retrosplenial cortex of rats involves serotonergic and opioid mechanisms in the anterior pretecal nucleus. *J. Pain* 12, 5236530.
- Rexed, B. (1952). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 11, 1116112.
- Reynolds, D. V (1969). Surgery in the Rat during Electrical Analgesia Induced by Focal Brain Stimulation. *Science* (80-. ). 164, 768.
- Rhodes, D.L., and Liebeskind, J.C. (1978). Analgesia from rostral brain stem stimulation in the rat. *Brain Res.* 143, 5216532.
- Roberts, M.H.T., and Rees, H. (1986). The antinociceptive effects of stimulating the pretecal nucleus of the rat. *Pain* 25, 83693.
- Robertson, R.T. (1983). Efferents of the pretecal complex: separate populations of neurons project to lateral thalamus and to inferior olive. *Brain Res.* 258, 91695.
- Rosen, S., Ham, B., and Mogil, J.S. (2017). Sex differences in neuroimmunity and pain. *J. Neurosci. Res.* 95, 5006508.
- Rossaneis, A.C., and Prado, W.A. (2015). The ventral portion of the anterior pretecal nucleus controls descending mechanisms that initiate neuropathic pain in rats. *Clin. Exp. Pharmacol.*

Physiol. 42, 7046710.

Rossaneis, A.C., Genaro, K., Dias, Q.M., Guethe, L.M., Fais, R.S., Del Bel, E.A., and Prado, W.A. (2015). Descending mechanisms activated by the anterior pretectal nucleus initiate but do not maintain neuropathic pain in rats. *Eur. J. Pain* 19, 114861157.

Sandkühler, J., and Gebhart, G.F. (1984a). Relative contributions of the nucleus raphe magnus and adjacent medullary reticular formation to the inhibition by stimulation in the periaqueductal gray of a spinal nociceptive reflex in the pentobarbital-anesthetized rat. *Brain Res.* 305, 77687.

Sandkühler, J., and Gebhart, G.F. (1984b). Characterization of inhibition of a spinal nociceptive reflex by stimulation medially and laterally in the midbrain and medulla in the pentobarbital-anesthetized rat. *Brain Res.* 305, 67676.

Santello, M., and Nevian, T. (2015). Dysfunction of cortical dendritic integration in neuropathic pain reversed by serotonergic neuromodulation. *Neuron* 86, 2336246.

Sarnthein, J., and Jeanmonod, D. (2008). High thalamocortical theta coherence in patients with neurogenic pain. *Neuroimage* 39, 191061917.

Sarnthein, J., Stern, J., Aufenberg, C., Rousson, V., and Jeanmonod, D. (2006). Increased EEG power and slowed dominant frequency in patients with neurogenic pain. *Brain* 129, 556 64.

Scalia, F. (1972). The termination of retinal axons in the pretectal region of mammals. *J. Comp. Neurol.* 145, 2236257.

Scalia, F., and Arango, V. (1979). Topographic Organization of the Projections of the Retina to the Pretectal Region in the Rat. *J Comp Neurol* 186, 2716292.

Schuler, V., Luscher, C., Blanchet, C., Klix, N., Sansig, G., Klebs, K., Schmutz, M., Heid, J., Gentry, C., Urban, L., et al. (2001). Epilepsy, Hyperalgesia, Impaired Memory, and Loss of Pre- and Postsynaptic GABA B Responses in Mice Lacking GABA B (1). *Neuron* 31, 476 58.

Sciamanna, G., and Wilson, C.J. (2011). The ionic mechanism of gamma resonance in rat striatal fast-spiking neurons. *J. Neurophysiol.* 106, 293662949.

Seal, R.P., Wang, X., Guan, Y., Raja, S.N., Woodbury, C.J., Basbaum, A.I., and Edwards, R.H. (2009). Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature* 462, 6516655.

Segal, M., and Sandberg, D. (1977). Analgesia produced by electrical stimulation of catecholamine nuclei in the rat brain. *Brain Res.* 123, 3696372.

Sellmeijer, J., Mathis, V., Hugel, S., Li, X., Song, Q., Chen, Q., Barthas, F., Lutz, X.P., Karatas, X.M., Luthi, A., et al. (2018). Hyperactivity of Anterior Cingulate Cortex Areas 24a / 24b Drives Chronic Pain-Induced Anxiodepressive-like Consequences. *J. Neurosci.* 38, 31026 3115.

Serra, J., Duan, W.R., Locke, C., Solà, R., Liu, W., and Nothaft, W. (2015). Effects of a T-type calcium channel blocker, ABT-639, on spontaneous activity in C-nociceptors in patients with painful diabetic neuropathy: a randomized controlled trial. *Pain* 156.

Van Seventer, R., Bach, F.W., Toth, C.C., Serpell, M., Temple, J., Murphy, T.K., and Nimour, M. (2010). Pregabalin in the treatment of post-traumatic peripheral neuropathic pain: a randomized double-blind trial. *Eur. J. Neurol.* 17, 108261089.

- Shen, F., Chen, Z., Zhong, W., Ma, L., Chen, C., Yang, Z., Xie, W., and Wang, Y. (2015). Alleviation of neuropathic pain by regulating T-type calcium channels in rat anterior cingulate cortex. *Mol. Pain* 1610.
- Shields, S.D., Eckert III, W.A., and Basbaum, A.I. (2003). Spared nerve injury model of neuropathic pain in the mouse: a behavioral and anatomic analysis. *J. Pain* 4, 4656470.
- Shipe, W.D., Barrow, J.C., Yang, Z.-Q., Lindsley, C.W., Yang, F.V., Schlegel, K.-A.S., Shu, Y., Rittle, K.E., Bock, M.G., Hartman, G.D., et al. (2008). Design, Synthesis, and Evaluation of a Novel 4-Aminomethyl-4-fluoropiperidine as a T-Type Ca<sup>2+</sup> Channel Antagonist. *J. Med. Chem.* 51, 369263695.
- Silva, M.L., Silva, J.R.T., and Prado, W.A. (2010). The integrity of the anterior pretectal nucleus and dorsolateral funiculus is necessary for electroacupuncture-induced analgesia in the rat tail-flick test. *Eur. J. Pain* 14, 2496254.
- Snutch, T.P., Leonard, J.P., Gilbert, M.M., Lester, H.A., and Davidson, N. (1990). Rat brain expresses a heterogeneous family of calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 339163395.
- Song, C., Xu, X. Bin, He, Y., Liu, Z.P., Wang, M., Zhang, X., Li, B.M., and Pan, B.X. (2013). Stuttering Interneurons Generate Fast and Robust Inhibition onto Projection Neurons with Low Capacity of Short Term Modulation in Mouse Lateral Amygdala. *PLoS One* 8.
- Sonohata, M., Furue, H., Katafuchi, T., Yasaka, T., Doi, A., Kumamoto, E., and Yoshimura, M. (2003). Actions of noradrenaline on substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord revealed by in vivo patch recording. *6*, 5156526.
- Sorge, R.E., Mapplebeck, J.C.S., Rosen, S., Beggs, S., Taves, S., Alexander, J.K., Martin, L.J., Austin, J.-S., Sotocinal, S.G., Chen, D., et al. (2015). Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nat. Neurosci.* 18, 1081.
- Sosulina, L., Graebenitz, S., and Pape, H.-C. (2010). GABAergic Interneurons in the Mouse Lateral Amygdala: A Classification Study. *J. Neurophysiol.* 104, 6176626.
- Steriade, M. (2004). Neocortical cell classes are flexible entities. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 1216 134.
- Stern, J., Jeanmonod, D., and Sarnthein, J. (2006). Persistent EEG overactivation in the cortical pain matrix of neurogenic pain patients. *Neuroimage* 31, 7216731.
- Sumser, A., Mease, R.A., Sakmann, B., and Groh, A. (2017). Organization and somatopy of corticothalamic projections from L5B in mouse barrel cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 885368858.
- Takahashi, T., Aoki, Y., Okubo, K., Maeda, Y., Sekiguchi, F., Mitani, K., Nishikawa, H., and Kawabata, A. (2010). Upregulation of Cav3.2 T-type calcium channels targeted by endogenous hydrogen sulfide contributes to maintenance of neuropathic pain. *Pain* 150, 1836 191.
- Talavera, K., and Nilius, B. (2006). Biophysics and structure-function relationship of T-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Cell Calcium* 40, 976114.
- Talley, E.M., Cribbs, L.L., Lee, J.H., Daud, A., Perez-Reyes, E., and Bayliss, D. a (1999). Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J. Neurosci.* 19, 189561911.
- Tang, A.-H., Karson, M.A., Nagode, D.A., McIntosh, J.M., Uebele, V.N., Renger, J.J., Klugmann, M., Milner, T.A., and Alger, B.E. (2011). Nerve Terminal Nicotinic Acetylcholine

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Receptors Initiate Quantal GABA Release from Perisomatic Interneurons by Activating Axonal T-Type (Cav3) Ca<sup>2+</sup> Channels and Ca<sup>2+</sup> Release from Stores. *J. Neurosci.* *31*, 13546613561.
- Terenzi, M.G., Guimarães, F.S., and Prado, W.A. (1990). Antinociception induced by stimulation of the habenular complex of the rat. *Brain Res.* *524*, 2136218.
- Terenzi, M.G., Rees, H., Morgan, S.J., Foster, G.A., and Roberts, M.H. (1991). The antinociception evoked by anterior pretectal nucleus stimulation is partially dependent upon ventrolateral medullary neurones. *Pain* *47*, 2316239.
- Terenzi, M.G., Rees, H., and Roberts, M.H.T. (1992). The pontine parabrachial region mediates some of the descending inhibitory effects of stimulating the anterior pretectal nucleus. *Brain Res.* *594*, 2056214.
- Terenzi, M.G., Zagon, A., and Roberts, M.H.T. (1995). Efferent connections from the anterior pretectal nucleus to the diencephalon and mesencephalon in the rat. *Brain Res.* *701*, 1836191.
- Todd, A.J. (2010). Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat. Rev. Neurosci.* *11*, 8236836.
- Todorovic, S., Meyenburg, A., and Jevtovic-Todorovic, V. (2002). Mechanical and thermal antinociception in rats following systemic administration of mibefradil, a T-type calcium channel blocker. *Brain Res.* *951*, 3366340.
- Todorovic, S.M., Jevtovic-todorovic, V., Meyenburg, A., Mennerick, S., Perez-reyes, E., Romano, C., Olney, J.W., Zorumski, C.F., and Louis, S. (2001). Redox Modulation of T-Type Calcium Channels in Rat Peripheral Nociceptors. *Neuron* *31*, 75685.
- Toledo-Rodriguez, M., Blumenfeld, B., Wu, C., Luo, J., Attali, B., Goodman, P., and Markram, H. (2004). Correlation maps allow neuronal electrical properties to be predicted from single-cell gene expression profiles in rat neocortex. *Cereb. Cortex* *14*, 131061327.
- Trageser, J.C., and Keller, a (2004). Reducing the Uncertainty: Gating of Peripheral Inputs by Zona Incerta. *J. Neurosci.* *24*, 891168915.
- Trageser, J.C., Burke, K. a, Masri, R., Li, Y., Sellers, L., and Keller, A. (2006). State-dependent gating of sensory inputs by zona incerta. *J. Neurophysiol.* *96*, 145661463.
- Treede, R.D., Kenshalo, D.R., Gracely, R.H., and Jones, A.K.P. (1999). The cortical representation of pain. *Pain* *79*, 1056111.
- Treede, R.D., Jensen, T.S., Campbell, J.N., Cruccu, G., Dostrovsky, J.O., Griffin, J.W., Hansson, P., Hughes, R., Nurmikko, T., and Serra, J. (2008). Neuropathic pain: Redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology* *70*, 163061635.
- Tscherter, A., David, F., Ivanova, T., Deleuze, C., Renger, J.J., Uebele, V.N., Shin, H.S., Bal, T., Leresche, N., and Lambert, R.C. (2011). Minimal alterations in T-type calcium channel gating markedly modify physiological firing dynamics. *J. Physiol.* *589*, 170761724.
- Ueda, H. (2006). Molecular mechanisms of neuropathic pain-phenotypic switch and initiation mechanisms. *Pharmacol. Ther.* *109*, 57677.
- Usoskin, D., Furlan, A., Islam, S., Abdo, H., Lönnnerberg, P., Lou, D., Hjerling-leffler, J., Haeggström, J., Kharchenko, O., Kharchenko, P. V, et al. (2014). Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nat. Neurosci.* *18*, 1456153.
- Vartiainen, N., Perchet, C., Magnin, M., Creac'h, C., Convers, P., Nighoghossian, N., Mauguière, F., Peyron, R., and Garcia-Larrea, L. (2016). Thalamic pain: Anatomical and

physiological indices of prediction. *Brain* 139, 7086722.

Veinante, P., and Deschênes, M. (1999). Single- and Multi-Whisker Channels in the Ascending Projections from the Principal Trigeminal Nucleus in the Rat. *J. Neurosci.* 19, 508565095.

Veinante, P., Jacquin, M.F., Desche, M., Giffard, L., and Giffard, R. (2000). Thalamic Projections From the Whisker- Sensitive Regions of the Spinal Trigeminal Complex in the Rat. 243, 2336243.

Verkest, C., Piquet, E., Diochot, S., Dauvois, M., Lanteri-Minet, M., Lingueglia, E., and Baron, A. (2018). Effects of systemic inhibitors of acid-sensing ion channels 1 (ASIC1) against acute and chronic mechanical allodynia in a rodent model of migraine. *Br. J. Pharmacol.* 175, 415464166.

Viana, F., Van Bosch, L. Den, Missiaen, L., Vandenberghe, W., Droogmans, G., Nilius, B., and Robberecht, W. (1997). Mibefradil (Ro 40-5967) blocks multiple types of voltage-gated calcium channels in cultured rat spinal motoneurons. *Cell Calcium* 22, 2996311.

Villarreal, C.F., and Prado, W.A. (2007). Modulation of persistent nociceptive inputs in the anterior pretectal nucleus of the rat. *Pain* 132, 42652.

Villarreal, C.F., Del Bel, E.A., and Prado, W.A. (2003). Involvement of the anterior pretectal nucleus in the control of persistent pain: a behavioral and c-Fos expression study in the rat. *Brain Dev.* 25, 2916293.

Villarreal, C.F., Kina, V.A. V, and Prado, W.A. (2004a). Antinociception induced by stimulating the anterior pretectal nucleus in two models of pain in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 31, 6086613.

Villarreal, C.F., Kina, V.A. V, and Prado, W.A. (2004b). Participation of brainstem nuclei in the pronociceptive effect of lesion or neural block of the anterior pretectal nucleus in a rat model of incisional pain. *Neuropharmacology* 47, 1176127.

Wanaverbecq, N., Bodor, A.L., Bokor, H., Slézia, A., Lüthi, A., and Acsády, L. (2008). Contrasting the functional properties of GABAergic axon terminals with single and multiple synapses in the thalamus. *J. Neurosci.* 28, 11848611861.

Wang, J., Chen, S., Nolan, M.F., Siegelbaum, S.A., Street, W., York, N., and York, N. (2002). Activity-Dependent Regulation of HCN Pacemaker Channels by Cyclic AMP: Signaling through Dynamic Allosteric Coupling. 36, 4516461.

Wang, X.M., Yuan, B., and Hou, Z. lian (1992). Role of the deep mesencephalic nucleus in the antinociception induced by stimulation of the anterior pretectal nucleus in rats. *Brain Res.* 577, 3216325.

Watson, G.D.R., Smith, J.B., and Alloway, K.D. (2015). The Zona Incerta Regulates Communication between the Superior Colliculus and the Posteromedial Thalamus: Implications for Thalamic Interactions with the Dorsolateral Striatum. *J. Neurosci.* 35, 94636 9476.

Weber, J.T., and Harting, J.K. (1980). The efferent projections of the pretectal complex: an autoradiographic and horseradish peroxidase analysis. *Brain Res.* 194, 1628.

Weiss, N., Hameed, S., Fernández-Fernández, J.M., Fablet, K., Karmazinova, M., Poillot, C., Proft, J., Chen, L., Bidaud, I., Monteil, A., et al. (2012a). A Ca v3.2/syntaxin-1A signaling complex controls T-type channel activity and low-threshold exocytosis. *J. Biol. Chem.* 287, 281062818.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Weiss, N., Zamponi, G.W., and De Waard, M. (2012b). How do T-type calcium channels control low-threshold exocytosis? *Commun. Integr. Biol.* 5, 3776380.
- Wen, X., Li, Z., Chen, Z., Fang, Z., Yang, C., Li, H., and Zeng, Y. (2006). Intrathecal administration of Cav 3.2 and Cav 3.3 antisense oligonucleotide reverses tactile allodynia and thermal hyperalgesia in rats following chronic compression of dorsal root of ganglion. *Acta Pharmacol. Sin.* 27, 154761552.
- White, G., Lovinger, D.M., and Weight, F.F. (1989). Transient low-threshold Ca<sup>2+</sup> current triggers burst firing through an afterdepolarizing potential in an adult mammalian neuron. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 680266806.
- Whitlock, D.G., and Perl, E.R. (1961). Thalamic projections of spinothalamic pathways in monkey. *Exp. Neurol.* 3, 2406255.
- Wiberg, M., and Blomqvist, A. (1984a). The Projection to the Mesencephalon from the Dorsal Column Nuclei . An Anatomical study in the Cat. *Brain Res.* 311, 2256244.
- Wiberg, M., and Blomqvist, A. (1984b). The Spinomesencephalic Tract in the Cat : Its Cells of Origin and Termination Pattern as Demonstrated by the Intraaxonal Transport Method. *Brain Res.* 291, 1618.
- Wiberg, M., Westman, J.A.N., and Blomqvist, A. (1987). Somatosensory Projection to the Mesencephalon : An Anatomical Study in the Monkey. *J Comp Neurol* 117, 926117.
- Williams, S.R., and Stuart, G.J. (2018). Action Potential Backpropagation and Somatodendritic Distribution of Ion Channels in Thalamocortical Neurons. *J. Neurosci.* 20, 13076 1317.
- Williams, S.R., Tóth, T.I., Turner, J.P., Hughes, S.W., and Crunelli, V. (1997). The  $\bar{w}$  component of the low threshold Ca<sup>2+</sup> current produces input signal amplification and bistability in cat and rat thalamocortical neurones. *J. Physiol.* 505, 6896705.
- Wilson, D.G., Rees, H., and Roberts, M.H. (1991). The antinociceptive effects of anterior pretectal stimulation in tests using thermal, mechanical and chemical noxious stimuli. *Pain* 44, 1956200.
- Wimmer, R.D., Schmitt, L.I., Davidson, T.J., Nakajima, M., Deisseroth, K., and Halassa, M.M. (2015). Thalamic control of sensory selection in divided attention. *Nature*.
- Winkler, C.W., Hermes, S.M., Chavkin, C.I., Drake, C.T., Morrison, S.F., Aicher, S.A., Clayton, W., Hermes, S.M., Chavkin, C.I., Drake, C.T., et al. (2006). Kappa Opioid Receptor ( KOR ) and GAD67 Immunoreactivity Are Found in OFF and NEUTRAL Cells in the Rostral Ventromedial Medulla. *J. Neurophysiol.* 346563473.
- Witcher, D.R., De Waard, M., Sakamoto, J., Franzini-Armstrong, C., Pragnell, M., Kahl, S.D., and Campbell, K.P. (1993). Subunit identification and reconstitution of the N-type Ca<sup>2+</sup> channel complex purified from brain. *Science* (80- ). 261, 486 LP 6 489.
- Wolfart, J., and Roeper, J. (2002). Selective Coupling of T-Type Calcium Channels to SK Potassium Channels Prevents Intrinsic Bursting in Dopaminergic Midbrain Neurons. *J. Neurosci.* 22, 340463413.
- Woolf, C.J., Shortland, P., and Coggeshall, R.E. (1992). Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 75678.
- Wu, J., Xu, Y., Pu, S., Jiang, W., and Du, D. (2011). p38 / MAPK Inhibitor Modulates the Expression of Dorsal Horn GABA ( B ) Receptors in the Spinal Nerve Ligation Model of

## BIBLIOGRAPHIE

---

Neuropathic Pain. *Neuro Immuno Modul.* 200233, 1506155.

Yoshida, A., Sessle, B.J., Dostrovsky, J.O., and Chiang, C.Y. (1992). Trigeminal and dorsal column nuclei projections to the anterior pretectal nucleus in the rat. *Brain Res.* 590, 81694.

Zagon, A., Terenzi, M.G., and Roberts, M.H.T. (1995). Direct projections from the anterior pretectal nucleus to the ventral medulla oblongata in rats. *Neuroscience* 65, 2536272.

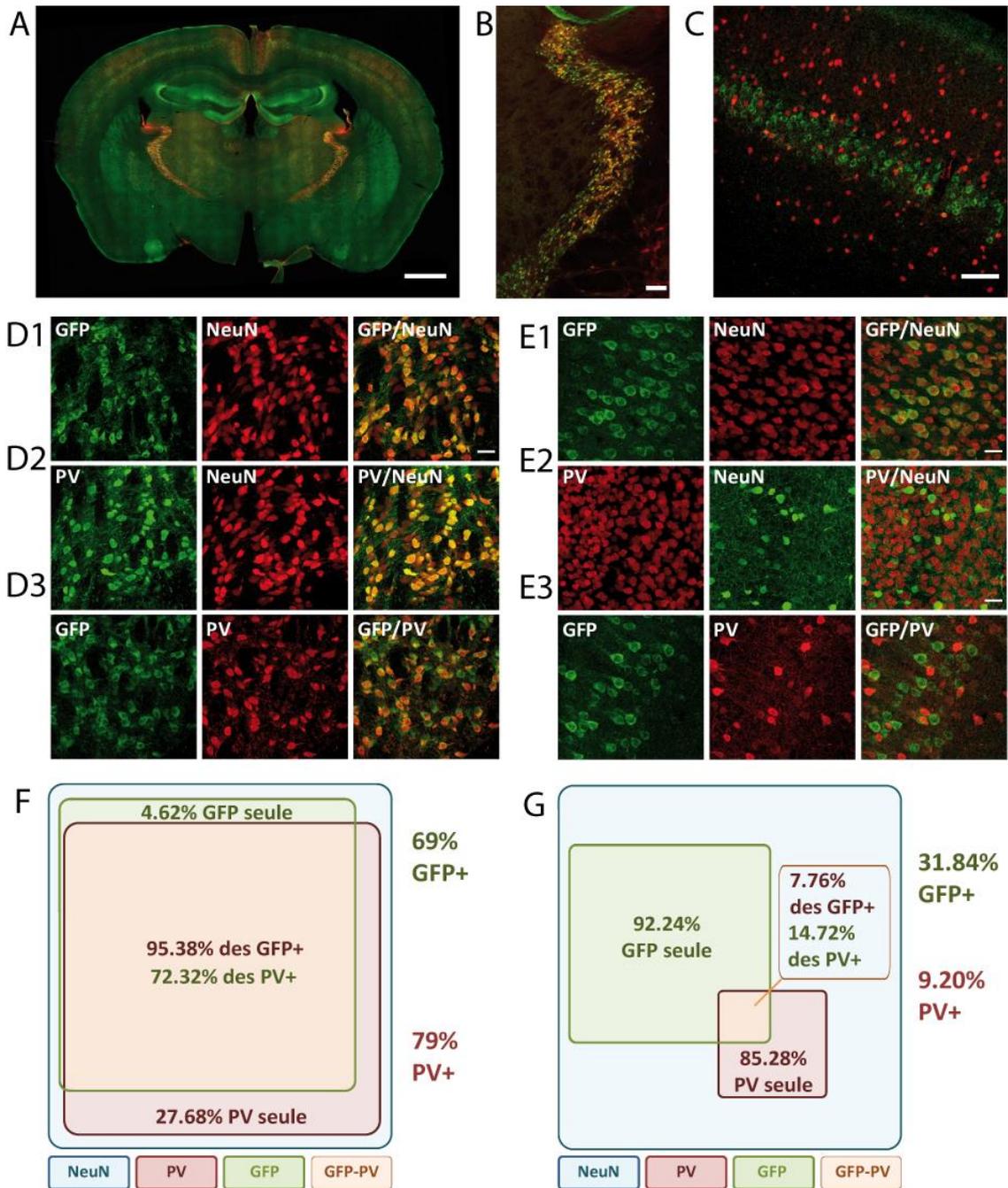
Zhang, C., Bosch, M.A., Rick, E.A., Kelly, M.J., and Rønnekleiv, O.K. (2009). 17beta;-estradiol regulation of T-type calcium channels in gonadotropin-releasing hormone neurons. *J. Neurosci.* 29, 10552610562.

Ziegler, D., Duan, R.W., Guohua, A., Thomas, J.W., and Wolfram, N. (2015). A randomized double-blind, placebo-, and active-controlled study of T-type calcium channel blocker ABT-639 in patients with diabetic peripheral neuropathic pain. *Pain.*

Ziemann, U., Rothwell, J.C., and Ridding, M.C. (1996). Interaction between intracortical inhibition and facilitation in human motor cortex. *J. Physiol.* 496, 8736881.

Zobeiri, M., Chaudhary, R., Blaich, A., Rottmann, M., Herrmann, S., Meuth, P., Bista, P., Kanyshkova, T., Lüttjohann, A., Narayanan, V., et al. (2019). The Hyperpolarization-Activated HCN4 Channel is Important for Proper Maintenance of Oscillatory Activity in the Thalamocortical System. *Cereb. Cortex* 29, 229162304.

# **ANNEXES**



**Expression du canal Cav3.2-GFP et de la PV dans le nRT et le cortex.**

(A) Co-marquage anti-GFP (vert) anti-PV (rouge) sur une tranche coronale de souris KI à un niveau contenant le nRT, observé en épifluorescence. Barre d'échelle : 1mm.

(B, C) Co-marquages anti-GFP (vert) anti-PV (rouge) dans le nRT (B) et dans le cortex (C) observés en microscopie confocale. Barre d'échelle : 100µm.

(D, E) Doubles marquages anti-GFP/ anti-NeuN (D1, E1), anti-PV / anti-NeuN (D2, E2), anti-GFP / anti-PV (D3, E3) réalisés sur des coupes de nRT (D) et de cortex (E) observées en microscopie confocale pour les comptages cellulaires. Barre d'échelle : 30µm, pour toutes les images.

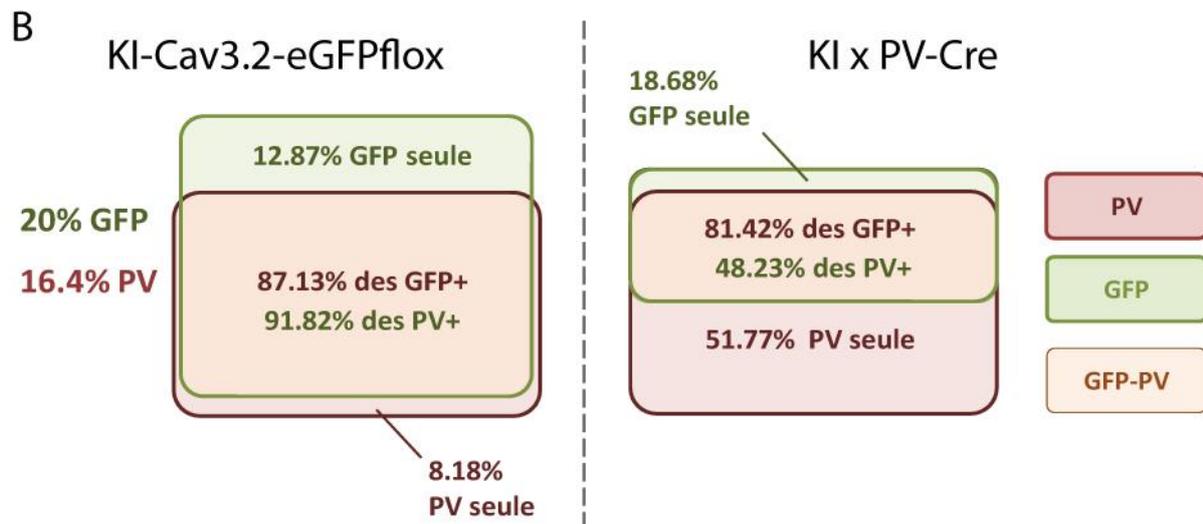
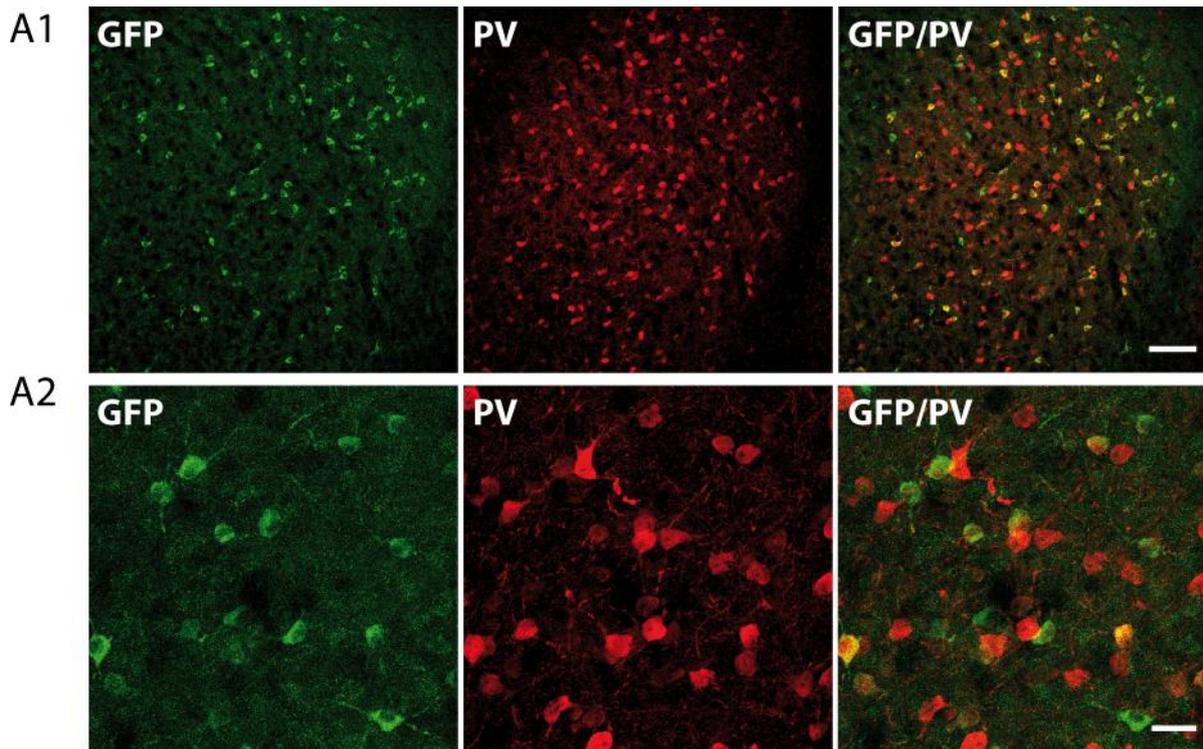
(F, G) Diagramme des proportions de neurones exprimant la GFP et/ou la PV déterminés par comptages cellulaires sur chacun de co-marquages dans le nRT (F) et la bande GFP+ du cortex (G)

<b>Population du nRT</b>	<b>Pourcentagemoyens (%)</b>	<b>SEM (%)</b>
% neurones GFP+	68.95	± 1.36
% neurones PV+	78.76	± 1.72
% neurones GFP+ exprimant aussi la PV	95.38	± 3.60
% neurones seulement GFP+	4.62	± 3.60
% neurones PV+ exprimant aussi la GFP	72.32	± 3.17
% neurones seulement PV+	27.68	± 3.17

**Tableau A | Pourcentages moyens de neurones du nRT exprimant la GFP et/ou la PV, obtenus par comptages cellulaires à partir de co-marquages anti-GFP, anti-PV, anti-NeuN chez des souris KI.**

<b>Population du cortex (bande) GFP+</b>	<b>Pourcentagemoyens (%)</b>	<b>SEM (%)</b>
% neurones GFP+	31.84	± 1.09
% neurones PV+	9.20	± 0.46
% neurones GFP+ exprimant aussi la PV	7.76	± 0.74
% neurones seulement GFP+	92.24	± 0.74
% neurones PV+ exprimant aussi la GFP	14.72	± 1.50
% neurones seulement PV+	85.28	± 1.50

**Tableau B | Pourcentages moyens de neurones de la couche GFP+ du cortex exprimant la GFP et/ou la PV, obtenus par comptages cellulaires à partir de co-marquages anti-GFP, anti-PV, anti-NeuN chez des souris KI.**



**Expression du canal Cav3.2-GFP et de la PV dans l'APN de souris issues du croisement KI x PVcre.**

(A) Marquages anti-GFP (vert) et anti-PV (rouge) dans l'APN de souris issues du croisement KI x PVcre observés en microscopie confocale aux objectifs 20X (A1) et 63X (A2). Barre d'échelles en A1 : 100µm ; en A2 : 30µm

(B) Diagramme des pourcentages de recouvrement des populations Cav3.2-GFP+ et PV+ chez des souris KI-Cav3.2-eGFPflox natives ou croisées avec des souris PV-Cre (n=2 mâles et 2 femelles de P33 à P75)

## CONTROLE NEGATIF DE L'EXPRESSION DU CANAL CAV3.2-GFP DANS LES NEURONES PV+ DE L'APN

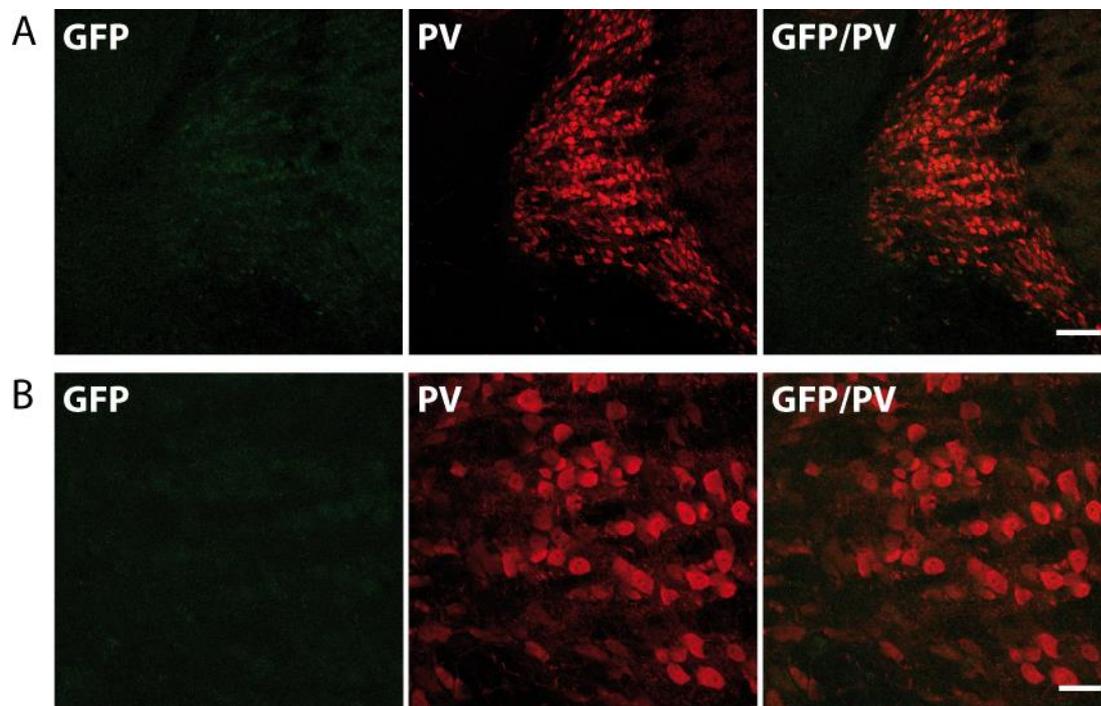
---

<b>Population de l'APN</b>	<b>Pourcentages moyens (%)</b>	<b>SEM (%)</b>
<b>% neurones GFP+ exprimant aussi la PV</b>	81.42	± 3.30
<b>% neurones seulement GFP+</b>	18.68	± 3.30
<b>% neurones PV+ exprimant aussi la GFP</b>	48.23	± 4.17
<b>% neurones seulement PV+</b>	51.77	± 4.17

**Pourcentages moyens de neurones de la couche GFP+ du cortex exprimant la GFP et/ou la PV chez des souris issues du croisement KIxPVcre, obtenus par comptages cellulaires à partir de co-marquages anti-GFP, anti-PV, anti-NeuN.**

### ANNEXE 3 : CONTROLE NEGATIF DE L'EXPRESSION DU CANAL CAV3.2-GFP DANS LES NEURONES PV+ DU NRT

---



#### **Expression du canal Cav3.2-GFP et de la PV dans le nRT de souris issues du croisement KIxPVcre.**

Marquages anti-GFP (vert) et anti-PV (rouge) dans le nRT de souris issues du croisement KIxPVcre observés en microscopie confocale aux objectifs 20X (A) et 63X (B). Barre d'échelle : 30 $\mu$ m pour toutes les images.

(n=2 mâles et 2 femelles de pP33 à P75)

**PROJET 2 :**

**CONNECTIVITE INTERLAMINAIRE DU CORTEX  
SOMATOSENSORIEL PRIMAIRE CHEZ LE RONGEUR**



## RESUME PROJET 2 : CONNECTIVITE INTERLAMINAIRE DU CORTEX SOMATOSENSORIEL PRIMAIRE CHEZ LE RONGEUR

---

La perception consciente du monde extérieur repose sur la coordination spatio-temporelle de l'activité des neurones des aires corticales sensorielles primaires. Une des caractéristiques principales des aires corticales sensorielles primaires chez les mammifères est leur organisation laminaire en six couches au sein desquelles les neurones ont des tailles, des morphologies et des densités caractéristiques. Des travaux pionniers ayant permis la reconstruction de l'arborisation dendritique et axonale de neurones excitateurs du cortex visuel dont les champs récepteurs ont été préalablement caractérisés a conduit à l'hypothèse d'un traitement sériel de l'information sensorielle au travers des différentes couches. D'abord au niveau de la couche IV, cible principale des afférences thalamiques qui acheminent les informations sensorielles au niveau du cortex. Ensuite, au niveau des couches II/III superficielles, fortement innervées par les neurones excitateurs de la couche IV. Et enfin, par les neurones pyramidaux de la couche V qui sont innervés par les cellules pyramidales glutamatergiques des couches superficielles et qui projettent vers des structures sous-corticales impliquées dans l'action, telles que le striatum, les colliculi ou la moëlle épinière. Cependant, des études anatomiques ultérieures ont mis en évidence des afférences thalamiques directes au niveau de la couche V. Par ailleurs, plusieurs groupes ont montré que les neurones de la couche V peuvent être activés par des stimulations sensorielles malgré la lésion ou l'inactivation pharmacologiques des couches superficielles. Ainsi, le rôle de la connexion interlaminaire entre les neurones des couches II/III et les neurones de la couche V est largement débattu.

Dans ce contexte, nous avons un double objectif : caractériser d'une part les propriétés fonctionnelles de la connectivité entre les neurones pyramidaux des couches II/III et ceux de la couche V, et d'autre part l'impact du recrutement des neurones des couches II/III sur les réponses sensorielles évoquées dans les neurones de la couche V. Pour ce faire, nous avons utilisé une technique d'électroporation *in utero* permettant d'induire l'expression d'une opsine activatrice (la Channel-Rhodopsine de type 2 ; ChR2) ou d'une opsine inhibitrice (Archae-Rhodopsine de type 3 ; ArchT3.0) spécifiquement dans les neurones pyramidaux des couches II/III dans une région qui englobe le cortex somesthésique chez la souris.

En procédant à des enregistrements intracellulaires sur des tranches de cortex somesthésique, j'ai d'abord montré que les opsines transfectées par électroporation *in utero* sont fonctionnelles. J'ai en particulier montré que les neurones transfectés par la ChR2 étaient capables d'émettre des potentiels d'action de manière temporellement précise en réponse à des faisceaux lumineux bleus (470 nm) de 5 ms. Par ailleurs, la fiabilité de l'occurrence des potentiels d'action par créneau de lumière est inchangée lors de trains de photostimulation allant de 3 à 30Hz. J'ai également montré que les neurones transfectés par ArchT 3.0 présentaient des hyperpolarisations réversibles et temporellement précises en réponse à des faisceaux lumineux verts (530 nm) d'une seconde. Cette hyperpolarisation, de l'ordre de 30 mV, supprimait totalement la décharge tonique évoquée par l'injection d'un créneau de courant dépolarisant dans tous les neurones enregistrés.

## RESUME PROJET 2 : CONNECTIVITE INTERLAMINAIRE DU CORTEX SOMATOSENSORIEL PRIMAIRE CHEZ LE RONGEUR

---

Dans un deuxième temps, j'ai étudié la nature des courants évoqués dans les neurones pyramidaux de la couche V lors de la photo-stimulation des neurones pyramidaux des couches II/III. En procédant à des enregistrements de type patch-clamp en configuration potentiel imposé, j'ai montré que la photostimulation des neurones des couches superficielles évoque un courant post-synaptique excitateur (CPSE) suivi d'un courant post-synaptique inhibiteur (CPSI). La différence de latence entre les deux courants est de l'ordre de 2 ms et les CPSIs ne sont plus évoqués en présence d'antagonistes de la transmission glutamatergique, ce qui indique que l'inhibition est recrutée de manière di-synaptique. Ce résultat est corrélé à l'observation d'une forte excitation des neurones non-pyramidaux de la couche V de type *fast-spiking*, présumés inhibiteurs. Par la suite, j'ai étudié comment le recrutement de ces deux conductances impacte le potentiel de membrane des neurones pyramidaux de la couche V en fonction de la fréquence de photo-stimulation des neurones pyramidaux des couches II/III. En procédant à des enregistrements en mode courant imposé, j'ai montré que pour des fréquences allant de 3 à 30 Hz, l'activité des neurones des couches superficielles a un impact excitateur net sur l'activité des neurones des couches profondes. .

Des travaux menés en parallèle chez des animaux anesthésiés et éveillés, ont permis de montrer que le recrutement des neurones pyramidaux des couches II/III augmente le gain des réponses sensorielles évoquées par des stimulations tactiles au niveau des neurones de la couche V.