



**HAL**  
open science

# Le rôle de la cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) dans la sensibilisation centrale de la corne dorsale à l'origine de l'allodynie mécanique, dépend de la nature de la lésion périphérique, inflammatoire ou neuropathique

Nicolas Pinto Pardo

## ► To cite this version:

Nicolas Pinto Pardo. Le rôle de la cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) dans la sensibilisation centrale de la corne dorsale à l'origine de l'allodynie mécanique, dépend de la nature de la lésion périphérique, inflammatoire ou neuropathique. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Clermont Auvergne, 2021. Français. NNT : 2021UCFAC101 . tel-04497388

**HAL Id: tel-04497388**

**<https://theses.hal.science/tel-04497388>**

Submitted on 10 Mar 2024

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

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

# UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE  
LA SANTE - AGRONOMIE - ENVIRONNEMENT

## THESE

présentée pour obtenir le grade de

**DOCTEUR  
D'UNIVERSITE**

*Spécialité : Neurosciences*

Par **PINTO PARDO Nicolás**

**D.E.A. ou Master**

**LE ROLE DE LA CYCLIN-DEPENDENT KINASE 5 DANS LA  
SENSIBILISATION CENTRALE DE LA CORNE DORSALE A  
L'ORIGINE DE L'ALLODYNIE MECANIQUE DEPEND DE LA  
NATURE DE LA LESION PERIPHERIQUE, INFLAMMATOIRE  
OU NEUROPATHIQUE**

Soutenue publiquement le «02/07/2021», devant la commission d'examen

<b>Mme Christine COURTEIX RAUSCH</b>	PU, Université Clermont-Auvergne, France,	Examineur
<b>Mr Louis GENDRON</b>	PU, Université de Sherbrooke, Canada	Rapporteur
<b>Mr Marc LANDRY</b>	PU, Université de Bordeaux, France	Rapporteur
<b>Mme Elisabeth NOIRAUT</b>	MCU, Université Clermont-Auvergne, France	Examineur
<b>Mme Sophie PEZET</b>	MCU, Université Pierre et Marie Curie, France	Rapporteur
<b>Mr ALAIN ARTOLA</b>	PU, Université Clermont-Auvergne, France	Directeur
<u>Membre invité</u> : <b>Mr UTRERAS Elias</b>	Profesor asistente, Universidad de Chile, Chili	



## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements au Professeur Radhouane Dallel, pour m'avoir montré un chemin de boulot avec une qualité surprenant comme ce qu'est fait dans Neuro-dol. De plus, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Merci de m'avoir fait découvrir dans le 2015 avec sa conférence au Chili, la rigueur de la recherche fondamentale et merci finalement, pour chaque conseil constructif pour développer mon projet de vie.

Merci au Professeur Alain Artola pour avoir accepté de diriger ce travail, pour être toujours disponible pour me guider et aussi me conseiller pour bien comprendre ce qu'était nécessaire pendant tout le chemin de thèse. Votre compromis avec moi est remarquable et pour ça, merci beaucoup. Chaque conversation pour bien exprimer des histogrammes, des données, des manips, ont été un vrai exemple d'enseignement, que j'espère transmettre aussi dans le futur.

Merci à Jean Louis Molat, pour son aide précieuse dans la mise au point de la technique d'électrophysiologie *in vivo*, et merci beaucoup à ma copine du post d'électrophysiologie : Marine Megemont. Tu m'as aidé depuis mon arrive au sein de Neuro-dol. Ta qualité humaine, joie et surtout la manière d'être m'a montré que la simplicité d'un geste, une parole et même un accompagnement pendant les longs jours de boulot peuvent être confrontés avec une vraie amitié. Tu as été un soutien pour moi pendant ses 3 années. J'espère qu'un jour nos routes se recroiserons aussi.

Merci à François Gabrielli et Karine Hérault, pour l'amitié qu'ont partagé avec moi. Je ne vais pas oublier votre générosité. D'avoir m'accueillir chez vous et me donner la possibilité de connaître vos familles va être un souvenir que je vais garder dans mon cœur. J'espère vous recevoir chez moi aussi ici, au Chili.

Merci à Sara Mountadem et Elric Courty, pour être mes copains pendant mes séjours à Clermont-Ferrand, et aussi pour me montrer avec Jennyfer, Maxime et Rémi, que l'équipe des étudiants de Neuro-dol était un groupe magnifique. J'ai partagé avec vous très bons moments que vont être dans ma tête mais aussi dans mon cœur.

Merci à Amélie, Anne Marie, Cédric, Cristina, Christelle, Christophe, Lénaïc, Myriam, Nathalie et Philippe, pour m'accueillir entre vous et me montrer la qualité humaine et culturelle de l'équipe. J'attends la possibilité d'y aller à fêter Noël dans le laboratoire et manger des gâteaux d'Anne Marie ! Je me sens un clermontois par adoption.

Finalement, merci beaucoup à ma famille, pour me soutenir pendant le temps que j'ai été en vivant à Clermont-Ferrand. Ça m'a donné la force pour finir mon projet. MUCHAS GRACIAS A TODOS !



# Table des matières

---

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>I. LES DOULEURS, GÉNÉRALITÉS .....</b>	<b>2</b>
1. CLASSIFICATION DES DOULEURS SELON LEUR DUREE .....	3
2. CLASSIFICATION DES DOULEURS SELON LE MECANISME DECLENCHANT .....	4
3. CLASSIFICATION DES DOULEURS SELON LEUR LOCALISATION .....	4
<b>II. LE SYSTEME TRIGEMINAL : .....</b>	<b>6</b>
<b>ORGANISATION ANATOMIQUE ET FONCTIONNELLE .....</b>	<b>6</b>
1. LE TRIJUMEAU .....	7
2. LE COMPLEXE SENSITIF DU TRIJUMEAU.....	8
2.1. Le complexe sensitif du trijumeau : organisation anatomique.....	8
2.2. Le complexe sensitif du Trijumeau : organisation fonctionnelle .....	8
2.3. Le sous-noyau caudal du Trijumeau (Sp5C) .....	9
2.3.1 Organisation anatomique du Sp5C.....	9
2.3.2 Projections des fibres afférentes primaires sur le Sp5C.....	10
2.3.3 Propriétés fonctionnelles des neurones du Sp5C.....	13
2.3.4 Projections du Sp5C .....	14
2.3.5 Contrôles descendants du Sp5C.....	14
<b>III. PARTICULARITES DU SYSTEME TRIGEMINAL.....</b>	<b>15</b>
1. UNE GRANDE DIVERSITE DE TISSUS CRANIO-FACIAUX INNERVES .....	15
1.1. L'articulation temporomandibulaire et les muscles masticateurs.....	15
1.2. La dent.....	16
1.3. Les méninges et les vaisseaux intracrâniens.....	16
2. UNE ORGANISATION COMPLEXE DU NOYAU SPINAL DU TRIJUMEAU .....	17
<b>IV. SENSIBILISATIONS PERIPHERIQUE ET CENTRALE .....</b>	<b>20</b>
1. SENSIBILISATION PERIPHERIQUE.....	20
2. SENSIBILISATION CENTRALE .....	21
2.1. Potentialisation de la transmission glutamatergique .....	21



2.2. Facilitation de l'excitabilité neuronale .....	25
2.2.1. Canaux Na <sup>+</sup> voltage-dépendants .....	25
2.2.2. Canaux K <sup>+</sup> voltage-dépendants.....	25
2.2.3. Potentiels en plateau .....	26
2.3. Désinhibition glycinergique/GABAergique.....	26
2.4. Activation des cellules gliales .....	30
2.5. Altération des voies descendantes de modulation de la douleur .....	32

## **V. QUE NOUS APPRENNENT LES MODELES ANIMAUX DE DOULEUR CHRONIQUE**

<b>TRIGEMINALE ? .....</b>	<b>35</b>
1. MODELES DE DOULEUR TRIGEMINALE NEUROPATHIQUE.....	35
2. MODELES DE DOULEURS INFLAMMATOIRES TRIGEMINALES.....	37

## **VI. ROLE SPECIFIQUE DE CERTAINES KINASES DANS LA SENSIBILISATION : LA**

<b>CYCLIN-DEPENDENT KINASE 5' (CDK5).....</b>	<b>40</b>
---	-----------

## **VII. OBJECTIFS DE CETTE THESE .....**

<b>ARTICLES .....</b>	<b>44</b>
<b>ARTICLE 1.....</b>	<b>45</b>
<b>ARTICLE 2.....</b>	<b>137</b>
<b>Discussion &amp; Conclusion.....</b>	<b>155</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>166</b>





## ABBREVIATIONS

5-HT	sérotonine
A11	noyau hypothalamique A11
ACC	cingulaire antérieur
AMPA	récepteurs 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl) propanoïque
ANO1	anocamin 1
ATP	adénosine triphosphate
A $\beta$	fibres A $\beta$ (myélinisées, de large diamètre)
A $\delta$	fibres A $\delta$ (myélinisées, de petit diamètre)
Bcl2	B-cell lymphoma
Bcl211	B-cell lymphoma 211
BDNF	brain derived neurotrophic factor
BK	bradykinine
C	fibres C (non myélinisées, de petit diamètre)
C1	niveau métamérique C1
C2	niveau métamérique C2
C3	niveau métamérique C3
CaMKII	calmoduline kinase II
CCI	chronic constriction injury
Cdk5	kinase 5 dépendant d'une cycline
CFA	complete freund's adjuvant
CGRP	calcitonin gene related peptide
CR	champ récepteur
CX3CR1	CX3C chemokine receptor 1
D2	récepteurs à la dopamine de type D2
DA	projections dopaminergiques
DH / CD	dorsal horn / corne dorsale
DNIC	Diffuse Noxious Inhibitory Controls
DRG	dorsal root ganglion
EP2	Prostanoid Receptor EP2
ERK	extracellular-signal-regulated kinase
GABA	acide $\gamma$ -aminobutyrique
GABA <sub>A</sub> (GABA <sub>A</sub> R)	récepteur GABA <sub>A</sub>



GABA <sub>B</sub> (GABA <sub>B</sub> R)	récepteur GABA <sub>B</sub>
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GluR	récepteur de glutamate
GlyR	récepteurs à la glycine
GSTP1	glutathionne S transférase
HFS	high-frequency stimulation
Hz	hertz
IAN	inferior alveolar nerve
IB4	isolectine B4
II	couche II
Ile	couche II externe
Ili	couche II interne
III	couche III
IL	cortex insulaire
IL-1	interleukine 1
ION	infraorbital nerve
IPSCs	inhibitory postsynaptic current
IV	couche IV
IX	nerf glossopharyngien
KCC2	K <sup>+</sup> -Cl <sup>-</sup> -co-transporteur
KO	knockout
LC	locus coeruleus
LFS	low-frequency stimulation
LTD	long-term depression
LTMR	low-threshold mechanoreceptors
LTP	long-term potential
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MBP	protéine basique de la myéline
mGluR5	Metabotropic glutamate receptor 5
NA	noradrénaline
NGF	nerve growth factor
NK1	récepteur neurokinine 1
NMDA	N-Methyl-D-aspartic acid
NPY	neuropeptide Y
NS	neurones nociceptifs spécifiques
NS	neurones nociceptifs spécifiques



P2X4	récepteur purinergique P2X4
P2Y12	récepteur plaquettaire P2Y12
p35	protéine p35 (activatrice de la Cdk5)
p38	p38-mitogen-activated protein kinase
p39	protéine p39 (activatrice de la Cdk5)
PAG	substance grise périaqueducule
PFC	cortex préfrontal
PGE2	prostaglandine E2
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PKC $\gamma$	protéine kinase C gamma
RF	receptive field
RNA ou ARN	ribonucleic acid
RVM	médulla ventrale rostrale
S1	cortex somatosensoriel primaire
S2	cortex somatosensoriel secondaire
SNC	central nervous system
SNI	spared nerve injury
SP ou P	substance P
Sp5C	sous-noyau caudal
Sp5I	sous-noyau interpolaire
Sp5O	sous-noyau oral
Src	non-receptor tyrosine kinases
Tg	transgénique
TH	thyrosine hydroxylase
Thr ou T 372/407/574	Thréonine 372/407/574
TMJ	temporo-mandibular joint
TNF	facteur de nécrose tumorale
TrkA	récepteur tyrosine-kinase A
TrkB	récepteur tyrosine-kinase B
TRP	canal Transient Receptor Potential
TRPV1	transient receptor potential vanilloïde 1
V	couche V
V	nerf trijumeau

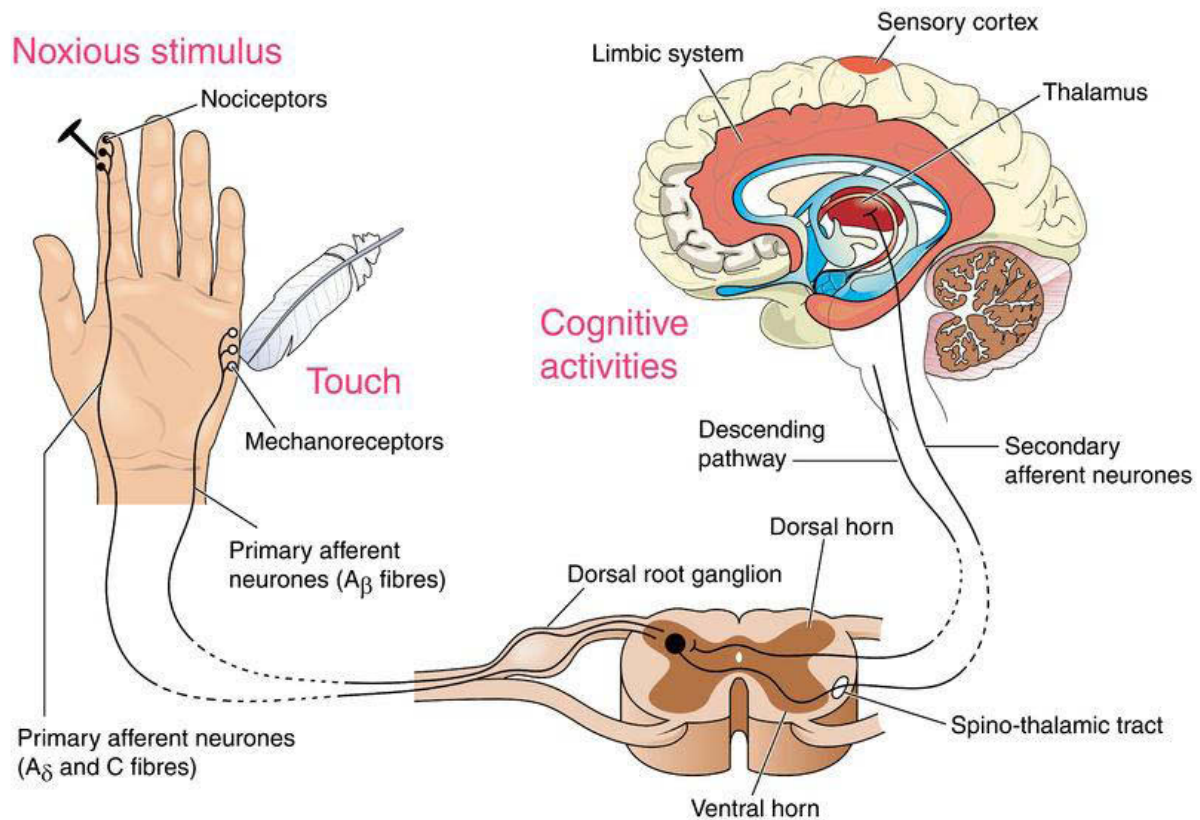


V1	nerf ophtalmique
V2	nerf maxillaire
V3	nerf mandibulaire
VBSNC	trigeminal brainstem sensory nuclear complex
VGLUT3	vesicular glutamate transporter 3
VII	nerf facial
VIP	vaso-intestinal peptide
WDR	neurones wide dynamic range ou nociceptifs non-spécifiques
X	nerf vague





# **INTRODUCTION**



**Figure 1 : Schéma de la perception des stimuli somato-sensoriels par les différentes parties du cerveau.** L'information somato-sensorielle (**Touch**), dont l'information nociceptive (**Noxious stimulus**), est transmise de la périphérie à la corne dorsale (**Dorsal horn** ou **DH**) par l'intermédiaire des fibres afférentes  $A\beta$ ,  $A\delta$  et  $C$ . Là, cette information est traitée par différents circuits neuronaux qui facilitent, ou au contraire, inhibent son transfert vers les centres suprasegmentaires et notamment le cortex où cette information devient perception (**Cognitive activities**). A cet égard, une série de voies descendantes (**Descending pathway**), prenant leur origine dans divers noyaux, notamment dans le tronc cérébral, et aboutissant à la corne dorsale, contribuent à cette modulation du passage du message afférent (D'après <https://www.cortex-mag.net/luis-garcia-larrea-cherche-la-ou-ca-fait-mal/>).

# I. LES DOULEURS, GÉNÉRALITÉS

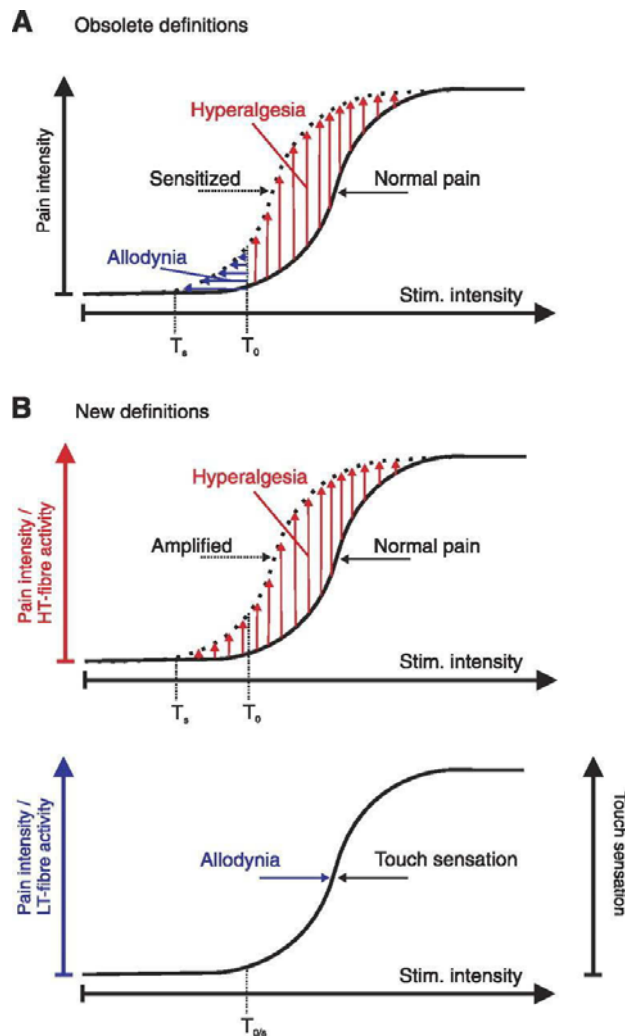
L'*International Association for the Study of Pain* (IASP), définit la douleur comme "une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à des lésions tissulaires réelles ou potentielles ou décrites en de tels termes". Ainsi la douleur est un phénomène complexe, multidimensionnel, associant plusieurs composantes : sensori-discriminative, affectivo-émotionnelle, cognitivo-évaluative.

La composante **sensori-discriminative** participe à la description physique de la douleur ressentie en termes de (i) localisation, (ii) qualité (brûlure, picotement, fourmillement, décharge électrique, coups de couteau, pression), (iii) durée (brève, continue, chronique, récidivante) et (iv) intensité.

La composante **affectivo-émotionnelle** confère à la douleur son caractère plus ou moins désagréable, pénible ou supportable, en fonction des individus. En particulier, une douleur chronique provoque souvent des changements de l'humeur et du caractère, entraînant anxiété et/ou état dépressif (Cvejic *et al.*, 2019).

La composante **cognitivo-évaluative**, représente l'ensemble des processus mentaux – notamment la mémorisation – susceptibles d'influencer l'expression de la douleur et la place qu'elle prend dans la vie, en lien direct avec l'histoire et les expériences passées de l'individu.

Enfin cette douleur peut modifier le comportement de l'individu (Figure 1) et, par-là, influencer sur les réactions de l'entourage social. Ces modifications comportementales sont verbales (cris, soupirs, plaintes) ou non (mimiques, attitudes de protection ou d'évitement). Elles sont importantes à reconnaître pour juger de la nature et de la sévérité de la douleur, particulièrement chez l'enfant. Ainsi chez les enfants de 4 à 12 ans, il existe des comportements automatiques, i.e. manifestations plutôt réflexes de la douleur – devenir pâle, avoir une respiration irrégulière dans un contexte de soins – et d'autres plus contrôlés – être difficile à distraire, montrer une résistance à l'examen, manger moins que d'habitude (Sekhon *et al.*, 2017). Bien entendu, les premiers ont une bien meilleure valeur indicative de douleur réelle que les seconds, qui peuvent être influencés par une tentative de l'enfant de contrôler son environnement social. En retour, l'entourage aura des réactions positives, soulageant plutôt la douleur, ou, au contraire, négatives, tendant à la renforcer.



**Figure 2: Illustration des changements de définitions de l'hyperalgésie' et de l'allodynie' proposés par la task force IASP en 2008.** Dans chaque graph,  $T_0$  figure le seuil de douleur normal, et  $T_s$ , le seuil de douleur après sensibilisation. En A, sont illustrées les définitions obsolètes. Toutes douleurs en réponse à une stimulation normalement non douloureuse étaient définies comme "allodynies" (aire bleue dans la fonction stimulus-réponse) et toutes augmentations de la réponse à une stimulation normalement douloureuse, comme "hyperalgésies" (aire rouge dans fonction stimulus-réponse). Or, un seul mécanisme, par exemple, la sensibilisation des terminaisons nociceptives (e.g., lors d'un 'coup de soleil') provoque le glissement de la fonction stimulus-réponse vers des intensités de stimulus plus faibles. Cela générerait donc toujours les deux symptômes, allodynie et hyperalgésie, à la fois mais jamais isolément, rendant ainsi cette distinction sémiologique inutile. En B, sont illustrées les nouvelles définitions. Toutes les amplifications de la douleur, avec abaissement du seuil, doivent être définies comme hyperalgésies (ordonnées rouges et aire rouge, graphe du haut). Seules les douleurs clairement provoquées par l'activation de fibres afférentes à bas seuil doivent être appelées allodynies (ordonnées bleues, graphe du bas). Ici,  $T_{0/S}$ , le seuil normal de détection d'une stimulation (e.g. mécanique) est identique au (ou proche du) seuil de déclenchement de la douleur (allodynie). Pour tous les cas où on ne connaît pas la nature (bas/haut seuil) des fibres afférentes impliquées, le terme hyperalgésie doit être utilisé. (D'après Sandkühler, 2009)

Les douleurs peuvent être classées selon leur durée (aiguë ou chronique), leur mécanisme déclenchant (nociceptive, neuropathique, inflammatoire ou dysfonctionnelle) et leur localisation (cutanée, viscérale).

## 1. CLASSIFICATION DES DOULEURS SELON LEUR DUREE

**Douleurs aiguës :** Elles résultent de l'activation des voies nociceptives par une stimulation périphérique d'intensité suffisante, risquant de générer une lésion tissulaire et de menacer l'intégrité de l'individu. Il s'agit d'un processus de protection nécessaire à notre survie. Les quelques individus incapables de ressentir une douleur, du fait d'anomalies génétiques congénitales (Cox *et al.*, 2006; 2010), meurent rapidement, le plus souvent au cours de l'enfance. Ces douleurs aiguës peuvent déclencher un réflexe de retrait pour prévenir toutes lésions puis conduire à une stratégie comportementale d'évitement, de protection.

**Douleurs chroniques :** Il s'agit, par définition, de douleurs persistant plus de trois mois. Elles se manifestent par des douleurs spontanées et/ou provoquées : allodynie (douleur en réponse à un stimulus normalement non douloureux) et hyperalgésie (augmentation de la douleur provoquée par un stimulus normalement douloureux) (pour revue voir Almeida *et al.*, 2004 ; Latremoliere & Woolf, 2009). Cependant, ces définitions ont récemment été amendées par le IASP (voir Sandkühler, 2009, et Figure 2) pour appeler hyperalgésie, tous phénomènes d'amplification de la douleur – incluant aussi une diminution du seuil d'activation à la suite, par exemple, de la sensibilisation d'un récepteur périphérique – et réserver le terme d'allodynie à une douleur provoquée par l'activation d'une afférence périphérique à bas seuil – dans le cas donc d'une sensibilisation centrale. Ces symptômes douloureux surviennent à la suite d'une lésion du système nerveux, périphérique ou central, ou d'une inflammation/lésion tissulaire périphérique (voir plus loin). Il est important de noter que la survenue d'une hypersensibilité mécanique et thermique de la peau intacte (zone d'hyperalgésie secondaire) autour d'une lésion/inflammation tissulaire (zone d'hyperalgésie primaire) est une conséquence naturelle, physiologique de cette lésion : l'hyperalgésie secondaire a un rôle protecteur, prévenant tous contacts avec la zone lésée pour en faciliter la cicatrisation. Elle disparaît le plus souvent une fois la cause éliminée et la cicatrisation achevée. Si une douleur persiste, l'effet protecteur, physiologique, fait place à un état pathologique : la douleur n'est plus utile et elle devient même délétère pour la qualité de vie des patients. Cette persistance de la douleur, après disparition de la cause, est notamment due à la sensibilisation centrale. Il s'agit d'une plasticité de l'ensemble des voies de la douleur, depuis la corne dorsale de moelle épinière (en Anglais Dorsal horn DH ou corne dorsale CD) ou le sous-noyau caudal du trijumeau (Sp5C) jusqu'aux aires corticales responsables de la perception de la douleur en ses différentes composantes : sensori-discriminative, affectivo-émotionnelle et cognitivo-évaluative. En somme, la douleur chronique devient une maladie *per se* (Bushnell *et al.*, 2013, van Hecke *et al.*, 2013).

---

Modifiable	Pain
	Mental health
	Other co-morbidities
	Smoking
	Alcohol
	Obesity
	Physical activity/exercise
	Sleep
	Nutrition
	Employment status and occupational factors
Non-modifiable	Age
	Sex
	Cultural background
	Socioeconomic background
	History of trauma/injury/interpersonal violence
	Heritable factors (including genetic)

---

**Figure 3. Facteurs associés à la douleur chronique.** Facteurs modifiables et non-modifiables reliés à la chronicisation de la douleur. (D'après van Hecke et al., 2013)

Les facteurs qui favorisent cette chronicisation de la douleur ont fait l'objet d'études épidémiologiques. Ils sont résumés dans la Figure 3.

## 2. CLASSIFICATION DES DOULEURS SELON LE MECANISME DECLENCHANT

Les étiologies des syndromes douloureux sont très variables et peuvent être classées en douleurs nociceptive, neuropathique, inflammatoire et dysfonctionnelle (Figure 4 ; pour revue voir Costigan *et al.*, 2009).

**Douleurs nociceptives :** Elles sont produites par des stimulations, de nature thermique, mécanique ou chimique, des nocicepteurs et mettent en jeu les voies de la nociception. Ce sont par exemple les douleurs post-traumatiques ou post-opératoires.

**Douleurs neuropathiques :** Elles sont initiées par une lésion ou dysfonctionnement du système nerveux, périphérique ou central. C'est la cause la plus fréquente de douleur chronique, avec une prévalence de 17% dans la population mondiale (Torrance *et al.*, 2006; van Hecke *et al.*, 2014).

**Douleurs inflammatoires :** Elles sont associées à une inflammation périphérique. Au cours d'un processus inflammatoire, de nombreuses molécules pro-inflammatoires – neuropeptides, cytokines, prostaglandines – sont libérées dans le milieu extra cellulaire (i) au niveau périphérique, où elles modifient les propriétés des récepteurs et canaux ioniques des terminaisons nerveuses, déclenchant une sensibilisation périphérique, comme (ii) au niveau central, où elles modifient les propriétés des circuits de la DH impliqués dans le traitement des messages sensoriels, déclenchant une sensibilisation centrale (Kidd & Urban, 2001; Basbaum *et al.*, 2009; Richter *et al.*, 2010; Sessle, 2011).

**Douleurs dysfonctionnelles :** Il s'agit de douleurs sans aucune lésion apparente telles que la fibromyalgie ou la céphalée de tension (Ossipov *et al.*, 2014). Elles résulteraient d'un dysfonctionnement des systèmes de contrôle de la douleur comme, par exemple, une réduction des mécanismes endogènes d'inhibition de la douleur.

## 3. CLASSIFICATION DES DOULEURS SELON LEUR LOCALISATION

L'information nociceptive périphérique aboutit à la DH par l'intermédiaire des neurones de 1<sup>er</sup> ordre des voies de la douleur. Leurs corps cellulaires, ou soma, sont contenus dans les ganglions rachidiens (en Anglais Dorsal root ganglion ou DRG) ou le ganglion de Gasser ou trigéminal et leurs prolongements centraux se projettent sur les différentes couches de la DH ou du sous-noyau caudal du Trijumeau (Sp5C) où ils contactent les neurones de 2<sup>ème</sup> ordre des voies de la douleur. La localisation d'une douleur dépend donc en premier lieu de l'aire, ou métamère, où se situe la stimulation nociceptive et donc le nerf activé.

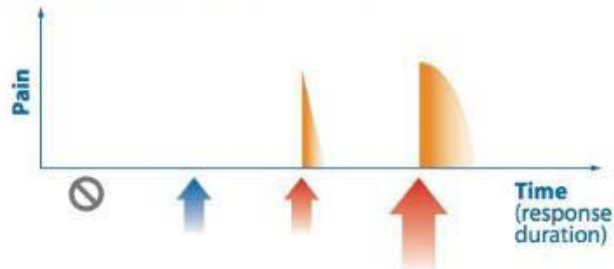


**Nociceptive pain**

No nervous system lesion or inflammation

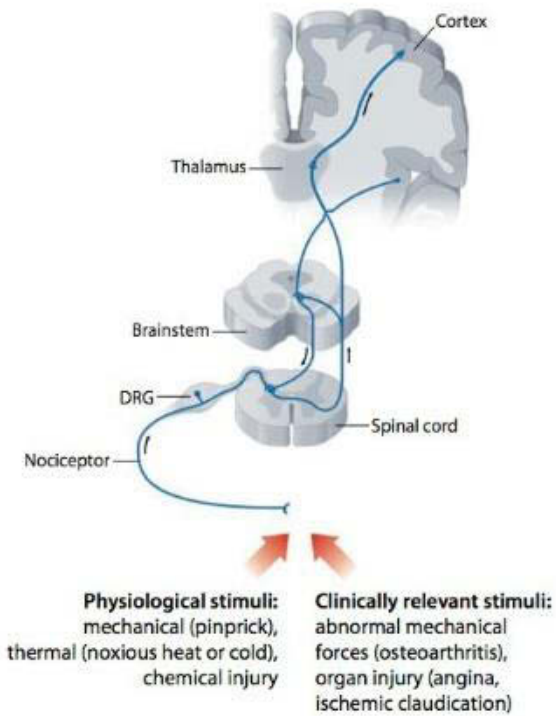
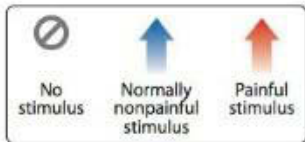
**Stimulus-dependent pain**

Evoked by high-intensity (noxious) stimuli



**Adaptive**

Protects by signaling potential tissue damage



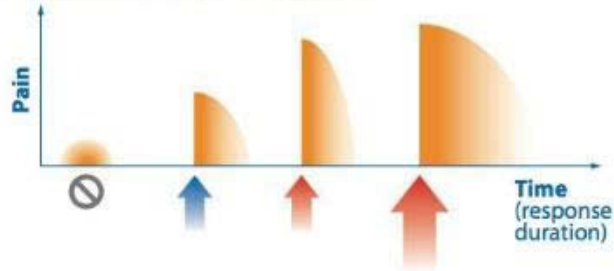
**Inflammatory pain**

Active inflammation

**Spontaneous and stimulus-dependent pain**

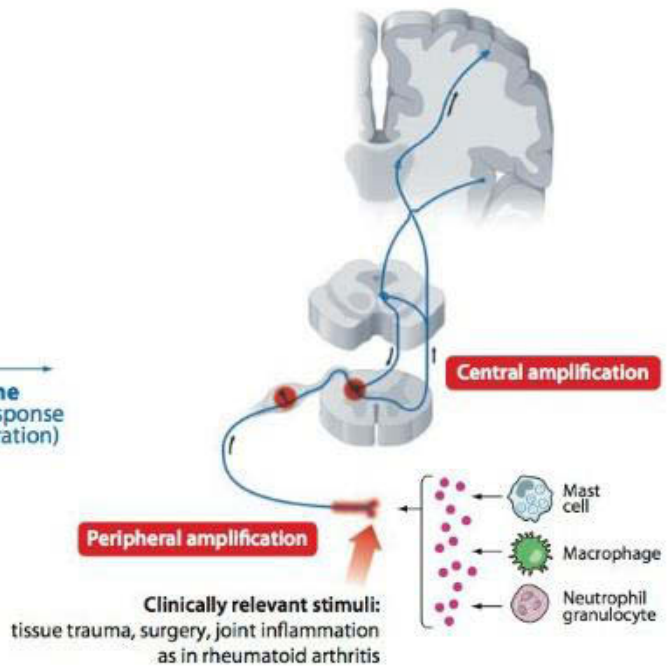
Sensory amplification

Evoked by low- and high-intensity stimuli



**Adaptive and reversible**

Protects by producing pain hypersensitivity during healing

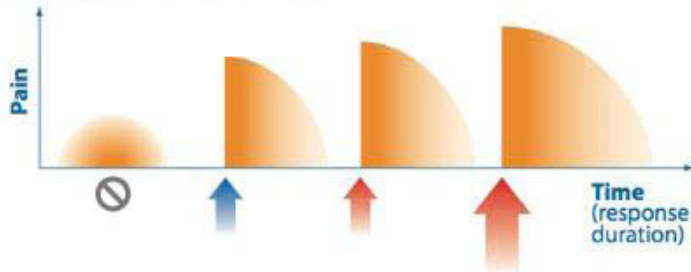


### Neuropathic pain

Nervous system lesion or disease  
Marked neuroimmune response

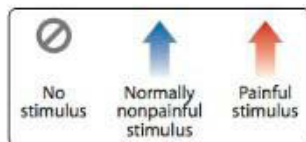
#### Spontaneous and stimulus-dependent pain

Sensory amplification  
Evoked by low- and high-intensity stimuli



#### Maladaptive and commonly persistent

Abnormal amplification maintained  
independent of the lesion or disease



CNS lesion or disease:  
Stroke, spinal cord injury,  
multiple sclerosis

Peripheral  
amplification

PNS lesion or disease:  
nerve trauma, toxic and  
metabolic neuropathies,  
Herpes zoster, AIDS

Central amplification

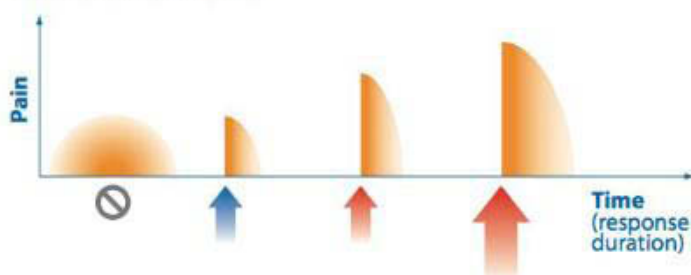
Neuroimmune  
interactions  
in the periphery  
and the CNS

### Dysfunctional pain

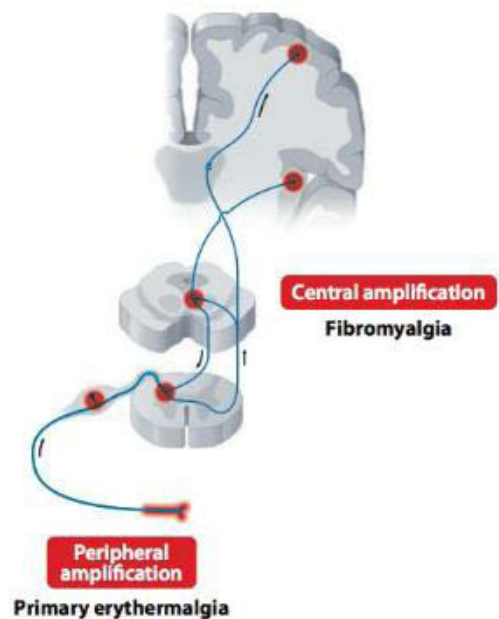
No known structural nervous system lesion or active peripheral inflammation

#### Spontaneous and stimulus-dependent pain

Sensory amplification  
Evoked by low- and high-intensity  
Present with lack of stimulus



#### Maladaptive and potentially persistent



*Figure 4. Types de douleurs en fonction des mécanismes déclenchants. Résumé des principales caractéristiques des syndromes douloureux : nociceptif, inflammatoire, neuropathique et dysfonctionnel. (D'après Costigan et al., 2009).*



La localisation d'une douleur dépend aussi du type de tissus où se situent les récepteurs : douleurs somatiques (récepteurs localisés dans la peau, les articulations ou les muscles squelettiques) ou viscérales (récepteurs localisés dans les parois des vaisseaux sanguins, du tube digestif).

**Douleur somatique** : Elle est produite par l'activation de nocicepteurs somatiques, superficiels ou profonds. Cette douleur est localisée, intense et irradiée selon le trajet des nerfs. La plus fréquente est la douleur osseuse produite notamment par une métastase.

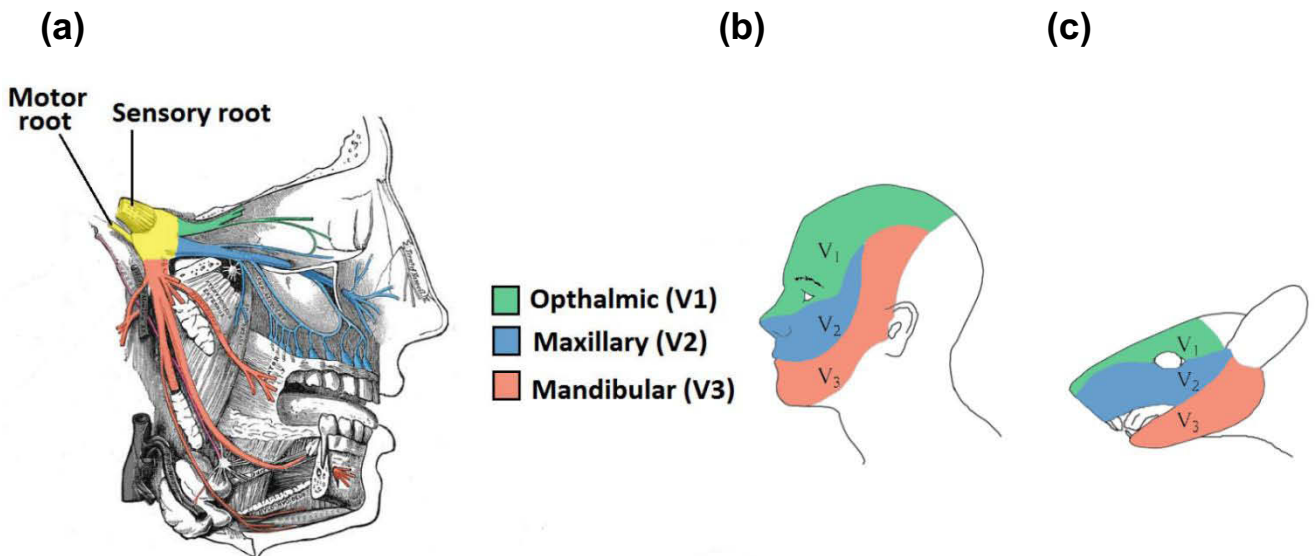
**Douleur viscérale** : Elle est produite pour l'activation de nocicepteurs viscéraux. Cette douleur est profonde, souvent mal localisée, diffuse. Elle peut irradier dans un territoire éloigné de son origine (douleur référée). Par exemple, les douleurs du cancer du pancréas ou des métastases hépatiques.

Parmi les douleurs aiguës ou chroniques les plus communément rencontrées en clinique, se trouvent les douleurs dentaires et plus largement, les douleurs de la sphère orofaciale. Alors que de nombreux travaux se sont concentrés sur les mécanismes médullaires de la douleur, le traitement et la transmission des informations nociceptives par les structures trigéminales du tronc cérébral restent encore peu étudiés. Pourtant, l'étude spécifique du système trigéminal est nécessaire. En effet, comparée à la nociception extra-céphalique, la nociception trigéminal présente de nombreuses spécificités anatomiques et fonctionnelles. Par exemple, les représentations thalamique et corticale de la région orofaciale sont très étendues. De plus les répercussions comportementales et psychologiques d'une douleur à ce niveau sont beaucoup plus importantes que celles des douleurs des autres régions du corps (Light & Perl, 1979, Sessle, 2000). Enfin, l'étude de la nociception trigéminal peut se révéler utile pour l'étude des mécanismes de la douleur, en général, en dehors de toutes notions de localisation (Dallel and Voisin 2007).

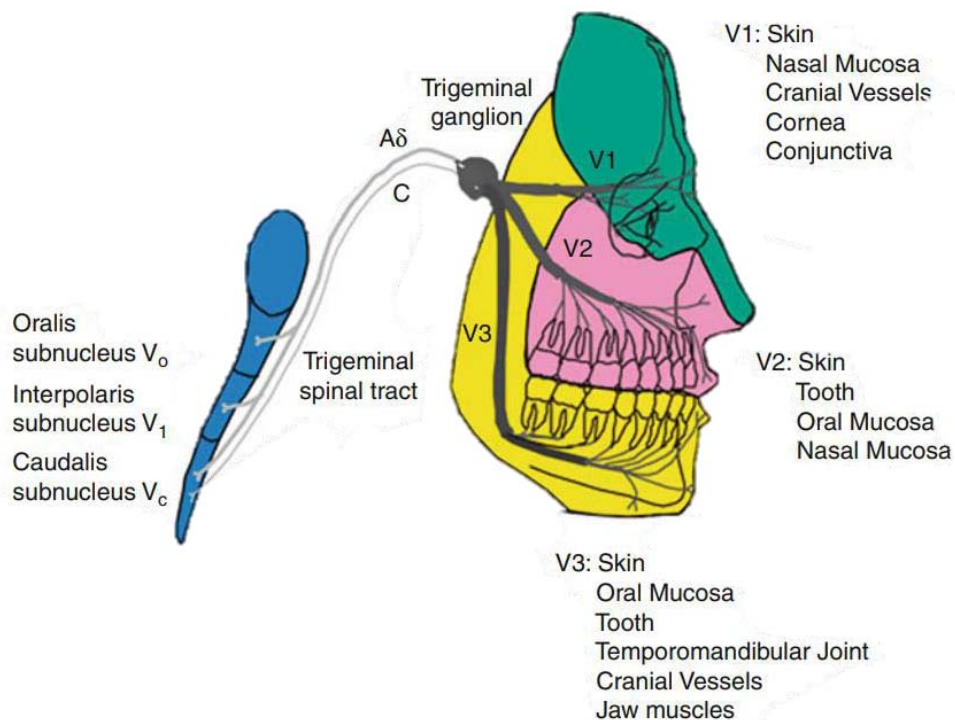
## II. LE SYSTEME TRIGEMINAL :

### ORGANISATION ANATOMIQUE ET FONCTIONNELLE

Le Trijumeau (V<sup>ème</sup> paire de nerfs crâniens) est un nerf mixte dont le rôle essentiel est d'assurer la sensibilité de la face, des muqueuses orale et nasale, des sinus paranasaux, de la cornée, de la pulpe dentaire, de l'articulation temporo-mandibulaire (en Anglais Temporo-mandibular joint ou TMJ), d'une partie de la langue, des muscles masticatoires, comme des méninges et des artères méningées et cérébrales. Son rôle moteur (nerf brachial) est mineur, se limitant aux muscles masticateurs (temporal, masséter, ptérygoïde médial, latéral et la portion antérieure du digastrique), myélo-hyoïdien et tenseur du voile du palais (Carlson *et al.* 2017).



**Figure 5 : Territoires cutanés innervés par le nerf trijumeau.** Schémas illustrant les territoires musculaires et cutanés innervés par les trois branches sensibles du nerf trijumeau (V1 ou nerf ophtalmique [vert] ; V2 ou nerf maxillaire [bleu] et V3 ou nerf mandibulaire [rouge]) chez l'homme (a, b) et chez le rat (c). (D'après Kandel & Schwartz, 1985 et Waite & Tracey, 1995)



**Figure 6 : Diversité des tissus cranio-faciaux innervés par les racines du Trijumeau : V1, V2 et V3.** (D'après Hu & Woda, 2013).

## 1. LE TRIJUMEAU

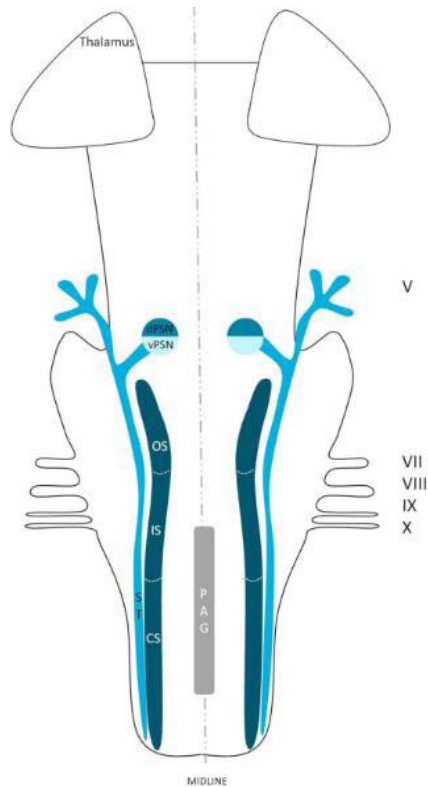
Le Trijumeau émerge du tronc cérébral, au niveau de la protubérance annulaire, par ses deux racines : sensitive, volumineuse, et motrice, grêle.

La racine sensitive est constituée de trois branches (Figures 5 et 6) :

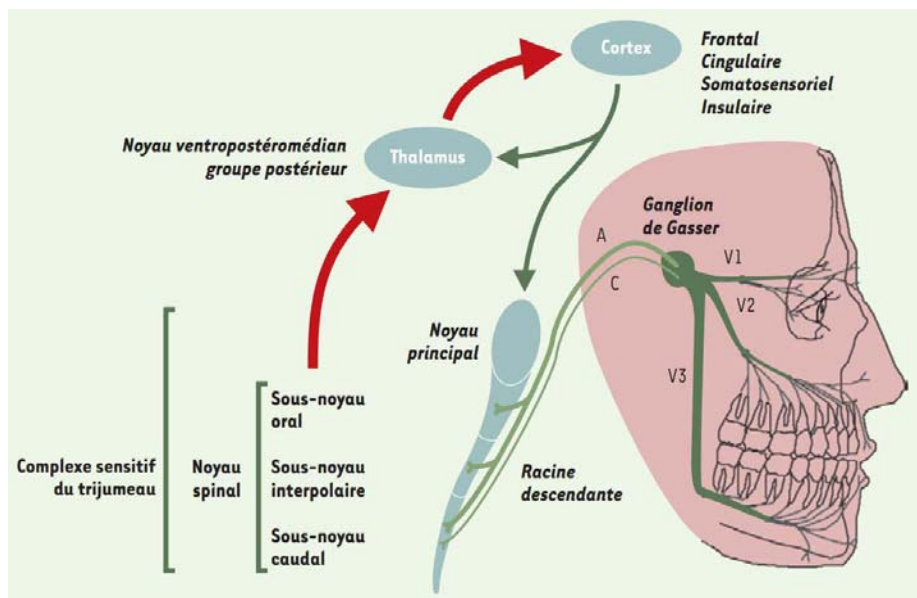
- Le nerf **ophtalmique** ou **V1** sort du crâne par la fente orbitaire supérieure vers le sinus caverneux. Il est exclusivement sensitif, et innerve un territoire cutané, comprenant la partie antérieure de la région temporale, le front, la paupière supérieure et le dos du nez, et un territoire muqueux, comportant les fosses nasales et les sinus éthmoïdaux et frontaux.
- Le nerf **maxillaire** ou **V2** assure l'innervation sensitive de la partie moyenne de la face. Il sort du crâne par le grand foramen rond. Il comporte trois branches : (i) le nerf infra-orbitaire, qui innerve la paupière inférieure, l'aile du nez, la lèvre supérieure et la joue, (ii) le nerf alvéolaire supérieur, qui innerve les dents et le vestibule maxillaire, et enfin (iii) le nerf ptérygopalatin, qui innerve les muqueuses de l'amygdale, du voile du palais, de la voûte palatine, des sinus maxillaires et des fosses nasales.
- Le nerf **mandibulaire** ou **V3** sort du crâne par le foramen ovale. C'est un nerf mixte sensitivo-moteur qui possède des efférences motrices, contrôlant les mouvements de la mastication, et des afférences sensitives. Ces dernières innervent à la fois un territoire cutané, temporal, jugal, labial et mentonnier, incluant aussi la partie antérieure du pavillon de l'oreille et le conduit auditif externe, et un territoire muqueux, lingual (2/3 antérieur), labial et vestibulo-mandibulaire. Il innerve aussi les dents mandibulaires et l'articulation temporo-mandibulaire.

A noter que d'autres nerfs contribuent à l'innervation sensitive de la tête et du cou. Le plexus cervical supérieur (C2) assure la sensibilité du cou, de la partie postérieure du crâne et de l'angle mandibulaire. Les nerfs facial (VII), glossopharyngien (IX) et vague (X) innervent la région cutanée autour du conduit auditif externe. Le VII innerve aussi les 2/3 antérieurs de la langue (sensibilité gustative), le IX, le 1/3 postérieur de la langue et le pharynx, et le X, le larynx, une partie du pharynx et l'épiglotte.

Les trois branches du Trijumeau, ophtalmique, maxillaire et mandibulaire, convergent vers le ganglion trigéminal (ou de Gasser) où se trouvent les corps cellulaires des neurones de 1<sup>er</sup> ordre somato-sensoriels du Trijumeau. Par contre, les corps cellulaires des neurones de 1<sup>er</sup> ordre proprioceptifs (fibres de gros diamètre ; groupes I et II), d'origine articulaire ou musculaire, sont situés dans le noyau mésencéphalique. A noter qu'alors que les ganglions rachidiens ne semblent pas présenter d'organisation anatomique, le ganglion trigéminal, lui, possède une organisation somatotopique : les corps cellulaires des afférences mandibulaires sont en position dorsale, ceux des afférences ophtalmiques, en position ventrale, et ceux des afférences maxillaires, entre les deux (Arvidsson, Pfaller *et al.*, 1992; Aigner *et al.*, 2000; Chai *et al.*, 2014).



**Figure 7 : Anatomie du complexe sensitif du trijumeau.** Portions dorsale (Dpsn) et ventrale (vPSN) du noyau principal ; sous-noyaux oral (OS), interpolaire (IS) et caudal (CS) du noyau spinal; ST: tractus spinal ; PAG: substance grise périaqueductale ; V: nerf trijumeau. VII: nerf facial ; VIII: nerf vestibulo cochléaire ; IX: nerf glossopharyngien. X: nerf vague. (D'après Henssen et al., 2016).



**Figure 8 : Organisation du complexe sensitif du trijumeau et de ses connexions.** Les flèches rouges indiquent les voies ascendantes issues du complexe sensitif du Trijumeau ou du thalamus, et les flèches vertes, les voies descendantes issues du cortex. A : fibres A ; C : fibres C ; V1 : nerf ophtalmique ; V2 : nerf maxillaire ; V3 : nerf mandibulaire (D'après Dallel, 2003).

## **2. LE COMPLEXE SENSITIF DU TRIJUMEAU**

### **2.1. Le complexe sensitif du trijumeau : organisation anatomique**

Les informations somesthésiques (douleur, température, proprioception et tact) du territoire orofacial aboutissent au complexe sensitif du Trijumeau, où les neurones de 1<sup>er</sup> ordre font synapse avec ceux de 2<sup>ème</sup> ordre. Ce complexe sensitif du Trijumeau s'étend tout au long du tronc cérébral, depuis l'extrémité caudale du mésencéphale jusqu'aux premiers segments cervicaux. Il est composé de deux noyaux : rostral ou principal (plus spécifiquement dédié aux informations non nociceptives) et caudal ou spinal. Ce dernier est lui-même subdivisé en trois sous-noyaux (du plus rostral au plus caudal) : oral (Sp5O), interpolaire (Sp5I) et caudal (Sp5C) (Henssen *et al.*, 2016) (Figure 7).

Dès leur entrée dans le tronc cérébral, les fibres afférentes primaires se subdivisent en deux branches : ascendante, vers le noyau principal, et descendante, qui abandonne en cours de trajet de nombreuses collatérales vers les différents sous-noyaux du noyau spinal du complexe sensitif du Trijumeau. Les projections des afférences primaires diffèrent selon leur modalité et le tissu qu'elles innervent. Parmi les fibres myélinisées de gros diamètre, les afférences cutanées (fibres A $\beta$ ) se projettent sur l'ensemble du complexe sensitif du Trijumeau alors que les afférences proprioceptives musculaires ou articulaires (groupes I et II) – dont les corps cellulaires, rappelons-le, siègent dans le ganglion mésencéphalique – se terminent essentiellement au niveau du noyau principal et du sous-noyau oral (Shigenaga *et al.*, 1988; Capra & Wax, 1989). Les fibres myélinisées de petit diamètre d'origine cutanées (fibre A $\delta$ ) se projettent sur les trois sous-noyaux du noyau spinal alors que celles qui proviennent des muscles (groupe III) n'aboutissent qu'au Sp5C. Enfin, quelle que soit leur origine, les fibres non myélinisées (de type C et groupe IV) se terminent exclusivement dans le Sp5C (Nishimori *et al.*, 1986) (Figure 8). Le sous-noyau Sp5C est donc la seule région du complexe sensitif du Trijumeau à recevoir l'ensemble des fibres somato-sensorielles, de type A $\beta$ , A $\delta$  et C.

A noter qu'en plus des afférences du V, le complexe sensitif du V reçoit des afférences d'autres nerfs crâniens (VII, IX et X), ainsi que des nerfs cervicaux supérieurs.

### **2.2. Le complexe sensitif du Trijumeau : organisation fonctionnelle**

Dans le complexe sensitif du Trijumeau, le noyau principal et le sous-noyau Sp5I relaient les sensibilités tactiles discriminative et proprioceptive et les sous-noyaux Sp5O et Sp5C, la nociception.

On observe en effet chez des patients souffrant d'une lésion bulbaire, détruisant le noyau spinal mais épargnant la partie rostrale du complexe trigéminal, une réduction ou perte des sensibilités nociceptive et thermique sans altération de la sensibilité tactile (Wilson, 1923). De même, chez l'homme comme chez l'animal, une tractotomie, 4–8 mm en arrière de l'obex, à hauteur du Sp5C, produit une anesthésie thermo-algésique du côté lésé sans altération de la sensibilité tactile (Wilson, 1923).





L'expérimentation animale confirme bien que toutes manipulations du Sp5C, que ce soit par tractotomie, injection de lidocaïne ou application d'antagonistes des récepteurs NMDA ou d'opioïdes au niveau de l'obex, altère les réponses nociceptives de la face : réponses comportementales, reflexe des muscles de la mâchoire ou électrophysiologiques des neurones thalamo-corticaux à une stimulation cutanée douloureuse de la face (Young & Perryman, 1984 ; Dallel *et al.*, 1989; Raboisson *et al.*, 1989; Duale *et al.*, 1996; Luccarini *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 1999; Cairns *et al.*, 2001). Ainsi, les lésions de la branche descendante du nerf trijumeau et du Sp5C peuvent se révéler efficaces contre les douleurs faciales atypiques rebelles à tous traitements (Kanpolat *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent donc un rôle prééminent du Sp5C dans la douleur orofaciale,

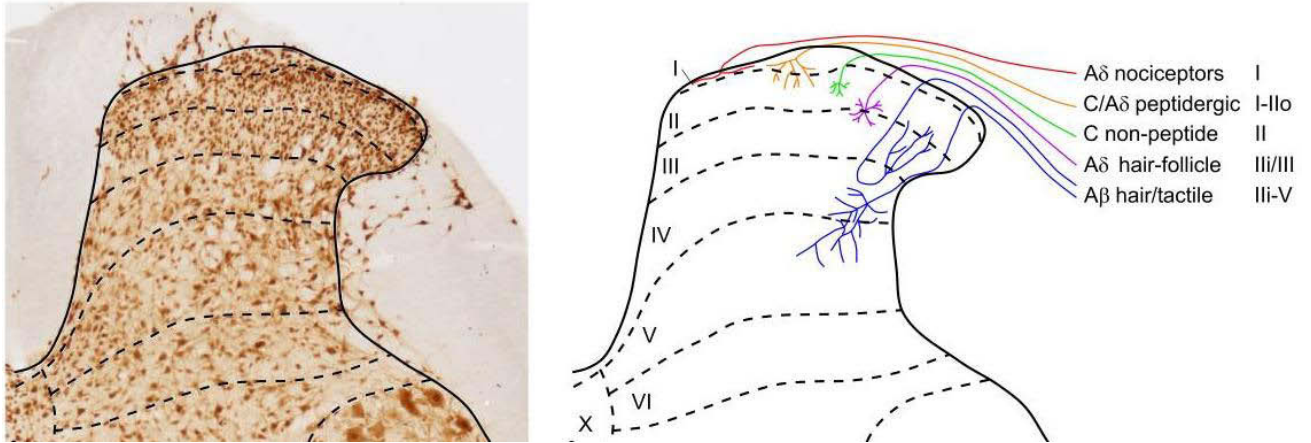
Cependant, l'étude de patients présentant des lésions à divers niveaux de la protubérance du tronc cérébral révèle que la partie rostrale du noyau spinal joue aussi un rôle dans la sensibilité douloureuse intraorale et dentaire (Graham *et al.*, 1988). Chez l'animal, une tractotomie de l'obex n'a aucun effet sur les réponses comportementales (Vyklícky *et al.*, 1977 ; Young & Perryman, 1984), le seuil d'ouverture réflexe de la mâchoire (Dallel *et al.*, 1989; Pajot *et al.*, 2000) ou la réponse des neurones du thalamus ventro-basal (Raboisson *et al.*, 1989) à une stimulation de la pulpe dentaire, suggérant que la sensibilité douloureuse intraorale implique aussi le Sp5O. Cette conclusion est cohérente avec la richesse des afférences pulpaire et intraorales vers le Sp5O et l'existence de champs récepteurs péri- ou intra-oraux, incluant souvent la pulpe dentaire, pour ces neurones du Sp5O (pour revue Dostrovsky & Sessle, 2006; Sessle, 2000).

### **2.3. Le sous-noyau caudal du Trijumeau (Sp5C)**

#### **2.3.1 Organisation anatomique du Sp5C**

Le Sp5C présente plusieurs cartes somatotopiques. D'une part, la ségrégation entre branches du Trijumeau observée dans le ganglion de Gasser se maintient au niveau du Sp5C : les afférences primaires du V1 se terminent dans la portion dorso-médiane du Sp5C, celles du V3, dans sa portion ventro-latérale, et celles du V2, entre les deux (Nakajima *et al.*, 2011). D'autre part, on a pu décrire chez l'homme et le macaque une organisation somatotopique du Sp5C en « peau d'oignon », où les fibres afférentes provenant de la région orale se projettent en rostral et celles provenant des régions latérales de la face, en caudal (Olszewski, 1950).

De plus, le Sp5C présente une cyto-architecture laminaire, identique à celle de la DH – décrite initialement chez le chat (Rexed, 1952) et depuis chez d'autres espèces dont le rat, le singe et l'homme. La DH comporte six couches parallèles en fonction de la taille, la morphologie et la densité des neurones (Figure 9). Les couches I-II sont souvent appelées couches superficielles et les couches III-VI, couches profondes (pour revue voir Todd 2010). Le Sp5C ne présente que les cinq premières des couches de la DH (Olszewski 1950 ; Kerr, 1970). On décrit ainsi de la superficie vers la profondeur :



**Figure 9 : Organisation lumineuse des projections afférents primaires dans la corne dorsale de la moelle épinière.** Rexed divise la matière grise de la corne dorsale chez le chat en une série de couches parallèles en fonction de la taille et de la densité des neurones. Ce schéma a été depuis généralisé à d'autres espèces. À gauche : Une section transversale de la moelle épinière, immuno-marquée avec l'anticorps anti-NeuN (neurones). Les limites des couches sont indiquées par des lignes noires. Les couches I et II (zone marginale et substance gélatineuse, respectivement) constituent la corne dorsale superficielle, caractérisées par la présence de petits neurones. La couche II peut être sub-divisée en couche II externe (IIe) et II interne (IIIi), la seconde possédant moins de neurones que la première. À droite : Fibres afférents A $\beta$ , « tactiles » aboutissent dans les couches III-V, avec quelques extensions dans la couche IIIi. Les fibres afférentes A $\delta$ , provenant des follicules pileux, se terminent de chaque côté de la limite couches II-III et celles nociceptives, principalement dans les couches I et IIo, et un peu dans les couches V et X (afférences viscérales). Les fibres afférentes C peptidergiques finissent principalement dans les couches I et IIe alors que les fibres afférentes C non-peptidergiques forment une bande dans la couche IIIi (D'après Todd 2010).

- **La couche I ou zone marginale.** Elle est très fine, quasi unicellulaire, et présente une très faible densité de cellules. Elle associe interneurons et neurones de projection, à l'origine d'une des deux voies majeures de transmission de l'information douloureuse du Sp5C/DH vers les structures supra-segmentaires. Chez le rat, environ 80% des neurones de projection de la couche I expriment le récepteur neurokinine 1 (NK1) à la substance P (Marshall *et al.*, 1996 ; Todd *et al.*, 2000). La destruction spécifique de ces neurones, par l'injection de substance P-saporine, inhibe les hyperalgies, mécanique et thermique, observées dans des modèles animaux de douleur inflammatoire ou neuropathique (Mantyh *et al.*, 1997 ; Nichols *et al.*, 1999), et modifie le codage des stimuli, mécanique et thermique (chaud), par les neurones 'wide dynamic range ou WDR' des couches profondes (voir ci-dessous) (Suzuki *et al.*, 2002). Par contre, ni les seuils en conditions basales, ni l'effet antalgique de la morphine ne sont altérés (Nichols *et al.*, 1999 ; Suzuki *et al.*, 2002).
- **La couche II ou substance gélatineuse de Rolando** (à cause de son apparence translucide due à l'absence de fibres myélinisées). Elle est uniquement constituée d'interneurones. Elle est plus dense que la couche I, avec des cellules de taille relativement petite mais homogène. Cette couche II est elle-même subdivisée en une partie externe (Iie) et une partie interne (Iii), la première ayant une densité cellulaire plus grande que la seconde. Dans cette couche Iii se trouvent des interneurons spécifiques exprimant l'isoforme  $\gamma$  de la protéine kinase C (PKC $\gamma$  ; Tanaka & Saito 1992; Malmberg *et al.*, 1997; Peirs *et al.*, 2014) et formant la moitié des neurones excitateurs de cette couche (Peirs *et al.*, 2014).
- **Les couches III-V ou couches profondes.** Elles sont composées, pour l'essentiel, d'interneurones et, dispersés, de neurones de projection. Elles forment la couche magnocellulaire du Sp5C (Fukushima & Kerr, 1979). Les neurones de projection des couches profondes (III-V pour Sp5C ; III-VI pour DH) contribuent à la seconde voie du Sp5C/DH vers les structures supra-segmentaires (Koltzenburg & Scadding, 2001).

Soulignons ici que la très grande majorité (>95 %) des neurones du Sp5C/DH sont des interneurons (Polgar *et al.*, 2004; Spike *et al.*, 2003; Willis & Coggeshall, 2004)

### 2.3.2 *Projections des fibres afférentes primaires sur le Sp5C*

Les projections des afférences primaires sur le Sp5C/DH dépendent avant tout du type d'information que ces afférences véhiculent – douloureuse, thermique ou prurigineuse ou mécanique à bas seuil (en Anglais : 'low-threshold mechanoreceptors' ou LTMR) – puis de leur origine – cutanée, articulaire, musculaire, viscérale –, de leur vitesse de conduction – fonction de leur diamètre et de la présence de myéline – et de leur phénotype neurochimique – présence ou non de neuropeptides. En effet, si les fibres A $\beta$  (myélinisées, de grand diamètre) sont toujours des mécanorécepteurs à bas seuil ou LTMRs, les fibres A $\delta$  (myélinisées, de petit diamètre) et C (non myélinisées, de petit diamètre) peuvent être des LTMRs ou véhiculer les sensibilités douloureuses, mécanique à haut seuil, thermique ou prurigineuse. Les premières (A $\delta$ /C LTMRs) se projettent dans les couches profondes (Iii-V) et les secondes (A $\delta$ /C mécaniques à haut seuil, thermiques et prurigineuses) dans les couches superficielles (I-Iii) du Sp5C. Plus précisément (Todd, 2010 ; Li *et al.*, 2011) (Figure 9) :



- Les **mécano-récepteurs à bas seuil, A $\beta$ -, A $\delta$ - ou C-LTMR**. Ils se terminent dans les couches profondes (III-V), les uns en dessous des autres, tout au moins chez la souris (Li *et al.*, 2011). Ainsi les C-LTMRs qui véhiculent le toucher plaisant et expriment le transporteur vésiculaire glutamatergique de type 3 (VGLUT3) (Seal *et al.*, 2009) se projettent dans la couche Iii (Seal *et al.*, 2009 ; Larsson & Broman, 2019). Les fibres A $\delta$ -LTMRs, qui innervent notamment les follicules pileux ('D-hair afférents'), se terminent dans la couche Iii et la partie superficielle de la couche III. Les A $\beta$ -LTMR aboutissent principalement dans les couches III-V, avec des extensions dans la couche Iii (Light & Perl, 1979).
- Les **fibres A $\delta$  et C qui véhiculent l'information nociceptive, mécanique à haut seuil, thermique ou prurigineuse, cutanée**. Elles font synapse sur des neurones de 2<sup>ème</sup> ordre dans les couches superficielles (I-II). Ces fibres C ont été initialement sub-divisées en deux sous-types principaux : peptidergique – exprimant le calcitonin gene-related peptide (CGRP) et le récepteur à la neurotrophine TrkA – et non peptidergique, reconnues classiquement par la présence sur leur membrane d'un site de liaison pour l'isolectine B4 (IB4). Mais une nouvelle classification des neurones somatosensoriels, basée sur une analyse non-biaisée du transcriptome RNA (Usoskin *et al.*, 2015; Zeisel *et al.*, 2018), identifie au moins cinq sous-types de fibres C: trois non-peptidergiques (NP1-3), un peptidergique (PEP1) et un thyrosine hydroxylase positif (TH), ce dernier correspondant aux C-LTMRs (Usoskin *et al.*, 2015). De plus, beaucoup de neurones CGRP<sup>+</sup>/TrkA<sup>+</sup> se révèlent être en fait de fines fibres myélinisées A $\delta$  (le type PEP2 d'Usoskin *et al.*, 2015). Les fibres peptidergiques innervent les couches I et Iie, et les fibres non-peptidergiques, la couche Iii du Sp5C/DH.

D'un point de vue fonctionnel, dans la couche I, les fibres nociceptives contactent en partie des neurones de projection qui contribuent directement aux voies spino-parabrachiale, spino-réticulaire et spino-thalamique. La sensibilisation (centrale) de ces neurones de 2<sup>ème</sup> ordre est associée à une hyperalgésie mécanique et thermique (Mayer *et al.*, 1975; Dubner *et al.*, 1989; Simone *et al.*, 1991 ; Craig 2003; Ikeda *et al.*, 2003;2006; Ruscheweyh *et al.*, 2006). Dans la couche II, au contraire, ces fibres font synapse sur des interneurons et n'activent donc que des circuits polysynaptiques locaux (pour revue voir Basbaum *et al.*, 2009; Braz *et al.*, 2014). Vraisemblablement, les processus localisés dans la couche II permettent un traitement de l'information sensorielle avant son transfert vers les structures supra-segmentaires (Lu & Perl, 2005).

- Enfin les **fibres afférentes primaires d'origine profonde (viscérale ou méningée)** sont toutes nociceptives. Les fibres A $\delta$  viscérales se terminent dans les couches I, IV et V et les fibres C viscérales, toutes peptidergiques, dans les couches I, II, V et X (Basbaum *et al.*, 2009). De façon générale, les projections centrales des fibres nociceptives d'origine cutanée se font de façon dense et focalisée alors

que celles des fibres profondes sont beaucoup plus diffuses. Ces différences pourraient expliquer le caractère diffus des douleurs d'origine profonde (Sugiura *et al.*, 1989).



### 2.3.3. Propriétés fonctionnelles des neurones du Sp5C

En accord avec l'organisation des terminaisons trigéminales afférentes primaires, les neurones trigéminaux de 2<sup>ème</sup> ordre des couches superficielles, sur lesquels se projettent les fibres A $\delta$  et C nociceptives, répondent essentiellement à des stimulations nociceptives, thermiques ou prurigineuses alors que ceux des couches plus profondes sont activés par des stimulations tactiles légères (neurones de la couche III ; via des afférences LTMRs) ou des stimulations à la fois nociceptives et non-nociceptives (neurones des couches IV-V ; zone de convergence d'afférences monosynaptiques A $\beta$  et polysynaptiques A $\delta$  et C nociceptives) (Willis & Coggeshall, 2004). Les neurones répondant aux stimulations mécaniques à bas seuil (tactiles) ont des champs récepteurs cutanés et muqueux de petites tailles (Sessle, 2000)

Comme dans la DH, on distingue plusieurs classes de neurones nociceptifs dans le Sp5C, en fonction des caractéristiques de leur réponse et de leur champ récepteur (CR) :

- Les neurones **nociceptifs spécifiques** ou '**Noxious specific**' (NS). Localisés dans les couches superficielles (I-II), ils répondent exclusivement à des stimulations nociceptives, mécanique et/ou thermique, ou prurigineuses, possèdent des CRs de petites tailles et sont activés uniquement par les fibres C et A $\delta$  (Basbaum & Braz, 2010).
- Les neurones à **convergence** ou **nociceptifs non-spécifiques** ou '**Wide dynamic range**' (WDR). Localisés principalement dans la couche V, ils répondent aussi bien à des stimuli mécaniques légers, non nociceptifs qu'à des stimuli nociceptifs, mécanique et/ou thermique. Ils sont ainsi d'abord activés par des fibres de type A, pour des stimulations de faibles intensités, puis par des fibres de petit diamètre, A $\delta$  et C, par voie polysynaptique, pour des stimulations d'intensités plus élevées. Ils codent donc remarquablement l'intensité des stimulations, électrique ou mécanique (Dallel *et al.*, 1999). Leurs CR cutané est complexe : dans sa partie centrale, le neurone répond à tous types de stimuli, nociceptif ou non, alors qu'en périphérie, il ne répond qu'à des stimuli nociceptifs véhiculés par des fibres A $\delta$  et C (Basbaum & Braz, 2010 ; Iwata *et al.*, 2011). Enfin, ces neurones WDRs présentent le phénomène de wind-up (pour revue voir Herrera *et al.*, 2002). Il s'agit d'un processus de sensibilisation centrale à court terme, se manifestant par une potentialisation progressive de la réponse des neurones à une stimulation des afférences primaires de type C, constante et de fréquence faible (environ 1 Hz). Ce phénomène pourrait conférer aux neurones WDR la possibilité de coder l'intensité de stimuli nociceptifs très brefs ou même d'en détecter d'infraliminaires (Coste *et al.*, 2008).

A noter ici, que le Sp5O, l'autre sous-noyau trigéminal impliqué dans la nociception (orale), comporte aussi ces deux types de neurones nociceptifs, NS et WDR. Cependant les WDR y sont fortement majoritaires. Le Sp5O peut ainsi être considéré comme un équivalent fonctionnel d'une couche V de Sp5C/DH (Besson & Chaouch, 1987). Dans le Sp5O, la réponse des neurones WDR est facilitée par l'inflammation ou la déafférentation (Hu *et al.*, 1992; 1999) et présentent un phénomène de wind-up particulièrement développé (Dallel *et al.*, 1999; Coste *et al.*, 2008).



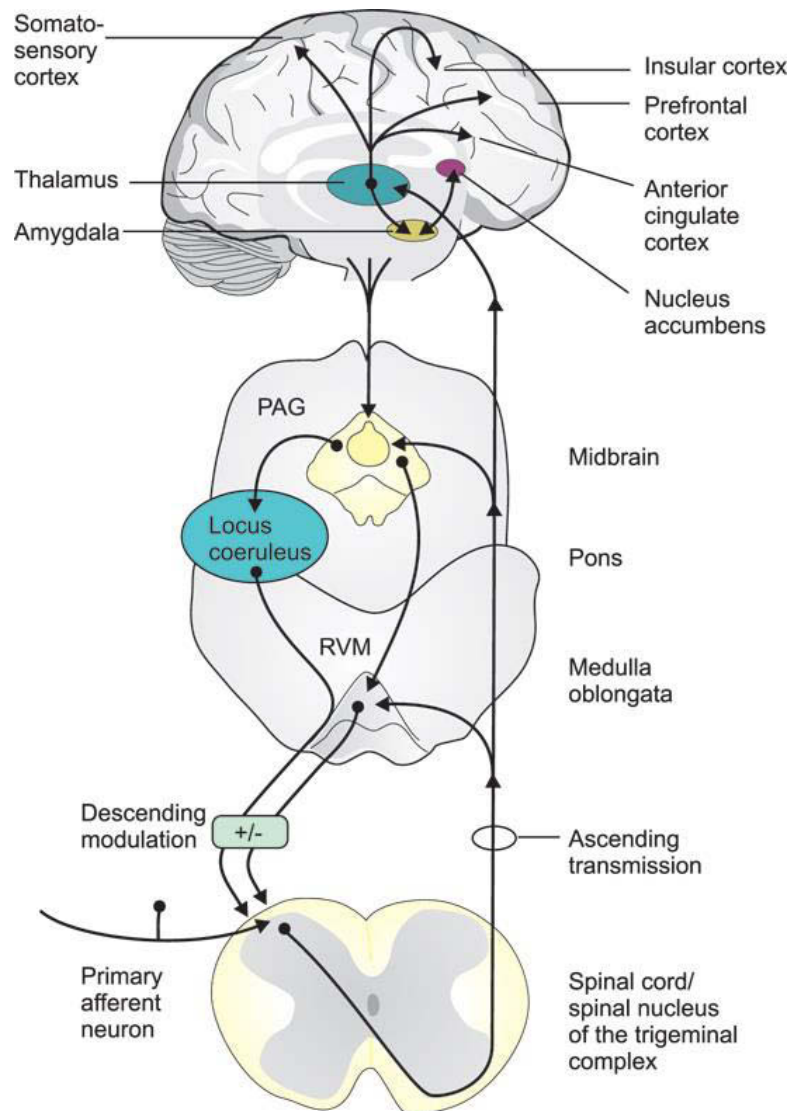


Les neurones NS et WDR du Sp5C, avec leur CR cutané, jouent donc un rôle important dans la discrimination et la localisation des stimuli nociceptifs cutanés (Klineberg, 1985; Julius, 2002). Mais le Sp5C est aussi un lieu de grande convergence pour les afférences provenant de tissus de la sphère orofaciale aussi divers que la peau, les muqueuses et les tissus profonds (pulpe dentaire, articulation temporo-mandibulaire, muscles ou méninges). Dans le Sp5C, 70% des neurones enregistrés possèdent un champ récepteur cutané pur, 20%, des champs récepteurs cutanés et profonds et seulement 10%, uniquement un champ récepteur profond (Yu *et al.*, 1993). Ainsi, la majorité des neurones dits « profonds » possèdent aussi un champ récepteur cutané ou « superficiel » : ils contribuent donc aussi à la douleur référée. De plus, l'activation de ces afférences nociceptives profondes (Hu *et al.*, 1992) ou une inflammation périphérique (Dallel *et al.*, 1988) provoque une expansion des CRs, profond et cutané. Cela expliquerait qu'une douleur des tissus profonds, référée au niveau cutané, soit plus difficile à diagnostiquer au niveau orofacial que dans le reste du corps. Notons enfin qu'il existe des différences entre sexes dans la réponse à une douleur orofaciale, la sensibilisation centrale ou la douleur référée (Dostrovsky *et al.*, 1991; Sessle, 2000; Okamoto *et al.*, 2003).

#### **2.3.4. Projections du Sp5C**

Les axones des neurones de 2<sup>nd</sup> ordre traversent la ligne médiane et se projettent sur le thalamus et diverses autres aires situées dans le tronc cérébral dont le noyau réticulaire latéral, l'aire parabrachiale et la substance réticulée péri-aqueducule (pour revue voir Basbaum *et al.*, 2009 ; Todd *et al.*, 2000) (Figure 10).

Cependant, contrairement aux inputs nociceptifs provenant du reste du corps, toutes les projections nociceptives trigéminales ne traversent pas la ligne médiane, 20% restant ipsilatérales ; ainsi une partie de l'information nociceptive de la sphère orofaciale et des méninges reste ipsilatérale (Nieuwenhuys & van Huijzen 2008 ; Henssen *et al.*, 2016). De plus, alors que dans la moelle épinière presque toutes les afférences sensibles forment un premier relai dans la DH ou les noyaux de la colonne dorsale, de nombreuses afférences trigéminales se projettent directement sur plusieurs aires du SNC aux fonctions très différentes comme la moelle épinière, dans sa portion cervicale, des noyaux du tronc cérébral tels que le noyau du faisceau solitaire ou le complexe péri-brachial qui contrôlent le système autonome ou les noyaux vestibulaires, latéral et supérieur, et même le cervelet (Marfurt & Rajchert , 1991; Panneton *et al.*, 1994). Très récemment, a même été découverte une connection monosynaptique entre afférences craniales et noyau parabrachial latéral (Rodriguez *et al.*, 2017).



**Figure 10. Voies ascendantes et descendantes et régions du cerveau impliquées dans la transmission et la modulation de la douleur.** Les neurones de 1<sup>er</sup> ordre se projettent sur les neurones de 2<sup>ème</sup> ordre du Sp5C/DH. Les axones des neurones de 2<sup>ème</sup> ordre traversent la ligne médiane et se projettent sur le thalamus et diverses autres régions du tronc cérébral dont la médulla ventrale rostrale (RVM) et la substance grise périaqueducale (PAG). Les neurones thalamiques de 3<sup>ème</sup> ordre se projettent sur diverses aires corticales dont le cortex somatosensoriel primaire (composante sensori-discriminative), les cortex insulaire (IL) et cingulaire antérieur (ACC) (composante affectivo-emotionnelle) et le cortex préfrontal (PFC) (composante cognitivo-evaluative). Ces neurones de 3<sup>ème</sup> ordre envoient également des projections sur l'amygdale, qui à son tour interagit avec le noyau accumbens (NAc), une région impliquée à la fois dans le traitement de la douleur et le comportement motivationnel. Ces différentes régions du cerveau projettent en retour sur la PAG qui, via les noyaux de raphé dans la RVM et le locus coeruleus (LC), envoie des projections descendantes qui viennent moduler la transmission de l'information nociceptive, notamment au niveau de la 1<sup>ère</sup> synapse entre neurones de 1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> ordre (D'après Brodin et al. 2016).

Toutes ces aires projettent à leur tour vers d'autres régions cerveau. Pour ce qui est du thalamus, les neurones nociceptifs de 3<sup>ème</sup> ordre se projettent sur plusieurs aires corticales, notamment les cortex somatosensoriels, primaire et secondaire (S1 et S2), pour la composante sensori-discriminative de la douleur et les cortex cingulaire antérieur (ACC) et insulaire (IL) pour la composante affectivo-émotionnelle de la douleur. L'ensemble des aires qui participent au codage de la douleur ont été réunie sous le terme de 'pain matrix' (pour revue voir Garcia-Larrea & Peyron, 2013). Comparée aux représentations corticales des autres régions du corps, celle de la région orofaciale est particulièrement étendue (Sessle, 2000).

### 2.3.5 Contrôles descendants du Sp5C

L'information nociceptive en provenance de la peau, des muqueuses et des tissus profonds de la sphère orofaciale est soumise à un traitement extensif dans le Sp5C par une grande diversité de mécanismes qui modulent son transfert final vers les centres supérieurs du cerveau. Parmi ces mécanismes figure tout un réseau de projections descendantes, des structures cérébrales vers le Sp5C, qui par leur mise en jeu peuvent supprimer (inhibition descendante) ou, au contraire, potentialiser (facilitation descendante) le passage des messages nociceptifs vers le cerveau (pour revue voir Millan, 2002 ; Merrill, 2007) (Figure 10). Ainsi, les projections dopaminergiques (DA), issues du noyau A11 de l'hypothalamus, sont responsables d'une inhibition tonique de la nociception trigéminal par l'intermédiaire de l'activation de récepteurs à la dopamine de type D2 (Lapirot *et al.*, 2011 ; Abdallah *et al.*, 2013 ). Au contraire, les projections en provenance de la medulla rostro-ventrale (en Anglais 'rostral ventromedial medulla' ou RVM) (Edelmeyer *et al.*, 2009 ; Boyer *et al.*, 2017 ), celles serotoninergiques (5-HT) en provenance du noyau du *Raphe magnus*, (Alba-Delado *et al.*, 2018) ou celles noradrenergiques (NA), en provenance du *Locus coeruleus*, (Boyer *et al.*, 2017), jouent au contraire un rôle facilitateur sur la nociception trigéminal.

Ces voies descendantes interviennent en particulier dans les 'Contrôles Inhibiteurs Diffus Nociceptif' (en Anglais 'Diffuse Noxious Inhibitory Controls' ou DNIC), processus par lequel une douleur peut en masquer une autre. Ces DNIC peuvent être déclenchés par une stimulation depuis n'importe quel territoire corporel (stimulation hétérotopique) distinct des territoires activés par la douleur, y compris à partir d'un territoire viscéral, à la condition que cette stimulation hétérotopique soit douloureuse. Cette stimulation nociceptive périphérique active les voies ascendantes de la douleur qui en retour recrutent des projections inhibitrices descendantes qui viennent inhiber la réponse des neurones nociceptifs (Le Bars (1979). Cette inhibition concerne l'ensemble des dermatomes, à l'exclusion de celui de la stimulation conditionnante (Willer *et al.*, 1999). Les voies ascendantes et descendantes de cette boucle inhibitrice sont respectivement localisées dans le cadran ventro-latéral et dans le funiculus dorso-latéral de la moelle épinière (Willer *et al.*, 1999). Le fait que la section de la moelle supprime les DNIC suggère que ce mécanisme implique des structures supra-segmentaires. Ces structures, impliquées notamment dans les DNIC trigéminaux, sont localisées dans la partie caudale du tronc cérébral comme le sous-noyau réticulaire dorsal, le noyau parabrachial (Lapirot *et al.*, 2009), le noyau hypothalamique A11 (Lapirot *et al.*, 2011) et le noyau du *Raphe magnus* (Chebbi *et al.*, 2013).



### III. PARTICULARITES DU SYSTEME TRIGEMINAL

La douleur trigéminal est la forme la plus commune de douleur aigue. Chacun de nous a éprouvé des douleurs dentaires, que ce soit lors d'une éruption dentaire, d'une pulpite ou à la suite d'un acte chirurgical. Pourtant, bien que les actes de chirurgie dentaire amènent très fréquemment à des lésions nerveuses, les douleurs neuropathiques y sont moins fréquentes qu'ailleurs dans le corps (Macfarlane *et al.*, 2002 ; Bouhassira *et al.*, 2008). Mais, si elles sont rares, les douleurs trigéminales peuvent être très intenses (e.g. la névralgie essentielle du Trijumeau ou l'algie vasculaire de la face). De plus, qu'elle soit aigue ou chronique, inflammatoire ou neuropathique, la douleur trigéminal est constamment associée avec une anxiété et/ou une dépression. La douleur trigéminal est ainsi très invalidante. Ces particularités peuvent tenir à la grande diversité de tissus innervés et à l'organisation complexe du noyau spinal du Trijumeau.

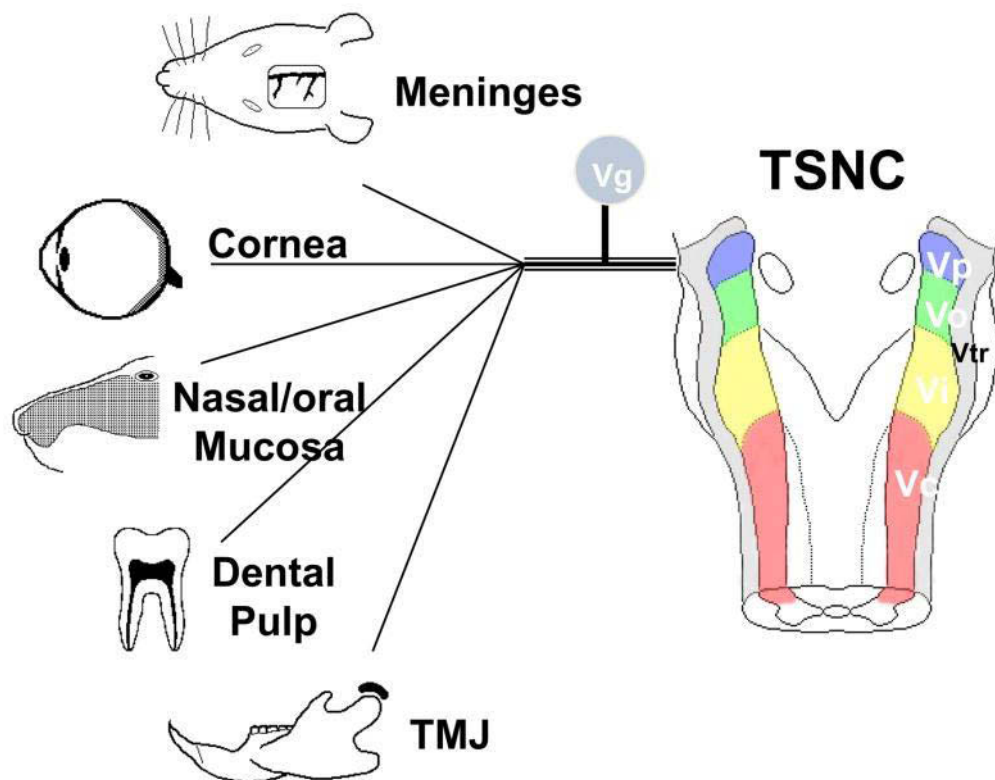
#### 1. UNE GRANDE DIVERSITE DE TISSUS CRANIO-FACIAUX INNERVES

Le Trijumeau innerve une grande diversité de tissus dans le territoire oro-facial comme la peau, les muqueuses, les méninges, la pulpe dentaire, l'articulation temporo-mandibulaire, ... (Figure 11), ayant des fonctions et des sensibilités aux stimuli nociceptifs très différentes (pour revue voir Sessle 2000; Bereiter *et al.*, 2002; Hu & Woda, 2013).

##### 1.1. L'articulation temporomandibulaire et les muscles masticateurs

L'articulation temporo-mandibulaire (en Anglais Temporo-mandibular joint ou TMJ) et les muscles masticateurs sont très richement innervés. Les désordres temporo-mandibulaires sont beaucoup plus fréquents chez la femme que chez l'homme (Gonçalves *et al.*, 2010), suggérant une sensibilité de cette douleur aux oestrogènes (voir aussi ci-dessous). De même, la concentration de glutamate s'élève au niveau du muscle masséter chez des patients présentant des désordres musculo-squelettiques de la TMJ, des neuropeptides (substance P, CGRP) et des médiateurs de l'inflammation (5-HT, cytokines inflammatoires et prostaglandines) apparaissent dans la TMJ en conditions inflammatoires, suggérant l'intervention de l'ensemble de ces médiateurs dans les douleurs temporo-mandibulaires (Sessle, 2011).

# Orofacial Pain: Unique Anatomical Tissues



*Figure 11 : Diversité des tissus cranio-faciaux innervés par le nerf trijumeau. (D'après Bereiter, 2000).*

## 1.2. La dent

C'est une spécificité de la région oro-faciale. La pulpe, richement innervée et encapsulée dans une structure inextensible, est très sensible à la douleur inflammatoire. D'une part, l'infection bactérienne (carie) entraîne une réaction inflammatoire avec libération de médiateurs de l'inflammation et activation de cellules immunitaires. D'autre part, l'œdème provoqué par l'inflammation comprime les fibres nerveuses dans la chambre pulpaire, activant les récepteurs mécano-sensibles (Hossain *et al.*, 2019). Le grand nombre de fibres polymodales A $\delta$  et C innervant la pulpe et la dentine, l'organisation somatotopique du ganglion trigéminal (voir ci-dessus) sont ainsi propices à la réalisation de modèles animaux pour étudier les interactions neuro-inflammatoires (Byers & Narhi, 1999). En effet, beaucoup de processus, dont la sensibilisation périphérique de récepteurs et canaux ioniques sur les afférences primaires, sont identiques dans la dent et le reste du corps. Au niveau de la dent, des neuropeptides (substance P, CGRP), de l'ATP, des récepteurs TRP et un grand nombre de médiateurs (histamine, 5-HT, opioïdes et cytokines) libérés par les cellules de la pulpe dentaire (Chung *et al.*, 2013) participent à la réaction inflammatoire et aux phénomènes de réparation de la pulpe (Farges *et al.*, 2015). De même, l'élévation de la substance P – augmentant l'activité des afférences peptidergiques – et de certains médiateurs de l'inflammation dans la chambre pulpaire en conditions inflammatoires chroniques, contribuent vraisemblablement à la douleur inflammatoire dentaire chronique (Bowles *et al.*, 2003). A noter que les terminaisons nerveuses trigéminales dans la pulpe dentaire expriment aussi des récepteurs opioïdes  $\mu$ . Ces récepteurs sont inaccessibles aux morphiniques exogènes en conditions physiologiques du fait de la barrière périneurale. Cependant, au stade précoce de l'inflammation, cette barrière périneurale est rompue et les agonistes des récepteurs opioïdes  $\mu$  peuvent accéder aux terminaisons nerveuses trigéminales; de plus, le nombre de récepteurs opioïdes sur les terminaisons primaires augmente au stade chronique (Jaber *et al.*, 2003).

## 1.3. Les méninges et les vaisseaux intracrâniens

Les attaques de migraine sont caractérisées par des céphalées d'intensité modérée à sévère, unilatérales, pulsatiles, pouvant durer de 4 à 72 heures en l'absence de traitement. La céphalée migraineuse est accompagnée de troubles digestifs comme les nausées et les vomissements, et/ou de troubles sensoriels tels que la photophobie et la phonophobie. Chez au moins 20% des patients, les crises sont précédées par des symptômes neurologiques connus sous le nom d'aura migraineuse qui durent environ 60 minutes (migraines avec aura). L'aura la plus fréquente est de nature visuelle, mais peuvent s'ajouter des déficits moteurs et/ou de langage (pour revue voir Pietrobon & Striessnig, 2003 ; Burstein *et al.*, 2005 ; 2015 ; Pietrobon & Moskowitz, 2012).

Cette douleur met en jeu le système trigémino-vasculaire. Deux types d'afférences méningées, ayant des vitesses de conduction correspondant aux fibres A $\delta$  et C, ont été identifiés en fonction du délai des réponses enregistrées dans le noyau trigéminal (Strassman *et al.*, 1996) ou le Sp5C (Burstein *et al.*,



*(A) Peripheral tissues and innervation*

- (1) Tissues unique to the craniofacial region (e.g. tooth pulp, cornea)
- (2) Higher innervation density in many craniofacial tissues than in most spinally innervated tissues
- (3) Shorter conduction distances of peripheral nerve pathways
- (4) Slower conduction velocities of peripheral nerve fibers
- (5) Higher ratio of myelinated: unmyelinated fibers
- (6) Lower proportion of sympathetic efferents
- (7) Certain craniofacial receptors (e.g. some periodontal mechanoreceptors; jaw muscle spindles) have their primary afferent cell bodies *within* the CNS

*(B) Central nervous system*

- (1) Face and mouth represented completely at most rostrocaudal levels of the VBSNC, and a dual representation of some tissues occurs in the Vc
- (2) Distinctive brainstem termination patterns of some nociceptive afferents
- (3) Transitional regions between Vc and Vi, and between Vc and CDH, with distinctive properties (e.g. bilateral afferent inputs to Vc/Vi)
- (4) 'Deep bundle' fiber system especially prominent in the Vc (connects caudal and rostral levels of the VBSNC), whereas Lissauer's tract is absent
- (5) Significant ipsilateral as well as contralateral projections from VBSNC to thalamus

*(C) Pain conditions specific to the craniofacial region*

- (1) Headaches (e.g. migraine, cluster headache)
- (2) Toothaches (e.g. pulpitis pain)
- (3) Trigeminal neuralgia
- (4) Miscellaneous (e.g. persistent idiopathic facial pain, atypical odontalgia, burning mouth syndrome)

---

CDH = Upper cervical dorsal horn; VBSNC = trigeminal brainstem sensory nuclear complex; Vc = subnucleus caudalis; Vi = subnucleus interpolaris. From Sessle [11], with permission.

---

**Figure 12. Différences entre les systèmes sensoriels trigéminaux et spinaux (D'après Sessle 2005).**

1998; Schepelmann *et al.*, 1999; Levy & Strassman, 2002; Panteleev *et al.*, 2005 ; Melin *et al.*, 2016). Des afférences méningées avec des vitesses de conduction plus élevées, dans la gamme de celles des fibres A $\delta$  rapides ou même des fibres A $\beta$ , ont aussi été enregistrées (Strassman *et al.*, 1996 ; Levy & Strassman, 2002). Une étude récente chez l'homme a révélé que ces afférences drainent l'information douloureuse non seulement de la dure mère et de ses vaisseaux mais aussi de la pie mère et des petits vaisseaux cérébraux (Fontaine *et al.*, 2018). Cette dernière observation suggère que les petits vaisseaux de la pie mère interviennent aussi dans la genèse des céphalées primaires et secondaires.

Si le rôle du système trigémino-vasculaire dans la douleur migraineuse est bien établi, la cause de celle-ci reste à établir. Une prévalence de la migraine plus élevée chez la femme que chez l'homme (dans les pays occidentaux : 3 femmes pour 1 homme; Burch *et al.*, 2015) et, d'autre part, chez la femme en période pubertaire que chez la femme ménopausée ou prépubertaire (Stewart *et al.*, 1992; Steiner *et al.*, 2003), suggère fortement l'implication des oestrogènes (voir aussi ci-dessous). De plus, la migraine présente un caractère héréditaire dans environ 50% des cas.

## 2. UNE ORGANISATION COMPLEXE DU NOYAU SPINAL DU TRIJUMEAU

Les proportions de fibres afférentes primaires de type A et C dans le Trijumeau sont très différentes de celles des autres nerfs sensitifs spinaux. En effet, alors que les fibres C représentent 70% des afférences spinales (Millan, 1999), elles ne représentent plus que 40% des afférences trigéminales (Lazarov, 2002). De même, la proportion des fibres sympathiques semble bien moindre dans le Trijumeau que dans les nerfs spinaux (Hoffmann & Matthews, 1990). Cela pourrait expliquer l'incidence moindre de syndromes douloureux régionaux complexes au niveau oro-facial que dans les autres parties du corps (Matthews, 1989).

Bien que les réseaux neuronaux du Sp5C et de la CD soient très similaires structurellement et fonctionnellement, les traitements trigéminal et spinal des informations nociceptives ne sont pas exactement identiques (Sessle, 2000; 2005; Dostrovsky, 2006) (Figure 12). Ainsi une caractéristique unique du système somatosensoriel trigéminal est le traitement de certains inputs nociceptifs par des structures supplémentaires au Sp5C dans le complexe sensitif du Trijumeau. Un premier exemple est le Sp5O qui reçoit des inputs nociceptifs en provenance de la région orale (voir ci-dessus). Au niveau du Sp5C même, si les informations nociceptives de l'ensemble des régions orofaciales convergent sur le Sp5C, plusieurs régions sont aussi représentées dans ses portions caudale – à l'union Sp5C-DH cervicale – et rostrale – transition Sp5C/Sp5I. La jonction Sp5C-DH est très similaire à la DH et est impliquée dans le traitement des aspects discriminatifs de la douleur.

Par contre, la jonction Sp5C/Sp5I est unique : en plus des informations nociceptives provenant des tissus profonds, elle est impliquée bilatéralement dans le traitement des informations somatoviscérale et somatoautonome, l'activation de l'axe pituitaire-surrénalien et le contrôle descendant de la douleur.



Ainsi, cette transition Sp5I/Sp5C coordonnerait les réponses sensorimotrices bilatérales du système trigéminal à une lésion des tissus profonds (Bereiter *et al.*, 2000; Dubner & Ren, 2004).

Une autre caractéristique du Sp5C est son intégration dans un ensemble plus grand, le ‘trigeminal brainstem sensory nuclear complex’ (VBSNC), qui joue rôle stratégique comme relai majeur de nombre d’informations somatosensorielles en provenance non seulement de la face et de la bouche mais aussi du cou (Dubner *et al.*, 1978; Sessle 2000). En effet, dans ce VBSNC, le Sp5C interagit avec les afférences sensibles issues de C1-C3. Une telle interaction anatomique pourrait expliquer que des douleurs cervicales se projettent sur le visage et, inversement, que des douleurs dentaires irradient vers la face et le cou. Il est intéressant de noter qu’une stimulation expérimentale douloureuse des tissus cranio-faciaux chez l’homme entraîne une vasodilatation à long terme des régions orofaciales (Izumi, 1999), ce qui n’est observé dans aucune autre partie du corps. Ceci suggère l’existence de mécanismes réflexes vasodilatateurs spécifiquement trigéminaux. De plus, rappelons ici, que, d’une part, certaines afférences trigéminales primaires peuvent court-circuiter le Sp5C et atteindre directement certaines aires du tronc cérébral ou du cervelet, et que, d’autre part, contrairement à la DH, certaines projections du Sp5C restent ipsilatérales (voir ci-dessus).

Il existe aussi des différences dans la réponse à une lésion tissulaire. Ainsi, contrairement aux fibres sympathiques spinales, les fibres sympathiques trigéminales ne subissent pas changements morphologiques tels que le ‘sprouting’ à la suite d’une lésion inflammatoire périphérique (Bongenhielm *et al.*, 1999; Byers & Narhi, 1999; Chung & Chung, 2001; Xie *et al.*, 2015). De même, l’activité ectopique à la suite d’une axotomie apparaît beaucoup plus importante au niveau spinal qu’au niveau trigéminal : les décharges spontanées dans les fibres aussi bien myélinisées que non myélinisées sont significativement plus fréquentes au niveau spinal qu’au niveau trigéminal (Tal & Devor, 1992; Bernal & Roza, 2018). Ceci pourrait expliquer, en partie, la résistance de la région céphalique à développer des douleurs neuropathiques suite à une lésion nerveuse.

Les neurones trigéminaux de 1<sup>er</sup> ordre semblent être plus particulièrement sensibles aux effets des œstrogènes comparés à leur homologues du reste du corps. On a ainsi montré que les œstrogènes potentialisent la réponse comportementale à une application de capsaïcine, un agoniste spécifique des récepteurs ‘transient receptor potential vanilloid 1’ (TRPV1), à la surface de l’œil de rates ovariectomisées (Yamagata *et al.*, 2016). Cette potentialisation résulterait d’une augmentation de l’expression de la prolactine et de deux canaux Ca<sup>2+</sup>, le TRPV1 et l’anocamin 1 (ANO1), dans les neurones trigéminaux. En effet, l’injection d’œstradiol à des rates ovariectomisées provoque une augmentation très importante (x 40) de l’expression de la prolactine dans spécifiquement les neurones trigéminaux, notamment ceux qui expriment le TRPV1 ; à son tour, la prolactine favorise la phosphorylation de ce canal TRPV1 et potentialise ses courants Ca<sup>2+</sup> (Diogenes *et al.*, 2006). Dans ces mêmes conditions, les expressions de TRPV1 et d’ANO1 sont aussi augmentées (Yamagata *et al.*, 2016). De même, une douleur spontanée, provoquée par l’injection de formol dans la face, est augmentée chez des rates ovariectomisées. Cette potentialisation est bien trigéminal- et sexe-spécifique car ni les douleurs spontanées provoquées par l’injection de formol dans la patte postérieure chez ces mêmes rates ovariectomisées, ni celles



provoquées par l'injection de formol dans la face chez des rats mâles castrés, ne sont augmentées (Pajot *et al.*, 2003). Cela suggère donc une influence des œstrogènes sur, spécifiquement, la sensibilité à la douleur céphalique et expliquerait certaines différences de prévalence en fonction du sexe de douleurs céphaliques chroniques comme le migraine [3 femmes pour 1 homme] (Burch *et al.*, 2015), la stomatodynie [3-20 femmes pour 1 homme] (Tammiala-Salonen *et al.*, 1993; Moisset *et al.*, 2016) et les douleurs myofasciales et arthralgies [2-3 femmes pour 1 homme] (Bertoli *et al.*, 2018). Pourtant, la présence comme l'absence d'œstrogènes semble augmenter la sensibilité à la douleur céphalique. De plus, la plupart des patientes qui présentent une stomatodynie sont ménopausées ou en cours de ménopause (Gorsky *et al.*, 1991). Cependant, on a aussi observé une surexpression des récepteurs oestrogéniques dans le Sp5C de rates ovariectomisées (Pajot *et al.*, 2003). Cela pourrait expliquer une plus grande sensibilité de ces rates aux œstrogènes et en conséquence aux douleurs provoquées dans la sphère orofaciale.

En conclusion, le Sp5C présente à la fois des similitudes et des différences avec la DH. Ces différences peuvent avoir des implications cliniques. Il est clair que le codage, spatial et temporel, de l'information nociceptive, cutanée ou muqueuse, par les neurones du Sp5C qui projettent vers les aires cérébrales du 'pain matrix' est essentiel pour percevoir, localiser et évaluer les douleurs aiguës. Cependant, plusieurs voies dans le VBSNC interviennent dans la manifestation des douleurs orofaciales aiguës ou chroniques chez les patients. En effet, de nombreuses inputs convergent sur les neurones NS et WDR du Sp5C : d'une part, en provenance de tissus aussi divers que les muscles orofaciaux, la pulpe dentaire, les vaisseaux crâniens et la dure-mère ou le tissu muqueux, d'autres part véhiculées par non seulement le Trijumeau mais aussi d'autres nerfs crâniens ou cervicaux. Cette convergence, associée au processus de sensibilisation centrale (voir ci-dessous), explique le caractère souvent diffus et référé de la douleur orofaciale et plus généralement céphalique (Hargreaves, 2000; Sessle, 2000). Enfin, il existe des différences dans l'implication de récepteurs hormonaux, notamment aux œstrogènes, expliquant la différence dans la susceptibilité à certaines douleurs orofaciales et céphaliques en fonction du sexe. En somme, toutes ces résultats montrent que la douleur trigéminal est une expérience particulière, due à des mécanismes physiopathologiques uniques, différents de ceux de la douleur du reste du corps (**Figure 12**).



## IV. SENSIBILISATIONS PERIPHERIQUE ET CENTRALE

Les syndromes douloureux se caractérisent par une sensibilité exacerbée à la douleur qui se manifeste par des douleurs spontanées, une hyperalgésie et/ou allodynie, qu'elles soient mécaniques, thermiques ou chimiques (voir Chapitre I). Ces symptômes douloureux traduisent des modifications au niveau des terminaisons des neurones de 1<sup>er</sup> ordre (sensibilisation périphérique), et/ou sur l'ensemble des voies de la douleur, et notamment dans le Sp5C/DH (sensibilisation centrale). Il convient de souligner dès à présent que les mécanismes de cette hypersensibilité à la douleur, au niveau périphérique comme central, peuvent différer en fonction des conditions, aiguë ou chronique, inflammatoire ou neuropathique (voir Ji *et al.*, 2003 ; Peirs *et al.*, 2015)

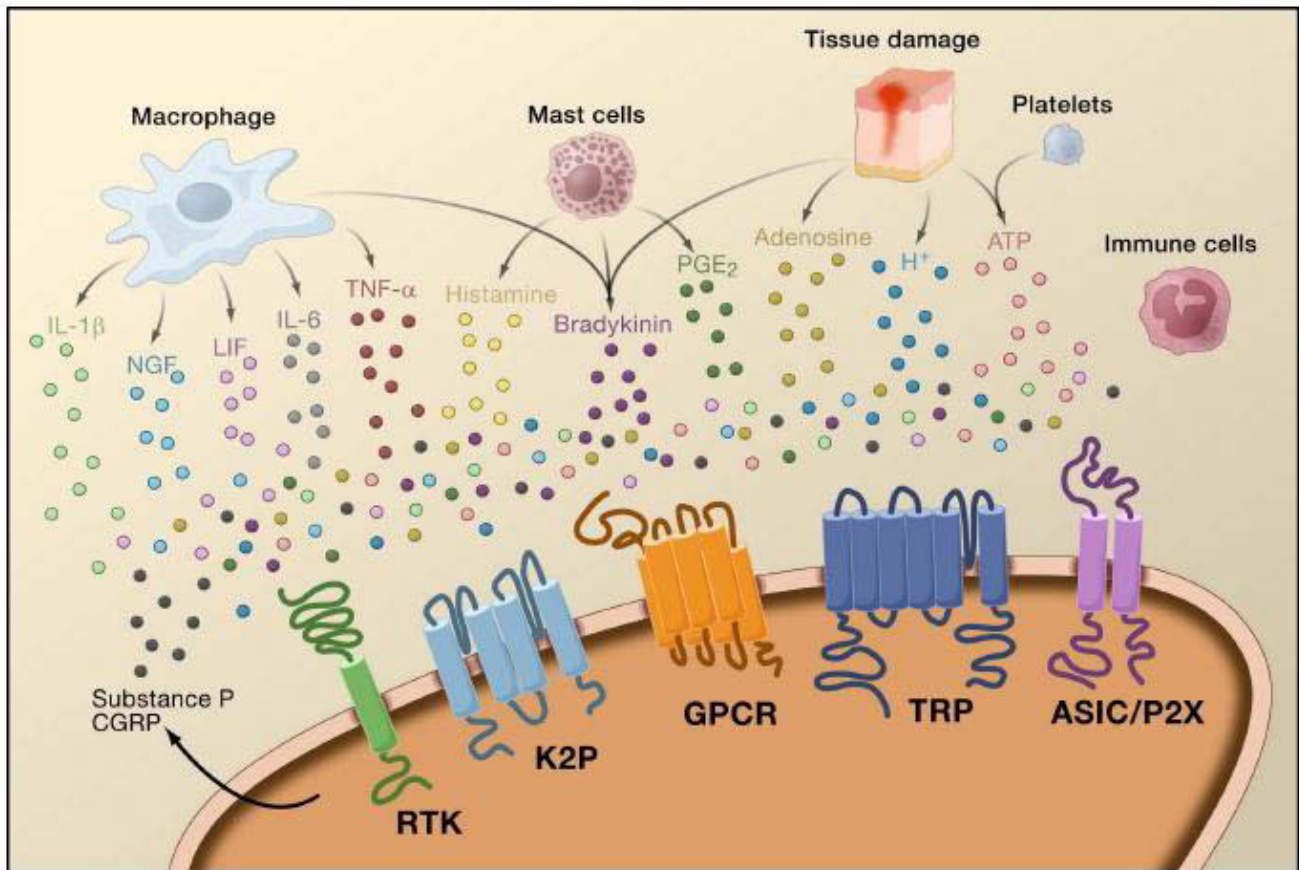
### 1. SENSIBILISATION PERIPHERIQUE

Au cours de la sensibilisation périphérique, le seuil d'activation du nocicepteur est réduit et/ou la terminaison nerveuse devient plus excitable. Cela se traduit sur le plan comportemental par une sensibilité accrue à la douleur (ou hyperalgésie selon les nouvelles définitions voir Sandkuhler, 2009 et Figure 2). Cette partie ne sera pas développée, le lecteur étant renvoyé à des revues (Julius & Basbaum 2001 ; Basbaum *et al.*, 2009 ; Kibaly *et al.*, 2016).

En bref, à la suite d'une lésion tissulaire périphérique, les fibres nerveuses libèrent des peptides – substance P, CGRP – dans le milieu extracellulaire (inflammation neurogénique) qui provoquent une extravasation et accumulation de cellules sanguines – mastocytes, leucocytes, plaquettes, macrophages, fibroblastes. Ces cellules vont à leur tour libérer divers molécules dont la 5-HT, la bradykinine (BK), des purines (e.g. l'adénosine triphosphate ou ATP), des facteurs de croissance (e.g. NGF), le facteur de nécrose tumorale (TNF), des cytokines (e.g. histamine), des interleukines (e.g. IL-1) et des prostaglandines (e.g. PGE2) l'ensemble formant la « soupe inflammatoire » (Figure 13). Cela s'accompagne d'une acidification du milieu.

Ces molécules, en interagissant avec leurs récepteurs membranaires, déclenchent de multiples cascades de transduction faisant intervenir des kinases protéiques: protein kinase A (PKA) et C (PKC), mitogen-activated protein kinases (MAPKs), incluant l'Extracellular-Signal-Regulated Kinase (ERK) et la p38 MAPK, et, récemment impliquée dans la douleur, la Cdk5 (Dhavan & Tsai, 2001 ; Utreras *et al.*, 2009). Ces cascades conduisent à une modulation de la transcription génique dans les noyaux des neurones ganglionnaires, tels ceux codant pour les récepteurs TRP (e.g. TRPV1, TRPA1) et les canaux Na<sup>+</sup> voltages dépendants, tels que Nav1.7, Nav1.8 et Nav1.9, donc de leur synthèse et de leur présence sur la membrane des terminaisons nerveuses (Kibaly *et al.*, 2016). De telles modulations existent aussi en conditions neuropathiques. Dans un modèle animal de lésion nerf sciatique, on observe une augmentation de l'expression du canal Nav1.3 mais une diminution de celle des canaux Nav1.7 et Nav 1.9 (Casals-Diaz *et al.*, 2015).





**Figure 13 : Mécanismes impliqués dans la sensibilisation périphérique au cours de l'inflammation tissulaire.** Une lésion tissulaire entraîne la libération de médiateurs par, à la fois, les terminaisons nerveuses activées et des cellules non nerveuses, déjà présentes ou extravasées, telles que des mastocytes, polynucléaires basophiles et neutrophiles, plaquettes, macrophages, cellules endothéliales, keratinocytes et fibroblastes. Cette 'soupe inflammatoire' inclue la 5-HT, l'histamine, le glutamate, l'ATP, l'adenosine, la substance P, le CGRP, la bradykinin, les prostaglandines, les thromboxanes, les leukotriènes, les endocannabinoïdes, le nerve growth factor (NGF), le tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), l'interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), des protéases extracellulaires et des protons. Ces facteurs agissent directement sur le nocicepteur en se fixant sur un ou plusieurs récepteurs à sa surface incluant des récepteurs couplés à la protéine G, des canaux TRPs, des canaux sensibles à l'acidose (acid-sensitive ion channels ou ASIC), des canaux K<sup>+</sup> (two-pore potassium channels ou K2P), récepteurs tyrosine kinases (receptor tyrosine kinases ou RTK). (D'après Basbaum et al. 2009).

## 2. SENSIBILISATION CENTRALE

L'information nociceptive en provenance des tissus périphériques de la sphère orofaciale ou du reste du corps gagne respectivement le Sp5C et la DH. Là, elle est modulée par deux types de mécanismes –segmentaires et supra-segmentaires –, qui facilitent ou, au contraire, inhibent son passage vers les centres supra-segmentaires. Seule l'information nociceptive issue de ce traitement aboutit au cerveau où elle devient douleur.

La sensibilisation centrale peut se définir comme une potentialisation de la fonction des neurones et circuits impliqués dans la nociception (pour revue voir Ji *et al.*, 2003 ; Basbaum *et al.*, 2009 ; Latremolière & Woolf, 2009). C'est une manifestation de la remarquable plasticité du système nerveux somato-sensoriel à la suite d'une brève activation – on parle aussi de barrage d'activité – des neurones de 1<sup>er</sup> ordre de type C (Woolf, 1987 ; Torebjork *et al.*, 1992) qu'elle soit déclenchée expérimentalement ou par une lésion tissulaire périphérique (douleur inflammatoire) ou nerveuse (neuropathique). Elle se manifeste dans le Sp5C, comme dans la DH, par une augmentation de l'activité spontanée, des réponses évoquées par des stimuli nociceptifs ou non, et de l'aire des RFs, et une réduction du seuil d'activation des neurones nociceptifs, NS et WDR (Burstein *et al.*, 1998; Sessle, 2000; Chiang *et al.*, 2003; Woda, 2003; Boyer *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2018). Ces changements neuronaux sont associés à l'expression de marqueurs d'activation (ou de plasticité) neuronale (expression de la protéine Fos, phosphorylation de ERK) (Sp5C : Miraucourt *et al.*, 2009 ; Boyer *et al.*, 2014 ; Peirs *et al.*, 2016) et à l'activation de kinases, e.g. PKC $\gamma$  (pour revue voir Artola *et al.*, 2020) et Cdk5 (pour revue voir Utreras *et al.*, 2009). Ils s'accompagnent des manifestations comportementales d'une hypersensibilité à la douleur : douleur spontanée, hyperalgésie et allodynie (Sessle, 2000; Iwata *et al.*, 2004). Cependant, il est important de noter que cette sensibilisation centrale ne se limite pas aux neurones nociceptifs de 2<sup>ème</sup> ordre. En effet, si elle a été mise en évidence initialement dans la DH (Woolf, 1987), elle l'a été ensuite dans l'ensemble des voies de la nociception, notamment le thalamus (Dostrovsky & Guilbaud, 1990) et les aires du 'pain matrix' dont l'amygdale (Neugebauer *et al.*, 2000; Neugebauer & Lin, 2003) et le cortex cingulaire antérieur (pour revue voir Bliss *et al.*, 2016).

La sensibilisation centrale est une conséquence normale, physiologique d'une lésion ou inflammation tissulaire périphérique. Elle explique l'apparition d'une zone d'hyperalgésie secondaire, ou hypersensibilité douloureuse de la peau saine autour de la lésion tissulaire (Torebjork *et al.*, 1992) –siège, elle, de l'hyperalgésie primaire plutôt due à une sensibilisation périphérique (voir ci-dessus). L'hyperalgésie secondaire favorise la cicatrisation en empêchant tous contacts avec la zone lésée. De même, la limitation des mouvements mandibulaires pendant une dysfonction de l'articulation temporo-mandibulaire pourrait aussi résulter de ce phénomène de sensibilisation. L'apparition de cette sensibilisation centrale est rapide. Expérimentalement, on observe une facilitation de l'excitabilité des neurones nociceptifs immédiatement après un court barrage d'activité des fibres afférentes de type C (Woolf, 1983). De même, chez la grande majorité des migraineux, une allodynie cutanée se développe en cours de crise dans les territoires céphalique et extracéphalique (Burstein *et*



*al.*, 2000 ; Guy *et al.*, 2010), témoin d'une sensibilisation des neurones de 2<sup>ème</sup> (Burstein *et al.*, 1998 ; Boyer *et al.*, 2014) et de 3<sup>ème</sup> ordre (Burstein *et al.*, 2010) des voies de la nociception méningée. Cette facilité de l'induction d'une sensibilisation centrale à la suite d'une courte activité nociceptive afférente explique la nécessité de prévenir les douleurs postopératoires par l'administration d'antagonistes des récepteurs NMDA (voir par exemple Morel *et al.*, 2016). Enfin, dans la plupart des cas, cette sensibilisation est réversible avec la disparition de la lésion initiale.

Les mécanismes cellulaires et moléculaires de la sensibilisation centrale dans le Sp5C sont en général analogues à ceux dans la DH. Ces mécanismes associent des processus segmentaires –potentialisation de la transmission excitatrice, modifications des propriétés membranaires des neurones, réduction de l'inhibition synaptique, activation des cellules gliales, activation de kinases – et suprasegmentaires – modulation des voies descendantes. Les projections descendantes, provenant de diverses régions du cerveau, inhibent, ou au contraire facilitent, le transfert de l'information nociceptive du Sp5C/DH vers le cerveau (pour revue voir Millan, 2002). Ces projections descendantes utilisent plutôt des neuromodulateurs – noradrénaline (NA), sérotonine (5-HT) et dopamine (DA) – mais aussi le  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) (Antal *et al.*, 1996). Ces projections descendantes peuvent avoir une activité phasique mais aussi tonique comme l'inhibition exercée par les projections DAergiques descendantes du noyau A11 de l'hypothalamus sur le Sp5C (Charbit *et al.*, 2009; Lapirot *et al.*, 2011).

### **2.1. Potentialisation de la transmission glutamatergique**

Les neurones de 1<sup>er</sup> ordre contactent les neurones de 2<sup>ème</sup> ordre dans le Sp5C/DH par l'intermédiaire de synapses excitatrices glutamatergiques. Ces synapses utilisent le glutamate comme neurotransmetteur. Il active deux types de récepteurs : ionotropiques – associés à un canal cationique – incluant les récepteurs 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl) propanoïque (AMPA) et *N*-méthyl-D-aspartique (NMDA) et métabotropiques – leur activation déclenche la libération d'un 2<sup>nd</sup> messager dans le neurone postsynaptique.

Une des propriétés majeures de la synapse excitatrice glutamatergique est d'être plastique, i.e. sa fonction transmission varie avec le niveau de son activité. En effet, cette synapse peut être durablement potentialisée (de quelques minutes à plusieurs jours, semaines, ...) à la suite d'une brève activation : par exemple une courte stimulation à haute fréquence (en Anglais High-Frequency Stimulation ou HFS) ou tétanus (typiquement 100 Hz x 1-2 s). Ce phénomène connu sous le nom de potentialisation à long-terme (en Anglais Long-Term Potentiation ou LTP) a été mis en évidence d'abord dans l'hippocampe (Bliss & Lømo, 1973) puis dans le néocortex (Artola & Singer, 1987 ; Artola *et al.*, 1990) et enfin dans la plupart des aires du SNC dont la DH (pour revue voir Larsson, 2009 ; Sandkühler & Gruber-Schoffnegger, 2012 ; Li *et al.*, 2019). Ainsi, une LTP a pu être observée dans plusieurs synapses de la DH : dans la couche II, entre fibres afférentes A $\delta$  et neurones de 2<sup>ème</sup> ordre (Randic *et al.*, 1993), dans la couche I, entre fibres afférentes C et neurones de projection, vers l'aire parabrachiale (ou neurone PB : Ikeda *et al.*, 2003) ou vers la substance grise périaqueducule (ou neurone SGP : Ikeda *et al.*, 2006), et entre fibres afférentes et neurones spinothalamiques (ou neurone ST : Kim *et al.*, 2015). On peut concevoir



qu'une hyperalgésie soit due à une telle LTP de la 1<sup>ère</sup> synapse sur les voies de la nociception, entre fibres afférentes primaires de type C et neurones de projection de la couche I (Ikeda *et al.*, 2003).

On distingue habituellement deux types de mécanismes pour la LTP : ceux impliqués dans l'induction et ceux responsables de la potentialisation de la transmission synaptique, ou maintenance. Le scénario de référence pour l'induction de la LTP est celui de l'aire CA1 de l'hippocampe (voir revues Bliss & Collingridge, 1993 ; Malenka & Nicoll, 1999). Ce scénario veut que lors de l'activation synaptique, le glutamate libéré par la terminaison pre-synaptique active les récepteurs glutamatergiques postsynaptiques, dont les récepteurs AMPA et NMDA. Si la dépolarisation postsynaptique – due, dans ces conditions, essentiellement aux récepteurs AMPA – est faible, le canal ionique associé au récepteur NMDA reste bloqué par un ion  $Mg^{2+}$ . Par contre si cette dépolarisation devient plus forte, du fait par exemple de la sommation temporelle lors du tétanus, l'ion  $Mg^{2+}$  est éliminé et le canal NMDA laisse alors entrer des ions  $Na^+$  et surtout  $Ca^{2+}$ . Il en résulte une élévation de la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$  dans le neurone postsynaptique ( $[Ca^{2+}]_i$ ) qui agit comme un second messenger, activant des kinases, incluant la *Ca<sup>2+</sup>/calmoduline kinase II* (CaMKII) mais aussi MAPK, PKA, PKC, PI3K, Src et Cdk5. Ces phosphorylations déclenchent une chaîne des mécanismes moléculaires conduisant à la potentialisation de la transmission synaptique, notamment au recrutement de récepteurs AMPA postsynaptiques (Johnson *et al.*, 2019). Le récepteur NMDA joue ici le rôle d'un détecteur de coïncidence – on parle aussi d'associativité –, entre activations pre- et postsynaptique, caractéristique de la synapse de Hebb (Hebb, 1949).

Par rapport à ce scénario, celui de l'induction de la LTP dans la DH présente plusieurs particularités. D'abord, alors que l'induction de la LTP dans les trois synapses, fibre A $\delta$ -neurone de la couche II, fibre C-neurone PB et fibre afférente-neurone ST, comme ailleurs (voir plus haut) nécessite une HFS (100 Hz) (Randic *et al.*, 1993 ; Ikeda *et al.*, 2003 ; Kim *et al.*, 2015), la synapse fibre C-neurone SGP, elle, ne peut être potentialisée qu'après une stimulation conditionnante à basse fréquence (en Anglais Low-Frequency Stimulation ou LFS ; 2 Hz, 2 min) (Ikeda *et al.*, 2006). De même, une LTP de la 1<sup>ère</sup> synapse, entre fibres C et neurones de 2<sup>ème</sup> ordre dans la DH, mesurée ici par enregistrements de potentiels de champs dans la DH – donc témoin de l'activité électrophysiologique d'un ensemble de neurones de 2<sup>ème</sup> ordre, quel que soit leur nature –, est obtenue à la suite d'un barrage d'activité à basse fréquence provoquée par une inflammation tissulaire périphérique *in vivo* (Ikeda *et al.*, 2006). Or, une LFS induit la modification inverse à la LTP, ou dépression à long-terme (en Anglais Long-Term Depression' ou LTD), dans d'autres aires du cerveau (par exemple CA1 : Dunwiddie & Lynch, 1978 ; Dudek & Bear, 2003) et même dans la DH (Ikeda *et al.*, 1999). Deuxièmement, l'induction de la LTP dans les synapses fibre C-neurone de la couche I nécessite l'activation des récepteurs postsynaptiques NK1/NK2 par la substance P, libérée par les fibres afférentes C peptidergiques avec le glutamate (Liu & Sandkühler, 1997 ; Ikeda *et al.*, 2003 ; Ikeda *et al.*, 2006). Troisièmement, le  $[Ca^{2+}]_i$  nécessaire à l'induction de la LTP dans la synapse fibre afférente C-neurone PB doit provenir de plusieurs sources : influx à travers les canaux NMDA mais aussi à travers les canaux  $Ca^{2+}$  voltage-dépendants et libération du  $Ca^{2+}$  des sites de stockage intracellulaires à la suite de l'activation de récepteurs glutamatergiques métabotropiques (Ikeda *et al.*, 2003). Ce résultat suggère que

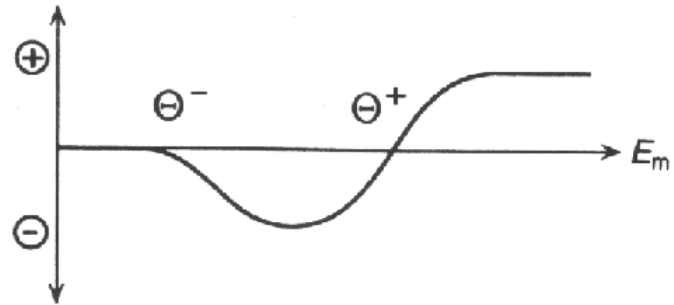


l'origine du  $\text{Ca}^{2+}$  pour élever  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  n'a pas importance, seule compte le niveau même atteint par  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  lors de la stimulation conditionnante (voir ci-dessous).

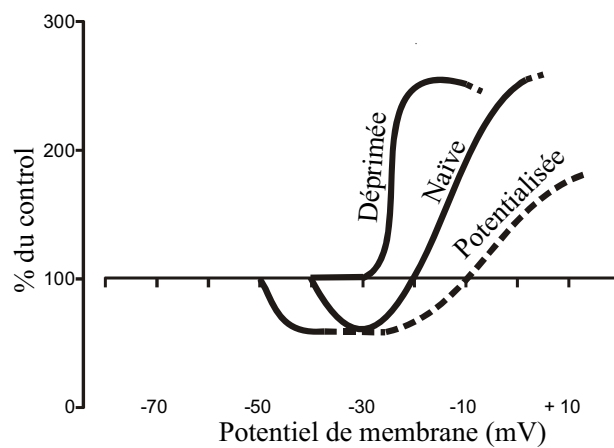
Il existe aussi des exemples de LTD dans la DH : entre fibres afférentes A ou C et neurones de 2<sup>ème</sup> ordre de la couche II (Randic *et al.*, 1993 ; Ikeda *et al.*, 1999), fibres afférentes et neurones GABAergic de 2<sup>ème</sup> ordre de la couche II (Kim *et al.*, 2015) et dans le Sp5C, entre fibres afférentes trigéminales TRPV1<sup>+</sup> et neurones de 2<sup>ème</sup> ordre des couches I-II (Pradier *et al.*, 2018). Il est à noter que cette LTD peut être induite par une LFS (Ikeda *et al.*, 1999 ; Pradier *et al.*, 2018) comme par une HFS (Randic *et al.*, 1993 ; Kim *et al.*, 2015).

Ces derniers résultats posent la question du sens de la modification – potentialisation ou dépression – des synapses glutamatergiques en fonction de l'activation. Dans le cortex visuel de rat, le sens de la variation de transmission synaptique dépend du niveau de la dépolarisation postsynaptique atteint lors de la stimulation conditionnante: en cas de dépolarisation (i) faible, il n'y a aucune modification, (ii) plus forte, au-dessus d'un 1<sup>er</sup> seuil,  $\Theta^-$ , il y a LTD, et (iii) encore plus forte, au-delà d'un 2<sup>nd</sup> seuil,  $\Theta^+$ , il y a LTP (Artola *et al.*, 1990 ; Ngezahayo *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, *soumis*) (Figure 14). Ces deux seuils de dépolarisation sont équivalents à des seuils de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Artola & Singer, 1993), l'élévation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nécessaire pour induire une LTD étant plus faible que celle pour induire une LTP (Hansel *et al.*, 1997). Que la LFS induise une LTD et la HFS, une LTP (dans CA1 : Dunwiddie & Lynch, 1978 ; Dudek & Bear, 1993 ; dans la DH : voir plus haut) conduit à une même conclusion si on considère que la dépolarisation postsynaptique dépend de la sommation temporelle et donc de la fréquence de la stimulation afférente. Il est intéressant de noter que parmi les fibres afférentes primaires, l'activation des fibres C, responsables de l'initiation de la sensibilisation centrale (voir plus haut), est la plus à même de produire une dépolarisation cumulative même à basse fréquence (Sivilotti *et al.*, 1993). Cependant, l'observation par Kim (Kim *et al.* 2015) qu'une même stimulation afférente, LFS ou HFS, induit une LTD dans l'autre exemple de LTD induite par une HFS (Randic *et al.*, 1993), la nature du neurone de 2<sup>ème</sup> ordre reste inconnue. LTP dans la synapse fibre afférente-neurone ST et une LTD dans la synapse fibre afférente-neurone GABAergique suggère que la direction de la modification synaptique dépend aussi du type de synapse. Il est à noter que l'induction d'une plasticité dans une synapse dépend aussi de son activité passée, ou métaplasticité (terme inventé par Abraham & Bear, 1996). Dans des synapses de CA1 (Ngezahayo *et al.*, 2000) ou dans le cortex somatosensoriel primaire (Nguyen *et al.*, *soumis*) préalablement potentialisées,  $\Theta^-$  glisse vers la gauche (plus polarisé), et  $\Theta^+$ , vers la droite (plus dépolarisé), facilitant la LTD et inhibant la LTP ; et *vice versa* dans les synapses déprimées. Facilitation de la LTD et inhibition de la LTP dans une synapse potentialisée, et *vice versa* dans une synapse déprimée, résultent donc de mouvements opposés et concomitants des deux seuils,  $\Theta^-$  et  $\Theta^+$ .





**Figure 14.** Dépolarisation post-synaptique lors de l'activité synaptique conditionnante ( $E_m$ ) et modification synaptique à long terme. (D'après Artola & Singer 1993).



**Figure 15:** Fonctions potentiel-réponses pour l'induction de la LTD/LTP dans des synapses déprimées, naïves et potentialisées (D'après Ngezahayo et al. 2000)

Il existe un continuum de fonctions potentiel-réponses pour l'induction de la LTD/LTP en fonction de l'état de la synapse : déprimé, naïf et potentialisé (Figure 15). La métaplasticité peut aussi être observée dans la DH. Dans une tranche *ex vivo* de DH, la même interruption brutale du traitement par un agoniste des récepteurs morphiniques de type  $\mu$ , la buprenorphine, provoque une LTP de la synapse fibre afférente primaire de type C-neurone de 2<sup>ème</sup> ordre (Drdla *et al.*, 2009) et une LTD/dépotentiation de cette même synapse, si elle a été préalablement potentialisée (Drdla *et al.*, 2012). Ce changement est vraisemblablement dû au glissement de  $\Theta^+$ , vers la droite (potentiels plus dépolarisés) après potentialisation de la synapse fibre afférente primaire de type C-neurone de 2<sup>ème</sup> ordre : la même élévation de  $[Ca^{2+}]_i$  déclenche une LTP dans une synapse naïve et une LTD dans une synapse potentialisée (voir Figure 15).

## **2.2. Facilitation de l'excitabilité neuronale**

Un neurone de 2<sup>ème</sup> ordre répond plus facilement ou au contraire plus difficilement à une stimulation périphérique, en cas d'excitabilité augmentée ou diminuée, respectivement. Cette excitabilité dépend de la présence et des propriétés de canaux ioniques sur la membrane des neurones. Tous changements de cette présence/de ces propriétés entraînent donc un changement dans la transmission de l'information à travers le réseau neuronal de la DH/du Sp5C.

### **2.2.1. Canaux $Na^+$ voltage-dépendants**

Dans un modèle de contusion de moelle épinière, la courbe activation/inactivation des courants  $Na^+$  à l'état d'équilibre est déplacée vers des potentiels plus dépolarisés et les courants  $Na^+$  persistant et de rampe sont augmentés (Lampert *et al.*, 2006). Toutes ces modifications conduisent très certainement à l'hyperexcitabilité des neurones de la DH et traduisent vraisemblablement une up-régulation des canaux  $Na^+$  voltage-dépendant de type Nav1.3, observés aussi dans ce modèle (Hains *et al.*, 2003).

Il existe une même hyperexcitabilité des neurones de la DH et up-régulation des canaux Nav1.3 dans le modèle de constriction chronique du nerf sciatique (Hains *et al.*, 2004). Cependant, une autre étude sur ce dernier modèle, conclut à l'absence de changement du potentiel de membrane de repos, de la rhéobase ou de la résistance membranaire des neurones de la DH, *ex vivo* (Balasubramanyan *et al.*, 2006).

Un protocole de 'pairing' (activation présynaptique couplée à une dépolarisation postsynaptique) induit une augmentation durable de l'excitabilité membranaire – baisse du seuil d'activation des potentiels d'action, augmentation du nombre de potentiels d'action déclenchés par injection de courant ou stimulation synaptique – (Kim *et al.*, 2008). Il faut noter que cette hyperexcitabilité nécessite l'activation des récepteurs NMDA et l'élévation de  $[Ca^{2+}]_i$ , i.e. une activation synaptique.

### **2.2.2. Canaux $K^+$ voltage-dépendants**

L'activation de la PKA ou de la PKC réduit les courants  $K^+$  de type A (Hu *et al.*, 2003), ce qui conduit à une augmentation très forte de l'excitabilité des neurones de la DH superficielle en culture, vraisemblablement par l'intermédiaire de l'activation de ERK (Hu & Gereau, 2003). L'excitabilité membranaire des neurones de la DH



est modulée par les canaux Kv4.2 : l'activation de la voie ERK produit une hyperexcitabilité des neurones de la DH chez une souris normale mais pas chez une souris déficiente pour le canal Kv4.2. De même, le comportement douloureux lors de la 2<sup>nd</sup>e phase du test au formol et l'hyperalgésie provoquée par une injection carragénine dans la plante de la patte postérieure, sont réduits chez ces souris déficientes en Kv4.2 (Hu *et al.*, 2006).

### **2.2.3. Potentiels en plateau**

Les potentiels en 'plateau' sont des mécanismes intrinsèques d'amplification de la relation input-output. Ces potentiels sont rarement retrouvés en conditions normales : dans moins de 10% des neurones en conditions *ex vivo* (Derjean *et al.*, 2003), et encore moins en conditions *in vivo* (Jiang *et al.*, 1995).

Les neurones à décharge tonique sont convertis en neurones à décharge en plateau à la suite de l'activation des récepteurs glutamatergiques métabotropiques de group I, et *vice versa* à la suite de l'activation des récepteurs GABA<sub>B</sub>, ces deux récepteurs agissant par l'intermédiaire des canaux K<sup>+</sup> Kir3 (Russo *et al.*, 1998 ; Derjean *et al.*, 2003). Lorsque ces deux types de récepteurs sont activés simultanément, les neurones adoptent une décharge en 'bursts'. Ces changements ont un impact direct sur la transmission de l'information dans le réseau neuronal : le passage d'une activité tonique à celle en plateau sécurise cette transmission alors que l'activité en burst l'affaiblit (Derjean *et al.*, 2003). De plus l'activation des récepteurs GABA<sub>A</sub> inhibe les potentiels en plateau alors qu'inversement, leur blocage par la bicuculline les facilite (Russo *et al.*, 1998).

Cependant, ni les propriétés membranaires des neurones de la couche I dans le modèle de CFA de la patte postérieure de rat (Müller *et al.*, 2003), ni celles des neurones GABAergiques de la DH dans le modèle de constriction chronique du nerf sciatique (Schoffnegger *et al.*, 2006) ne sont modifiées.

### **2.3. Désinhibition glycinergique/GABAergique**

Les interneurones inhibiteurs constituent de 30 à presque 50% des neurones de 2<sup>ème</sup> ordre dans les couches superficielles (I-III) de la DH (Todd & Sullivan, 1990 ; Polgar *et al.*, 2003). Ces interneurones inhibiteurs peuvent être activés directement par des afférences primaires (Yoshimura & Nishi, 1995). L'enregistrement simultané de paires de neurones dans la DH montre que ces interneurones peuvent constituer des circuits inhibiteurs 'feed-forward', di-synaptiques par lesquels un interneurone inhibiteur, directement activé par une fibre afférente primaire, C ou A $\beta$ , vient inhiber l'activation d'un neurone de 2<sup>ème</sup> ordre – neurone de la couche II ou neurone PKC $\gamma$  de la couche II<sub>i</sub>, respectivement – par cette même fibre (Lu & Perl, 2003 ; Lu *et al.*, 2013). Cette inhibition 'feed-forward' est à la base de la théorie du 'gate control' proposée par Melzack et Wall (1965) qui postulait déjà dans les années 60 qu'une perte de fonction de ces interneurones inhibiteurs conduit à une augmentation de la douleur.



Ces interneurons inhibiteurs utilisent deux acides aminés, GABA et glycine, comme neurotransmetteur. La plupart des interneurons inhibiteurs dans la DH/le Sp5C superficiel libèrent simultanément les deux neurotransmetteurs (Jonas *et al.*, 1998 ; Chery & de Koninck, 1999 ; O'Brien & Berger, 1999). Les récepteurs à la glycine (GlyR) sont uniquement postsynaptiques. Les récepteurs au GABA (GABAR) – qui sont de deux types : GABA<sub>A</sub> (GABA<sub>A</sub>R) et GABA<sub>B</sub> (GABA<sub>B</sub>R) – peuvent être pré- ou postsynaptiques. Les GABARs présynaptiques sont présents (i) sur les terminaisons inhibitrices, où ils réduisent la libération de neurotransmetteurs inhibiteurs, vraisemblablement en fonction de la fréquence de la stimulation (comme dans l'hippocampe : Davies *et al.*, 1991 ; Davies & Collingridge, 1993) mais aussi (ii) sur les afférences excitatrices (synapses axo-axoniques). Ainsi le contrôle de la libération de neurotransmetteurs par les GABARs présynaptiques s'exerce, non seulement sur la synapse inhibitrice elle-même (autorécepteurs) mais aussi sur d'autres synapses (hétérorécepteurs), notamment la synapse excitatrice fibre afférente primaire-neurone de 2<sup>ème</sup> ordre. D'un point de vue mécanistique, on distingue deux types de récepteurs : ionotropiques – GABA<sub>A</sub>R et GlyR – et métabotropiques – GABA<sub>B</sub>R. L'activation des premiers provoque l'ouverture d'un canal Cl<sup>-</sup>, et celle du second, celle, *in fine*, d'un canal K<sup>+</sup>. Aux potentiels de membrane usuels, l'entrée d'ions Cl<sup>-</sup> comme la sortie d'ions K<sup>+</sup> provoquent une hyperpolarisation.

Il est maintenant bien établi qu'une réduction de l'inhibition segmentaire joue un rôle majeur dans les manifestations cliniques des douleurs chroniques. Ainsi, l'injection intrathécale d'un agoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub> (DH : Eaton *et al.*, 1999 ; Hwang & Yaksh, 1997 ; Sp5C : Peirs *et al.*, 2016) ou de benzodiazépines (Knabl *et al.*, 2008) diminue considérablement les douleurs inflammatoires et neuropathiques. Inversement, bloquer les récepteurs GABA<sub>A</sub> et/ou glycine segmentaires, par une injection locale (intrathécale ou intracisternale) de leurs antagonistes respectifs, bicuculline et strychnine, provoque une allodynie mécanique chez un animal sain (DH : Beyer *et al.*, 1985 ; Roberts *et al.*, 1986 ; Yaksh, 1989 ; Sp5C : Miraucourt *et al.*, 2007 ; 2009 ; Peirs *et al.*, 2016) et diminue le seuil de déclenchement du réflexe de retrait de la patte (Sivilotti & Woolf, 1994). De même, après désinhibition pharmacologique, les neurones de la couche I, qui en conditions physiologiques ne répondent pas à une stimulation des fibres afférentes de type Aβ, deviennent capables d'y répondre (DH : Torsney & MacDermott, 2006 ; Sp5C : Miraucourt *et al.*, 2007) ; l'apparition de ces nouveaux inputs tactiles sur les neurones de la couche I étant associée à celle d'une allodynie mécanique (Miraucourt *et al.*, 2007).

En conditions neuropathiques, cette désinhibition segmentaire se manifeste par une réduction (i) de l'immunoréactivité du GABA et de son enzyme de synthèse, la glutamate decarboxylase dans la DH ipsilatérale à la lésion nerveuse (Castro-Lopes *et al.*, 1993 ; Ibuki *et al.*, 1997 ; Eaton *et al.*, 1998 ; Moore *et al.*, 2002) et (ii) des IPSCs évoqués dans les neurones de la couche II par une stimulation des fibres afférentes primaires (Moore *et al.*, 2002). Il est intéressant de noter que cette réduction des IPSCs évoqués est présente dans certains modèles – 'chronic constriction injury' (CCI) et 'spared nerve injury' (SNI) – mais pas dans d'autres – section du nerf sciatique (Moore *et al.*, 2002). Enfin, à la suite de la constriction d'un nerf périphérique (modèle CCI : Keller *et al.*, 2007) ou d'une inflammation périphérique (modèle capsaïcine de la face : Peirs *et al.*, 2016), les neurones de projection de la couche I deviennent capables d'être activés par des stimulations tactiles, non nociceptives,



véhiculées par les afférences LTMRs, en plus des stimulations nociceptives. Les neurones de projection de la couche I passent ainsi d'un phénotype NS à un phénotype WDR (Keller *et al.*, 2007) comme dans le cas d'une désinhibition pharmacologique (voir plus haut Torsney & MacDermott, 2006 ; Miraucourt *et al.*, 2007).

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cette réduction de l'inhibition : un mécanisme pre-synaptique, comme la disparition des neurones inhibiteurs dans la DH/le Sp5C, et/ou des mécanismes postsynaptiques, tels qu'une réduction du gradient  $\text{Cl}^-$  transmembranaire ou une activation de récepteurs aux prostaglandines. Ainsi, une perte de neurones GABAergiques pourrait expliquer cette réduction de l'inhibition dans la DH/le Sp5C superficiel. Cependant, si l'existence d'une perte cellulaire – existence de “dark neurons” (Sugimoto *et al.*, 1990) ou de cellules apoptotiques (Kawamura *et al.*, 1997; Azkue *et al.*, 1998; Whiteside & Munglani, 2001; Moore *et al.*, 2002; de Novellis *et al.*, 2004 ; Polgar *et al.*, 2005) dans la DH/le Sp5C superficiel – est bien établie dans plusieurs modèles de lésions nerveuses périphériques, la véritable identité de ces cellules reste très discutée. Pour le groupe de Woolf, il s'agit, au moins en partie, d'interneurones GABAergic (Moore *et al.*, 2002 ; Scholz *et al.*, 2005), alors que pour le groupe de Todd, il s'agit plutôt de cellules microgliales (Polgar *et al.*, 2004; Polgar *et al.*, 2005). Selon ce dernier groupe, il n'y aurait donc pas de perte neuronale dans la DH pour expliquer la diminution de l'inhibition.

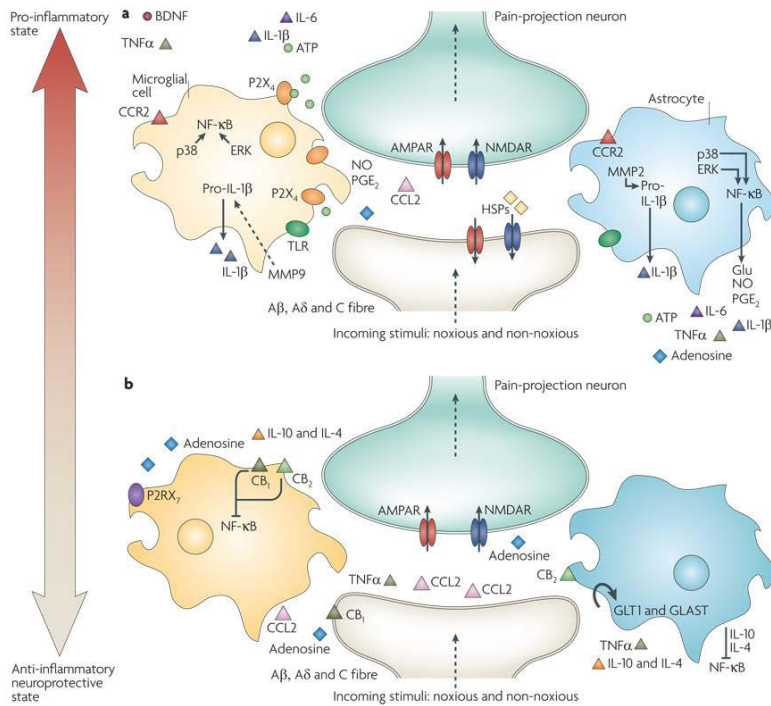
Cette désinhibition pourrait être aussi due à des changements post-synaptiques. Par exemple, une lésion d'un nerf périphérique produit une baisse de l'expression du cotransporteur  $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ , KCC2, notamment dans de nombreux neurones de projection de la couche I (Coull *et al.*, 2003). KCC2 est essentiel pour maintenir les gradients  $\text{K}^+$  et  $\text{Cl}^-$  trans-membranaires : une baisse de son expression conduit à une réduction du gradient  $\text{Cl}^-$  et une dépolarisation du potentiel d'inversion de cet ion, d'un potentiel de -70 à environ -50 mV. L'activation des  $\text{GABA}_A$ Rs sur les neurones de la couche I provoque alors une dépolarisation – par sortie des ions  $\text{Cl}^-$  –, tout au moins aux potentiels plus polarisés que -50 mV. Une réduction de l'activité de KCC2, par inhibition pharmacologique ou baisse de son expression (injection de siRNA), induit bien une allodynie mécanique chez des rats normaux Coull *et al.* (2003). Cette réduction de l'activité de KCC2 en conditions neuropathiques implique la libération d'ATP par les afférences primaires qui active des récepteurs purinergiques P2X4 (P2X4Rs) sur les cellules microgliales conduisant à l'élévation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , l'activation de la p38-mitogen-activated protein kinase (p38) et enfin la synthèse et la libération de BDNF par ces cellules microgliales (Trang *et al.*, 2009). Le BDNF à son tour active son récepteur TrkB sur les neurones, réduisant l'expression du co-transporteur KCC2 et dépolarisant le potentiel d'inversion du  $\text{Cl}^-$  (Coull *et al.*, 2005). L'injection intra-spinale de cellules microgliales, préalablement activées *in vitro*, dépolarise le potentiel d'inversion du  $\text{Cl}^-$  dans les neurones de la couche I et produit une allodynie mécanique ; ces deux effets étant supprimés si cette microglie a été pré-incubée avec des siRNA anti-BDNF (Coull *et al.*, 2005).

Il subsiste néanmoins suffisamment d'inhibition  $\text{GABA}_A$ ergique tonique en conditions inflammatoire ou neuropathique, pour que sa potentialisation réduise l'hypersensibilité à la douleur. En effet, des agonistes spécifiques des sous-unités  $\alpha 2$  et/ou  $\alpha 3$  des  $\text{GABA}_A$ R sont capables de réduire l'hypersensibilité à douleur inflammatoire ou neuropathique ; à noter, que ces agonistes n'ont pas les effets secondaires – sédatif et





hypnotique – des benzodiazépines, ligands, eux, de la sous-unité  $\alpha 1$  (Knabl *et al.*, 2008). La désinhibition en conditions inflammatoires peut être purement glycinergique, impliquant alors les prostaglandines (Harvey *et al.*, 2004). Il y a alors libération dans la DH de prostaglandine PGE2 qui active son récepteur EP2 sur les interneurons excitateurs et les neurones superficiels de projection. Il en résulte une activation de la voie cAMP-PKA et une phosphorylation de la sous-unité GlyRa3 du récepteur glycinergique, aboutissant à la suppression de l'inhibition par la glycine. Ainsi, l'hypersensibilité à la douleur mécanique ou thermique en conditions inflammatoires est fortement réduite chez des souris génétiquement déficientes en sous-unité GlyRa3. A noter ici qu'une inflammation périphérique peut aussi provoquer une désinhibition purement GABA<sub>A</sub>ergique comme après une injection faciale de capsaïcine (Peirs *et al.*, 2016).



**Figure 16. Activation gliale - des effets pro-inflammatoire aux effets anti-inflammatoires. a) Rôles pro-inflammatoires de la glie.** Si un input nociceptif persiste, lors d'une inflammation chronique ou lésion nerveuse périphérique, la sensibilisation centrale conduit à des changements transcriptionnels des neurones de 2<sup>ème</sup> ordre de la DH/du Sp5C qui altèrent durablement leur fonction. Les astrocytes répondent à cette activité synaptique soutenue en mobilisant leur  $Ca^{2+}$  intracellulaire et libérant du glutamate (Glu), de l'ATP qui se lie au récepteur P2X<sub>4</sub>, le facteur de nécrose tumorale (tumeur-necrosis factor- $\alpha$  ou TNF $\alpha$ ), les interleukins 1 $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) et IL-6, l'oxide nitrique (NO) et la prostaglandine E2 (PGE<sub>2</sub>). La microglie activée est aussi source de tous ces facteurs pro-inflammatoires. La matrix metalloproteinase 9 (MMP9) induit le clivage de la pro-IL-1 $\beta$  et l'activation microgliale, alors que la MMP2 induit aussi le clivage de la pro-IL-1 $\beta$  et maintient l'activation des astrocytes. Cette IL-1 $\beta$  active la p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) dans la microglie comme dans les astrocytes. Astrocytes et microglie expriment les récepteurs aux chemokines, CX3CR1 (non montré) et CCR2, activés en présence de leurs chemokines respectives. Après lésion nerveuse, les protéines de choc thermique (heat shock proteins ou HSPs) sont libérées et se lient au récepteur Toll-like (Toll-like receptors ou TLRs) exprimé à la fois par les astrocytes et la microglie, entretenant ainsi l'activité de ces cellules. b) **À l'opposé l'activation de la glie peut avoir un effet neuroprotecteur.** Elle libère des cytokines anti-inflammatoires, telles qu'IL-10 et IL-4, et exprime également les récepteurs cannabinoïdes (CB1 et CB2) dont on sait que leur activation a un effet anti-inflammatoire et inhibiteur de la toxicité microgliale, en supprimant les réponses chémoattractives et la transduction MAPK avec un effet inhibiteur sur les pro- cytokines pro-inflammatoires. Les transporteurs du glutamate – transporteur glutamate 1 (glutamate transporter 1 ou GLT1) et transporteur glutamate-aspartate transporteur (glutamate-aspartate transporter ou GLAST) – restaurent une concentration normale de glutamate dans la fente synaptique. L'activation par l'ATP du récepteur purinergique (P2RX7) de la microglie conduit à une libération de TNF $\alpha$  qui protège les neurones contre la toxicité par le glutamate. L'activation des astrocytes réduit la propagation de la dégénérescence tissulaire après lésion tissulaire en éliminant les débris neuronaux et cellulaires, un autre effet neuroprotecteur. (D'après Milligan & Watkins, 2009)

## 2.4. Activation des cellules gliales

Les cellules gliales, microglie comme astrocytes, contribuent aussi au processus de sensibilisation centrale par leurs interactions avec les neurones de la DH/du Sp5C (pour revue voir Tsuda *et al.*, 2005; Scholz & Woolf, 2007 ; Milligan & Watkins, 2009; Chiang *et al.*, 2011 ; Calvo *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2013 ; 2018 ; 2019 ; Berta *et al.*, 2014 ).

La microglie fonctionnerait comme les macrophages du SNC. En conditions normales, elle est distribuée uniformément dans la substance grise de la DH/du Sp5C où elle jouerait un rôle de sentinelle face aux lésions et infections. En conditions pathologiques, les cellules gliales montrent tous les signes d'une activation. Par exemple, dans les heures qui suivent une lésion nerveuse périphérique, ces cellules s'accumulent dans les couches superficielles de la DH et autour des motoneurones de la corne ventrale, là où se terminent et d'où partent, respectivement, les fibres qui ont été lésées. Le barrage d'activité dans les afférences primaires, l'hyperactivité des neurones de 2<sup>ème</sup> ordre et des cellules gliales dans la DH/le Sp5C, qui résultent de ces conditions inflammatoires ou neuropathiques, tendent à augmenter les concentrations intra- et extracellulaires de glutamate, neuropeptides (substance P), ATP, cytokines proinflammatoires – TNF- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$  et 6 –, prostaglandines et les espèces réactives à l'oxygène, qui tous accroissent la sensibilisation neuronale et l'hypersensibilité douloureuse (pour revue voir DeLeo *et al.*, 2007 ; Milligan & Watkins, 2009 ; Gwak *et al.*, 2017) (Figure 16). Ainsi, une simple injection intrathécale de microglie, préalablement activée par de l'ATP, est capable d'induire une allodynie mécanique en regard de cette injection (Tsuda *et al.*, 2003 ; Coull *et al.*, 2005).

Parmi les médiateurs libérés dans la DH/le Sp5C figure l'ATP. En conditions neuropathiques, on observe, parallèlement au développement d'une hypersensibilité à la douleur et à l'activation de la microglie, une augmentation de l'expression des récepteurs purinergiques, P2X4R (voir plus haut) sur ces cellules, dans la DH en regard de la lésion nerveuse (Tsuda *et al.*, 2003 ; 2008; Ulmann *et al.*, 2008). Or l'injection intrathécale d'un antagoniste des P2X4Rs réduit l'allodynie mécanique neuropathique, une fois établie (Tsuda *et al.*, 2003). De même, la déficience en P2X4R, provoquée par l'injection intrathécale d'ARN antisense (Tsuda *et al.*, 2003) ou manipulation génétique (Ulmann *et al.*, 2008), empêche le développement de cette hypersensibilité mécanique après lésion nerveuse périphérique. Inversement, l'administration intraspinale de microglie où l'expression de P2X4Rs a été stimulée, est suffisante pour provoquer une allodynie mécanique chez des animaux sains (Tsuda *et al.*, 2003). Le processus conduisant à cette surexpression de P2X4Rs pourrait impliquer une interrelation fibronectine/intégrine (Tsuda *et al.*, 2008). Pour rappel, l'un des effets de l'activation des P2X4Rs est la synthèse et sécrétion de BDNF par la microglie (voir plus haut). D'autres récepteurs purinergiques, P2X7 (Chessell *et al.*, 2005) et P2Y12 (Haynes *et al.*, 2006 ; Kobayashi *et al.*, 2008), semblent aussi jouer un rôle dans le développement de la sensibilisation centrale. Une inactivation de ces récepteurs, soit par blocage pharmacologique ou suppression de leur expression (knock-out ou injection d'ARN anti-sens), prévient l'hypersensibilité mécanique ou l'atténue si elle est déjà établie en conditions neuropathiques (Honore *et al.*, 2006 ; Kobayashi *et al.*, 2008; Tozaki-Saitoh *et al.*, 2008) et prévient les hypersensibilités mécanique et thermique en conditions neuropathique et inflammatoire (Chessell *et al.*, 2005) sans que la douleur aigüe ne soit altérée. A noter ici que le rôle des



récepteurs purinergiques a été exploré presque uniquement (mais voir Chessell *et al.*, 2005) dans des modèles de douleur neuropathique.

La p38 mitogen-activating kinase (p38), une autre enzyme propre à la microglie, semble, elle, jouer un rôle clé dans le développement d'une hypersensibilité cutanée neuropathique comme inflammatoire (pour revue voir Ji *et al.*, 2013). D'une part, on observe une activation (i.e. phosphorylation) de la p38 chez l'animal lors de douleurs chroniques neuropathiques (lésion d'un nerf périphérique : Jin *et al.*, 2003 ; Tsuda *et al.*, 2004 ; Kobayashi *et al.*, 2008 ; Taves *et al.*, 2016 ; **hemisection de la moelle épinière** : Crown *et al.*, 2008), inflammatoires (Svensson *et al.*, 2005 ; Li *et al.*, 2010 ; Taves *et al.*, 2016 ; Chen *et al.*, 2016 ; Zhang *et al.*, 2018 ; Paige *et al.*, 2018 ; Lin *et al.*, 2019) ou post-opératoires (Wen *et al.*, 2009 ; Zhang *et al.*, 2018). D'autre part, en conditions inflammatoires, l'administration intrathécale préventive d'inhibiteurs de la p38 (sképinone ou SB203580) atténue le comportement douloureux spontané (test au formol : Li *et al.*, 2010 ; Taves *et al.*, 2016) et l'allodynie mécanique (modèle CFA : Chen *et al.*, 2016 ; Zhang *et al.*, 2018). En conditions neuropathiques, l'injection locale de ces inhibiteurs diminue transitoirement l'allodynie mécanique (Jin *et al.*, 2003 ; Tsuda *et al.*, 2004 ; Crown *et al.*, 2008 ; Taves *et al.*, 2016 ; Zhang *et al.*, 2018). A noter, ici, que Ji et collaborateurs (Taves *et al.*, 2016) trouvent que l'administration locale de sképinone/SB203580 ne réduit l'hypersensibilité mécanique, neuropathique ou inflammatoire, que chez les animaux mâles. Cependant, s'ils n'observent pas d'activation significative de la p38 chez la souris femelle neuropathique, ils soulignent pourtant une tendance à cette activation (Taves *et al.*, 2016) et mettent en évidence une élévation de l'ARN messager codant pour la p38 dans la DH de ces femelles neuropathiques (Luo *et al.*, 2018). Ces résultats suggèrent qu'il y a bien une activation de la p38 chez le rongeur neuropathique femelle comme mâle, et que si dimorphisme sexuel il y a, il ne se réduit pas à une simple intervention ou non de la p38 dans la sensibilisation centrale de la DH ou du SNC en fonction du sexe mais implique des mécanismes plus complexes (Paige *et al.*, 2018) qui pourraient expliquer une différence entre inhibiteurs. En accord avec cette conclusion, les inhibiteurs de la p38 que nous venons de synthétiser (Visseque *et al.*, 2020) présentent chez le rat un effet anti-allodynique identique dans les deux sexes (voir article inclu dans cette thèse). Cette activation de la p38 pourrait résulter de l'interaction entre la chemokine, fractalkine, exprimée à la fois par les terminaisons des fibres afférentes primaires et les neurones de 2<sup>ème</sup> ordre de la DH/du Sp5C, avec son récepteur, le CX3CR1, exprimé uniquement par les cellules microgliales. En effet, le CX3CR1 est up-régulé à la suite de la ligation du nerf spinal (Lindia *et al.*, 2005 ; Zhuang *et al.*, 2007). L'injection intrathécale de fractalkine induit une forte activation de p38 associée à une allodynie mécanique (Zhuang *et al.*, 2007). Enfin, le blocage de CX3CR1 par un anticorps neutralisant prévient l'activation de la p38 comme le développement de l'allodynie mécanique neuropathique (Milligan *et al.*, 2004 ; Zhuang *et al.*, 2007). Une autre voie d'activation de la p38 microgliale est celle de l'activation du récepteur P2Y12 par l'ATP (Kobayashi *et al.*, 2008).

Les astrocytes aussi jouent un rôle clé dans le maintien des douleurs chroniques et de la sensibilisation centrale (voir revue dans Ren & Dubner, 2008 ; Ji *et al.*, 2019). Ainsi en réponse à une lésion ou une inflammation de nerf périphérique, conduisant à une douleur neuropathique, les astrocytes de la DH/du Sp5C sont activés et libèrent des cytokines pro-inflammatoires, des chemokines et des gliotransmetteurs variés. Cette activation se traduit par une augmentation de l'expression de la glial fibrillary acidic protein (GFAP) par les astrocytes



(CD : Ducourneau *et al.*, 2014 ; Sp5C : Miraucourt *et al.*, 2011). Une fois activés, les astrocytes sont le siège de modifications non seulement morphologiques mais aussi physiologiques, associées à une hypersensibilité à la douleur. Ainsi, inhiber les astrocytes atténue cette hypersensibilité à la douleur, comme le montre la réduction de l'allodynie mécanique (extra-céphalique : Ducourneau *et al.*, 2014 ; céphalique : Miraucourt *et al.*, 2011). Un des mécanismes cellulaires sous-tendant ces changements dans les astrocytes pourrait impliquer des canaux  $K^+$  de type Kir 4.1. Ces canaux sont exprimés uniquement dans les astrocytes où ils contribuent au courants  $K^+$  de grande conductance, à l'homéostasie du  $K^+$  extracellulaire, au maintien du potentiel de membrane, à la régulation du volume cellulaire et à la recapture du glutamate (Olsen *et al.*, 2015). Une réduction de l'expression et/ou de l'activité des canaux Kir4.1 est associée à des pathologies du SNC telles que l'épilepsie, la maladie de Huntington, l'ataxie spino-cerebelleuse, la dépression (Cui *et al.*, 2018 ; Tong *et al.* 2014) et la douleur chronique (Mountadem *et al.*, En préparation).

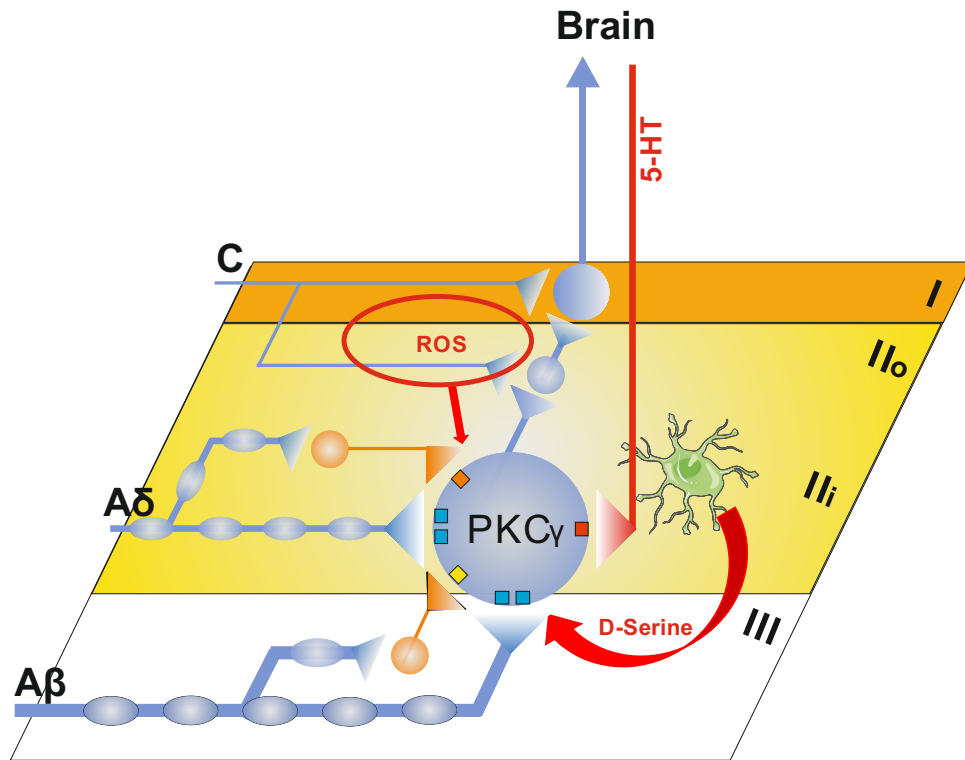
Contrairement à la microglie, l'activation astrocytaire est généralement retardée mais prolongée, persistant plus longtemps jusqu'à plusieurs mois. Les astrocytes pourraient être plus particulièrement impliqués dans le maintien plutôt que dans l'induction de la sensibilisation centrale et la douleur chronique. A noter que la lésion d'un nerf périphérique active la glie non seulement au niveau segmentaire mais aussi supra-segmentaire, contribuant ainsi à une facilitation du traitement du message douloureux par la DH/le Sp5C par les projections facilitatrices descendantes particulièrement importante lors du début de la lésion (pour revue voir Ren & Dubner, 2008 ; Basbaum *et al.*, 2009).

## **2.5. Altération des voies descendantes de modulation de la douleur**

Les voies descendantes en provenance de régions supra-segmentaires modulent non seulement l'activité des neurones de la DH/du Sp5C, mais aussi la sensibilisation centrale (voir revue Bannister & Dickenson, 2017 ; Lockwood & Dickenson, 2020).

Ainsi l'activation de la boucle neurone de projection  $NK1^+$  de la couche I–tronc cérébral (RVM)–voie descendante 5-HT (Suzuki *et al.*, 2002) apparaît nécessaire à l'expression comportementale, électrophysiologique et anatomique de la sensibilisation centrale en conditions neuropathiques, dans la DH via l'activation de récepteurs 5-HT<sub>3</sub> (modèle de ligature de racines lombaires : Suzuki *et al.*, 2002) ou en conditions inflammatoires, dans le Sp5C via l'activation de récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> (modèle CFA de la face Alba-Delgado *et al.*, 2018). Mais la 5-HT paraît avoir aussi des effets anti-sensibilisation centrale. Une hémisection de la moelle épinière, provoque une potentialisation des réponses de l'ensemble des neurones de 2<sup>ème</sup> ordre – NS, WDR et neurones répondant à une stimulation mécanique à bas seuil – à la stimulation de leur RF et une augmentation du nombre de neurones classés comme WDR dans la DH caudale par rapport à la section. La transplantation de cellules RN46A-B14, précurseurs sérotonergiques, restaure à la fois l'activité des neurones et les proportions de différents neurones (Hains *et al.*, 2003).





**Figure 17: Schéma des microcircuits proposés pour expliquer l'existence de deux allodynies mécaniques, dynamique et statique.** Les fibres afférentes primaires,  $A\beta$  et  $A\delta$ , et les inputs inhibiteurs, glycinergique et  $GABA_A$ ergique, probablement activés par, respectivement, les fibres  $A\beta$  et  $A\delta$ , font synapse sur les interneurons  $PKC\gamma$  de la couche  $II_i$  (carrés bleus: AMPAR et NMDAR; carrés oranges: GlyR; carrés jaunes:  $GABA_A$ R). En conditions normales, les circuits inhibiteurs feedforward empêchent les inputs  $A\beta$  et  $A\delta$  d'activer les interneurons  $PKC\gamma$  et donc les interneurons centraux, qui contactent à leur tour les neurones de projection de la couche I. Les interneurons centraux et les neurones de projection de la couche I reçoivent les fibres afférentes primaires C. En conditions de douleur chronique, les inputs LTMRs,  $A\beta$  ou  $A\delta$ , peuvent activer les interneurons  $PKC\gamma$  qui activent à leur tour les interneurons centraux et neurones de projection de la couche I, transformant ce message tactile en douleur. Plusieurs mécanismes peuvent contribuer à ouvrir la 'porte' dont la désinhibition glycinergique et  $GABA_A$ ergique, la libération de facteurs diffusibles tels que ROS, l'activation d'astrocytes (en vert) qui libèrent de la D-serine, un co-agoniste des NMDARs, et l'altération des voies descendantes sérotoninergiques qui contrôlent les interneurons  $PKC\gamma$  par les récepteurs  $5-HT_{2A}$  (carrés rouges). (D'après Artola et al., 2020)

Les efférences descendantes noradrénergiques inhibent la libération de neurotransmetteurs au niveau de la 1<sup>ère</sup> synapse sur les voies de la douleur dans la DH/le Sp5C via l'activation de récepteurs  $\alpha 2$  adrénergiques (Millan, 2002). Dans certaines conditions neuropathiques, les récepteurs  $\alpha 2$ -adrénergiques diminuent, conduisant à une augmentation de la sensibilité douloureuse (Basbaum & Jessell, 2000).

En conclusion, potentialisation de la transmission excitatrice, facilitation de l'excitabilité des neurones excitateurs, réduction du tonus inhibiteur dans les couches superficielles de la DH/du Sp5C, interrelation neurone-glie et modulation des voies descendantes contribuent à l'apparition des différents symptômes douloureux. Cependant, chacun de ces symptômes résulte vraisemblablement de différentes combinaisons de ces mécanismes. Par exemple on peut penser qu'une (i) LTP de la synapse fibre afférente C-neurone de projection de la couche I et une (ii) réduction du transporteur KCC2 – et donc une désinhibition – dans le neurone postsynaptique s'associent pour provoquer une hyperalgésie.

Par contre, la désinhibition joue vraisemblablement le rôle principal dans l'allodynie mécanique. On sait que ce symptôme est associé à l'activation d'un circuit intrinsèque à la DH/au Sp5C par lequel les informations mécaniques à bas seuil, qui aboutissent dans les couches profondes, peuvent gagner les voies de la douleur dans les couches superficielles (Figure 17). En conditions normales, ce circuit, bien qu'anatomiquement présent, est fonctionnellement inactif, parce que sous un fort contrôle inhibiteur. En conditions pathologiques, cette inhibition est levée est l'information tactile peut activer les neurones de la couche I (Torsney & MacDermott, 2006 ; Miraucourt *et al.*, 2007 ; Lu *et al.*, 2013 ; Petitjean *et al.*, 2015 ; pour revue voir Artola *et al.*, 2020). D'où le rôle clé de la désinhibition. Mais de quelle désinhibition, glycinergique ou GABA<sub>A</sub>ergique, s'agit-il ? En effet, on reconnaît, cliniquement, deux types d'allodynie mécanique en fonction de la nature du stimulus qui la déclenche : l'allodynie mécanique dynamique, déclenchée par un stimulus en déplacement (comme un pinceau ou une mèche de coton) et l'allodynie mécanique statique, provoquée par l'application d'une pression ou d'un stimulus fixe (comme les filaments de von Frey), informations transmises par, respectivement, des fibres afférentes primaires A $\beta$  et A $\delta$  (Koltzenburg *et al.*, 1992; Ochoa & Yarnitsky, 1993; Field *et al.*, 1999). De nombreux résultats confirment que leurs mécanismes sont bien distincts. D'une part, ces deux allodynies peuvent se manifester indépendamment l'une de l'autre. Chez l'homme, après une injection cutanée de capsaïcine, l'allodynie mécanique statique s'étend sur un territoire plus large et dure plus longtemps que l'allodynie mécanique dynamique (LaMotte *et al.*, 1991; Scanlon *et al.*, 2006). Chez le rat, dans le modèle de constriction chronique du nerf sciatique, l'allodynie mécanique statique apparaît d'abord (progressivement de J8 à J19) puis l'allodynie mécanique dynamique, à partir du 19<sup>ème</sup> jour et chez seulement 80% des rats (Field *et al.*, 1999). D'autre part, ces deux allodynies présentent des sensibilités pharmacologiques différentes (Tableau 1). Chez le rat, la morphine supprime l'allodynie statique, mais pas dynamique, en conditions neuropathiques (Field *et al.*, 1999) comme après désinhibition segmentaire (Miraucourt *et al.*, 2009) alors que la prégabaline réduit les deux (Field *et al.*, 1999). Enfin, ces deux allodynies paraissent être sous des contrôles inhibiteurs différents. Chez le rat, une désinhibition glycinergique du Sp5C provoque une allodynie mécanique dynamique, mais non statique, de la

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

**Tableau 1** : Effet de différentes substances pharmacologiques sur les allodynies statique et dynamique dans un modèle de douleur neuropathique provoquée par une constriction chronique du nerf sciatique.

face (Miraucourt *et al.*, 2007) alors qu'inversement, une désinhibition GABAergique produit une allodynie mécanique statique, mais non dynamique (Miraucourt *et al.*, 2009 ; Peirs *et al.*, 2016).

De même, l'application locale de bicuculline potentialise les réponses des neurones de la DH à une stimulation mécanique ou électrique des fibres A $\delta$ , mais non A $\beta$  (Reeve *et al.*, 1998; Kontinen *et al.*, 2001; Seagrove *et al.*, 2004). Cependant, il faut aussi noter des exemples d'allodynie mécanique dynamique trigéminal (Lee *et al.*, 2010) et extra-céphalique (Ishikawa *et al.* 2000; Onaka *et al.*, 1996) après application locale de bicuculline et, inversement, d'allodynie mécanique statique après désinhibition glycinergique (Lu *et al.*, 2013 ; Foster *et al.*, 2015). Néanmoins, ces résultats suggèrent que les informations mécaniques, dynamique et statique, sont véhiculées par des fibres afférentes primaires différentes, respectivement A $\beta$  et A $\delta$ , et que ces deux inputs sont sous des contrôles inhibiteurs différents, respectivement glycinergique et GABA<sub>A</sub>ergique. Etant donné que la manifestation de ces deux allodynies dépend de l'activation de la PKC $\gamma$ , enzyme concentrée par une population spécifique de la couche II<sub>i</sub> (pour revue voir Artola *et al.*, 2020), ces résultats suggèrent l'existence de deux circuits convergeant sur l'interneurone PKC $\gamma$  (Figure 17).

Cependant, si potentialisation de la transmission excitatrice, facilitation de l'excitabilité des neurones excitateurs, réduction du tonus inhibiteur dans les couches superficielles de la DH/du Sp5C, interrelation neurone-glie et modulation des voies descendantes semblent jouer les premiers rôles, d'autres processus ont pu être observés. Lors d'une constriction chronique du nerf sciatique, l'expression des ARN messagers pour les tachykinines, précurseurs de la substance P, augmente dans les corps cellulaires des neurones de petit et moyen diamètre dans les 5 premiers jours après la lésion puis diminue après 10 jours. La substance P participerait à la régénérescence des neurones lésés en stimulant la croissance axonale et la formation de nouvelles connections au niveau de leur RF. Plus surprenant, 30% des neurones A $\beta$  présentant des signes de dégénérescence post-lésionnelle, expriment progressivement (entre J2-J10) les ARN messagers pour les tachykinines, mimant ainsi le phénotype des fibres C dans ces conditions neuropathiques (Marchand *et al.*, 1994). De plus, en conditions neuropathiques, ces fibres A $\beta$  semblent s'étendre (en Anglais 'sprouting') de leur site de terminaison normal, dans les couches profondes, vers les neurones de la couche II. Chez le rat neuropathique, une stimulation tactile non-douloureuse augmente l'expression de la protéine Fos au niveau de la couche II de la DH (Bester *et al.*, 2000). Après lésion d'un nerf périphérique, les terminaisons centrales des fibres afférentes myélinisées axotomisées, dont les fibres A $\beta$ , envahissent la couche II (Woolf *et al.*, 1992 ; Koerber *et al.*, 1994). De même, on retrouve dans la couche II la sous-unité B de la toxine du choléra (CTb), qui marque spécifiquement ces fibres A $\beta$  myélinisées (Woolf *et al.*, 1995). Cependant, Shehab *et al.*, (2003) ont invalidé cette interprétation, en montrant que ces fibres CTb<sup>+</sup> expriment aussi le peptide vasoactif intestinale (en Anglais Vaso-Intestinal Peptide ou VIP) et le neuropeptide Y (NPY), marqueurs spécifiques des fibres afférentes primaires C de petit diamètre.



## V. QUE NOUS APPRENNENT LES MODELES ANIMAUX DE DOULEUR CHRONIQUE TRIGEMINALE ?

Comme ailleurs, deux familles de modèles animaux ont été utilisés : modèles neuropathique (par lésion d'une des branches du nerf trijumeau) et inflammatoires (par injection d'une substance pro-inflammatoire comme le formol ou le CFA) au niveau cutané, articulaire (TMJ) ou dentaire.

### 1. MODELES DE DOULEUR TRIGEMINALE NEUROPATHIQUE

Deux branches du nerf trigéminal ont été lésées pour créer un modèle de douleur neuropathique trigéminal: (i) le nerf mandibulaire (en Anglais : Inferior Alveolar Nerve ou IAN) qui subit une transection (Bonghenhielm *et al.*, 2000; Iwata *et al.*, 2004; Tsuboi *et al.*, 2004 ; Nakagawa *et al.*, 2010), ou (ii) le nerf infra-orbitaire (en Anglais : InfraOrbital Nerve ou ION), branche du nerf maxillaire, qui subit une ischémie partielle (Eriksson *et al.*, 2005), une transection partielle (Miyamoto *et al.*, 2011) ou une constriction chronique (ou ION-CCI dans les publications) (Kitagawa *et al.*, 2006 ; Shinoda *et al.*, 2007; Alvarez *et al.*, 2011 ; Susuki *et al.*, 2013; Teodoro *et al.*, 2013).

Une lésion d'une branche trigéminal périphérique provoque toujours une hypersensibilité cutanée, qu'elle soit mécanique (Iwata *et al.*, 2004 ; Tsuboi *et al.*, 2004 ; Kitagawa *et al.*, 2006; Nakagawa *et al.*, 2010 ; Miyamoto *et al.*, 2011 ; Alvarez *et al.*, 2011) ou mécanique et thermique (Eriksson *et al.*, 2005; Shinoda *et al.*, 2007; Susuki *et al.*, 2013; Teodoro *et al.*, 2013). Il faut noter que cette hypersensibilité peut diffuser à des territoires non lésés, à la lèvre supérieure dans le cas d'une lésion de l'IAN (Iwata *et al.*, 2004 ; Tsuboi *et al.*, 2004) et même au-delà de la face dans le cas d'une lésion de l'ION (Eriksson *et al.*, 2005). Cette allodynie mécanique tend à se prolonger au-delà de 14 jours, après lésion de l'ION Kitagawa *et al.*, 2006 ; Miyamoto *et al.*, 2011 ; Alvarez *et al.*, 2011) comme de l'IAN (Nakagawa *et al.*, 2010) ; l'allodynie thermique est plus brève (Eriksson *et al.*, 2005).

Ces lésions des nerfs périphériques s'accompagnent d'une élévation de l'activité spontanée et d'une potentialisation des réponses aux stimulations mécaniques des fibres afférentes spécifiquement A $\delta$ , que ce soit dans l'ION après lésion de l'IAN (Iwata *et al.*, 2004 ; Tsuboi *et al.*, 2004 ; Nakagawa *et al.*, 2010) ou dans l'ION après sa constriction (Kitagawa *et al.*, 2006). Cette élévation de l'activité des fibres afférentes pourrait, elle aussi, expliquer l'apparition de douleurs spontanées comme d'une allodynie ou d'une hyperalgésie. Elle est vraisemblablement due à une hyperexcitabilité des neurones trigéminaux –dépolarisation du potentiel de repos, réduction de la rhéobase et augmentation du nombre de potentiel d'action déclenchés par une dépolarisation (modèle IAN : Tsuboi *et al.*, 2004 ; Nakagawa *et al.*, 2010) – elle-même provoquées par des variations des courants membranaires. Il est intéressant de noter que ces variations de courants membranaires sont communes aux deux modèles : augmentation des courants Na<sup>+</sup> (IAN : Nakagawa *et al.*, 2010), réduction des courants K<sup>+</sup>, I<sub>K</sub> et I<sub>A</sub> (IAN : Tsuboi *et al.*, 2004 ; Nakagawa *et al.*, 2010 ; ION : Kitagawa *et al.*, 2006) mais augmentation du



courant  $K^+$  activé par l'hyperpolarisation,  $I_h$  (IAN : Iwata *et al.*, 2004; Tsuboi *et al.*, 2004 ; ION : Kitagawa *et al.*, 2006). A ces variations de courants membranaires correspondent des variations d'ARN messenger codant pour les différents canaux des neurones trigéminaux : élévation des ARNs messagers codant pour le canal  $Na(v)1.3$ , mais réduction de ceux codant pour les canaux  $Na(v)1.8$  and  $Na(v)1.9$  (IAN : Bongenhielm *et al.*, 2000; ION : Eriksson *et al.*, 2005), variations tout à fait identiques à celles observées dans le DRG du rat neuropathique (Casals-Diaz *et al.*, 2015). Il est important de noter que le modèle IAN consistant à couper le nerf, les seuils mécaniques et l'activité neuronale mesurés quelques jours après la lésion l'ont été dans la lèvre supérieure et le nerf infra-orbitaire (Iwata *et al.*, 2004 ; Tsuboi *et al.*, 2004), donc dans un autre nerf que celui lésé. Cela traduit une diffusion des phénomènes de sensibilisation périphérique – ici variations de l'activité et des courants membranaires des neurones de 1<sup>er</sup> ordre.

Cette sensibilisation périphérique pourrait être en partie liée à l'accumulation de neuropeptides (substance P, neurokinine A, CGRP) et de facteurs neurostimulateurs tels que l'ATP dans le ganglion trigéminal après lésion nerveuse (Iwata *et al.*, 2011). Ceux-ci pourraient jouer un rôle clé dans l'hypersensibilité trigéminal neuropathique notamment au chaud. Dans le modèle ION, on observe une augmentation des neurones de petit diamètre immunoréactifs pour le récepteur P2X3 à l'ATP, dans le ganglion trigéminal (Shinoda *et al.*, 2007). Or, l'hypersensibilité au chaud de la lèvre supérieure provoquée par la lésion de l'ION est inhibée par une injection sous-cutanée d'antagoniste des récepteurs P2X et, au contraire, exacerbée par une injection d'agoniste des récepteurs P2X1 (Shinoda *et al.*, 2007). De même, l'injection de substance P dans la lèvre supérieure provoque une hyperalgésie à la chaleur et cette hyperalgésie est réduite en cas d'injection systémique préventive d'un antagoniste des récepteur NK1 qui ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique (Teodoro *et al.*, 2013). A noter qu'en conditions neuropathiques, la concentration de substance P est plus élevée dans le ganglion trigéminal que dans les DRG (Hargreaves, 2011).

Cette allodynie cutanée signe aussi la présence d'une sensibilisation centrale dans le Sp5C, marquée par une augmentation de l'activité spontanée et une potentialisation des réponses aux stimulations mécaniques des neurones WDR (IAN : Iwata *et al.*, 2004 ; ION : Susuki *et al.*, 2013) et l'élévation des marqueurs anatomiques d'activité neuronale : protéine Fos (IAN : Iwata *et al.*, 2004) ou phospho-ERK (ION : Miyamoto *et al.*, 2011 ; Susuki *et al.*, 2013).

Cette sensibilisation centrale fait intervenir les sous-unités GluR2 et GluR3 des AMPAR et la voie des MAPK. Ainsi, on n'observe ni allodynie mécanique, ni élévation de l'expression de phospho-ERK dans le Sp5C à la suite d'une lésion de l'ION chez des souris où l'expression de ces sous-unités GluR2 et GluR3 est réduite – souris GluR2 and GluR3 delta7 KI (Miyamoto *et al.*, 2011). De même, l'application intra-cisternale d'un inhibiteur de MEK1, le PD98059, réduit à la fois l'allodynie mécanique et thermique, l'excitation des neurones WDR et l'élévation de phospho-ERK dans le modèle ION (Susuki *et al.*, 2013). A noter que cette sensibilisation centrale neuropathique implique non seulement le Sp5C mais aussi des aires corticales : les cortex insulaire (Alvares *et al.*, 2009) et préfrontal ventro-médian (Devoize *et al.*, 2011).





## 2. MODELES DE DOULEURS INFLAMMATOIRES TRIGEMINALES

Il existe plusieurs modèles animaux de douleur inflammatoire dans l'aire trigéminal. Certains ne sont que des extensions à la sphère orofaciale de modèles utilisés ailleurs dans le corps. Ce sont des modèles d'inflammation cutanée provoquée par la capsaïcine, appliquée directement sur la peau de la face (Honda *et al.*, 2008) ou injectée en sous-cutanée dans la lèvre supérieure (Lapirot *et al.*, 2011; Peirs *et al.*, 2016) mais aussi le formol (Clavelou *et al.*, 1989 ; Teodoro *et al.*, 2013), le CFA (Morgan & Gebhart, 2008 ; Alba-Delgado *et al.*, 2018), la carraghénine ou la substance P (Teodoro *et al.*, 2013) injectés dans la lèvre supérieure. Ce sont des modèles d'arthrite par injection intra-articulaire de CFA (Yamazaki *et al.*, 2008 ; Villa *et al.*, 2010), de capsaïcine (Lam *et al.*, 2008) ou d'huile de moutarde (Bonjardim *et al.*, 2009) dans la TMJ. Il existe par ailleurs des modèles spécifiques à l'aire trigéminal, du fait de la nature même des tissus concernés, tels que les dents ou les méninges. Le premier de ces modèles spécifiques à l'aire trigéminal consiste à créer les conditions d'une inflammation de la pulpe dentaire, soit en exposant simplement la pulpe dentaire d'une molaire mandibulaire (Tsuboi *et al.*, 2011) soit en appliquant des irritants – principalement de l'huile de moutarde – directement sur la pulpe dentaire d'une molaire maxillaire (Chiang *et al.*, 1998; Sunakawa *et al.*, 1999 ; Park *et al.*, 2001 ; Chiang *et al.*, 2002 ; Park *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006). Dans le second, il s'agit d'appliquer une 'soupe inflammatoire' – mélange d'histamine, sérotonine, bradykinine et prostaglandine E2 (PGE2) – directement à la surface de la dure-mère pour déclencher une inflammation aseptique des méninges – modèle de douleur migraineuse (Burstein *et al.*, 1998 ; Edelmeyer *et al.*, 2009 ; Boyer *et al.*, 2014 ; 2017).

L'application de certaines de ces molécules déclenche un comportement évocateur d'une douleur spontanée – secousses de la tête, frottements de la face avec les pattes antérieures. Ce comportement douloureux peut être bref comme après l'application ou l'injection cutanée de capsaïcine, activant les récepteurs TRPV1 (Honda *et al.*, 2008 ; Lapirot *et al.*, 2011; Peirs *et al.*, 2016) ou l'injection intra-articulaire d'huile de moutarde (Bonjardim *et al.*, 2009). Il peut aussi être prolongé comme dans le test au formol facial, qui présente les mêmes deux phases que le test au formol de la patte postérieure (Clavelou *et al.*, 1989 ; Lapirot *et al.*, 2011 ; Teodoro *et al.*, 2013).

Dans l'ensemble de ces modèles de douleur inflammatoire de la sphère orofaciale, on observe une allodynie mécanique prolongée de la face, associée ou non à une allodynie thermique, au chaud et au froid que ce soit (i) dans la zone d'hyperalgésie secondaire voisine de l'application cutanée de capsaïcine (Honda *et al.*, 2008 ; Peirs *et al.*, 2016) ou de CFA (Morgan & Gebhart, 2008 ; Alba-Delgado *et al.*, 2018), (ii) au niveau de la peau recouvrant l'articulation temporo-mandibulaire après l'injection intra-articulaire de CFA (Yamazaki *et al.*, 2008 ; Villa *et al.*, 2010), ou (iii) sur la face à la suite de l'exposition de la pulpe d'une molaire mandibulaire (Tsuboi *et al.*, 2011) ou de l'application de soupe inflammatoire sur les méninges (Burstein *et al.*, 1998 ; Edelmeyer *et al.*, 2009 ; Boyer *et al.*, 2014 ; 2017).

Cette hypersensibilité de la peau non lésée traduit une sensibilisation centrale. Cette sensibilisation centrale siège au niveau du Sp5C, qu'elle se manifeste par (i) une élévation de l'activité électromyographique dans les



muscles masseter et digastrique, à la suite de l'application d'huile de moutarde sur la pulpe d'une molaire maxillaire (Sunakawa *et al.*, 1999), (ii) une hyperexcitabilité des neurones nociceptifs du Sp5C – élévation de l'activité spontanée, élargissement des RFs mécaniques, diminution du seuil et potentialisation de la réponse à une stimulation mécanique –, à la suite de l'injection intra-articulaire (TMJ) de capsaïcine (Lam *et al.*, 2008), de l'application d'huile de moutarde sur la pulpe d'une molaire maxillaire (Chiang *et al.*, 1998), de l'exposition de la pulpe d'une molaire mandibulaire (Tsuboi *et al.*, 2011) ou de l'application de soupe inflammatoire sur les méninges (Burstein *et al.*, 1998 ; Boyer *et al.*, 2014 ; 2017) ou (iii) une élévation du nombre de cellules phospho-ERK positives dans le Sp5C, à la suite de l'application cutanée de capsaïcine (Honda *et al.*, 2008 ; Peirs *et al.*, 2016) ou de CFA (Alba-Delgado *et al.*, 2018). Cette sensibilisation centrale implique aussi les neurones de 3<sup>ème</sup> ordre dans le thalamus comme le montrent l'élévation de l'activité spontanée, l'élargissement des RFs mécaniques, la diminution du seuil et la potentialisation de la réponse à une stimulation mécanique des neurones nociceptifs des noyaux ventro-postérieur médian et du groupe postérieur, à la suite de l'application d'huile de moutarde sur la pulpe d'une molaire maxillaire (Zhang *et al.*, 2006 ; Park *et al.*, 2006) ou de de soupe inflammatoire sur les méninges (Burstein *et al.*, 2010). Notons que, dans le modèle d'inflammation pulpaire, bloquer la transmission synaptique dans le Sp5C, mais pas dans le Sp5O, inverse la sensibilisation des neurones nociceptifs du thalamus, suggérant que l'activité, spécifiquement, des neurones du Sp5C est nécessaire au maintien de cette sensibilisation des neurones nociceptifs de 3<sup>ème</sup> ordre (Park *et al.*, 2006).

Cette sensibilisation centrale peut diffuser à d'autres régions du complexe trigéminal. Par exemple, dans le modèle d'arthrite de la TMJ, on observe aussi une sensibilisation des neurones nociceptifs du noyau paratrigéminal (Yamazaki *et al.*, 2008) et dans les modèles d'inflammation de la pulpe dentaire, celle des neurones du Sp5O (Park *et al.*, 2001 ; Chiang *et al.*, 2002).

Plusieurs mécanismes, périphériques et centraux, contribuent aux douleurs inflammatoires trigéminales. Ainsi, l'allodynie mécanique et thermique observée à la suite d'une injection de CFA dans la lèvre supérieure s'accompagne d'une élévation des canaux Nav1.8, sous la forme d'un accroissement (x2,5) de son ARN messenger dans les neurones du ganglion trigéminal ou de la protéine même, dans l'ION (Morgan & Gebhart, 2008). De plus, l'injection intra-cisternale d'ARN anti-sens pour le canal Na(v)1.8 réduit l'allodynie mécanique déjà installée, suggérant qu'une potentialisation de la fonction des canaux Nav1.8 contribue au maintien de l'allodynie trigéminal inflammatoire (Morgan & Gebhart, 2008).

La douleur inflammatoire trigéminal s'accompagne aussi d'une activation gliale. Cependant, la nature de cette réaction gliale pourrait varier en fonction du modèle de douleur inflammatoire. Ainsi, une arthrite à la suite d'une injection de CFA dans la TMJ s'accompagne d'une activation spécifiquement astrogliale dans le ganglion trigéminal et spécifiquement microgliale dans le complexe trigémino-cervical (Sp5C-C1-C2) (Vila *et al.*, 2010). Par contre, l'inflammation de la pulpe d'une molaire mandibulaire est associée à une activation astrogliale dans le Sp5C (Tsuboi *et al.*, 2011). Notons que l'allodynie mécanique, suite à la désinhibition glycinergique du Sp5C, s'accompagne aussi d'une activation astrogliale mais non microgliale (Miraucourt *et al.*, 2011). Enfin, cette



allodynie mécanique est prévenue par l'injection intra-cisternale d'un inhibiteur de la glutamine synthetase astrogliale (Tsuboi *et al.*, 2011) ou d'un inhibiteur astroglial mais non microglial (Miraucourt *et al.*, 2011).

Au niveau central, l'application locale d'un inhibiteur des NMDARs, le MK801, prévient la sensibilisation centrale des neurones des Sp5C (Chiang *et al.*, 1998) et Sp5O (Park *et al.*, 2001) à la suite d'une inflammation de la pulpe dentaire, indiquant qu'au niveau trigéminal comme ailleurs dans la DH, l'activation des NMDARs est nécessaire à l'induction d'une sensibilisation centrale (pour revue, voir Latremoliere & Woolf, 2009). Notons cependant que cette sensibilisation des neurones du Sp5O disparaît en cas de blocage de la transmission synaptique dans le Sp5C, indiquant que le maintien d'une sensibilisation centrale dans le Sp5O dépend de l'intégrité fonctionnelle du Sp5C (Chiang *et al.*, 2002). Ce résultat est à rapprocher de l'observation que l'injection d'un antagoniste des NMDARs au niveau des couches superficielles du Sp5C, inhibe le wind-up des neurones WDR du Sp5O, indiquant que ce phénomène est modulé par un circuit neuronal Sp5C-Sp5O (Woda *et al.*, 2001). Ainsi, l'activité neuronale dans le Sp5C joue un rôle clé dans le maintien des sensibilisations centrales non seulement du thalamus mais aussi du Sp5O. L'induction d'une sensibilisation centrale du Sp5C nécessite aussi l'activation de MEK. En effet, l'allodynie mécanique et thermique observée à la suite d'une application de capsaïcine sur la face est fortement atténuée en cas d'injection préventive (intra-cisternale) d'un inhibiteur de MEK (Honda *et al.*, 2008). Enfin, des résultats récents indiquent que l'allodynie mécanique induite par l'injection de CFA dans la lèvre supérieure implique une réorganisation anatomique profonde—réduction des arborisations dendritiques et augmentation de la densité des épines—des interneurones PKC $\gamma^+$  de la couche II<sub>i</sub> du Sp5C à la suite de l'activation d'une voie métabolique mettant en jeu les récepteurs 5-HT<sub>2A</sub>R, la PKC $\gamma$  et ERK1/2 (Alba-Delgado *et al.*, 2018).



## VI. ROLE SPECIFIQUE DE CERTAINES KINASES DANS LA SENSIBILISATION : LA CYCLIN-DEPENDENT KINASE 5' (CDK5)

Plusieurs enzymes jouent un rôle clé dans ces phénomènes de sensibilisation dont ERK (pour revue voir Ji *et al.*, 2007), p38-MAPK (voir plus haut), PKC $\gamma$  (pour revue voir Artola *et al.*, 2020) et plus récemment la 'cyclin-dependent kinase 5' (CDK5) ou kinase n°5 dépendant d'une cycline (Cdk5).

La Cdk5 est une kinase protéique serine/thréonine dirigée par la proline, capable de phosphoryler la séquence (S/T)PX(K/H/R), séquence présente dans les protéines de diverses espèces, depuis le *Saccharomyces cerevisia* jusqu'à l'homme. Chez l'homme, il existe 13 Cdks (Cdk1 – Cdk13) différentes, exprimées notamment dans les cellules en cours de mitose (Shah & Lahiri, 2014). Chez la plupart des Cdks, l'activation par la cycline est associée à la phosphorylation du 'T-loop' de l'enzyme ; sauf pour la Cdk5. En effet, même si sa séquence est hautement homologue avec celles des autres Cdks, la Cdk5 ne nécessite ni activation par les cyclines ni phosphorylation du T-loop. De plus, la Cdk5 remplit de nombreuses fonctions dans les cellules, même aux stades de différenciation (Malumbres, 2014).

La Cdk5 a été identifiée pour première fois en 1992. Elle est encodée par un gène présent sur le chromosome 7q36. Ses facteurs de transcriptions sont Fox et CREB à travers la voie MEK/ERK par  $\delta$ FosB (Chen *et al.*, 2000; Lee & Kim 2004). La Cdk5 est vitale pour le développement non seulement du SNC (Dhavan and Tsai 2001; Utreras *et al.*, 2009; Hall *et al.*, 2018) mais aussi des systèmes lymphatique, immunitaire ou vasculaire. La Cdk5 est exprimée dans toutes les cellules de l'organisme, mais principalement active dans les neurones du fait de la forte expression de ses activateurs, p35 et p39 (Dhavan & Tsai 2001; Pareek *et al.*, 2006; Pareek & Kulkarni, 2006). Ainsi, l'absence d'expression de p35 chez la souris (knockout ou KO ; p35<sup>-/-</sup>) entraîne une lamination défectueuse du néocortex et une létalité sporadique (Chae *et al.*, 1997). Cependant, ce phénotype est moins sévère que celui des souris Cdk5<sup>-/-</sup>, qui, elles, meurent dès la naissance.

L'activateur de la Cdk5, la protéine p35 est principalement exprimée par les neurones (voir la régulation de l'activité de la Cdk5 : Figure 18). Du fait de sa séquence de myristoylation, elle est normalement localisée sur la membrane plasmique (Patrick *et al.*, 1999). Cependant, elle peut aussi être cytoplasmique après phosphorylation de la S8. Ses déplacements favorisent son interaction avec la Cdk5 et permettent ainsi la phosphorylation de cibles aussi bien membranaires que cytoplasmiques. La protéine p39 est un autre activateur de Cdk5. Comparée à p35, p39 prédomine dans certaines régions du cerveau post natal dont le néocortex (Takahashi *et al.*, 2003). Les souris p39<sup>-/-</sup> ne présentent pas d'anomalies clairement visibles, mais le double KO, p35<sup>-/-</sup>/p39<sup>-/-</sup>, exprime un phénotype semblable à celui de la souris Cdk5<sup>-/-</sup> (Ko *et al.*, 2001), suggérant que p39 ne joue pas le rôle principal dans l'activation de la Cdk5 mais est nécessaire au développement du SNC en cas d'absence de p35. En plus de p35 et de p39, la Cdk5 peut aussi être activée par la cycline I. Le complexe Cdk5/cycline I active des cibles nucléaires (Hagmann *et al.*, 2015) et accroît ainsi le niveau des protéines anti-apoptotiques, B-cell lymphoma 2 (Bcl2) et B-cell lymphoma 211 (Bcl211). Il est important de noter que l'activation de la Cdk5 par la cycline I est nécessaire à l'élévation du taux de ces protéines (Brinkkoetter et al., 2009; Brinkkoetter et al., 2010).



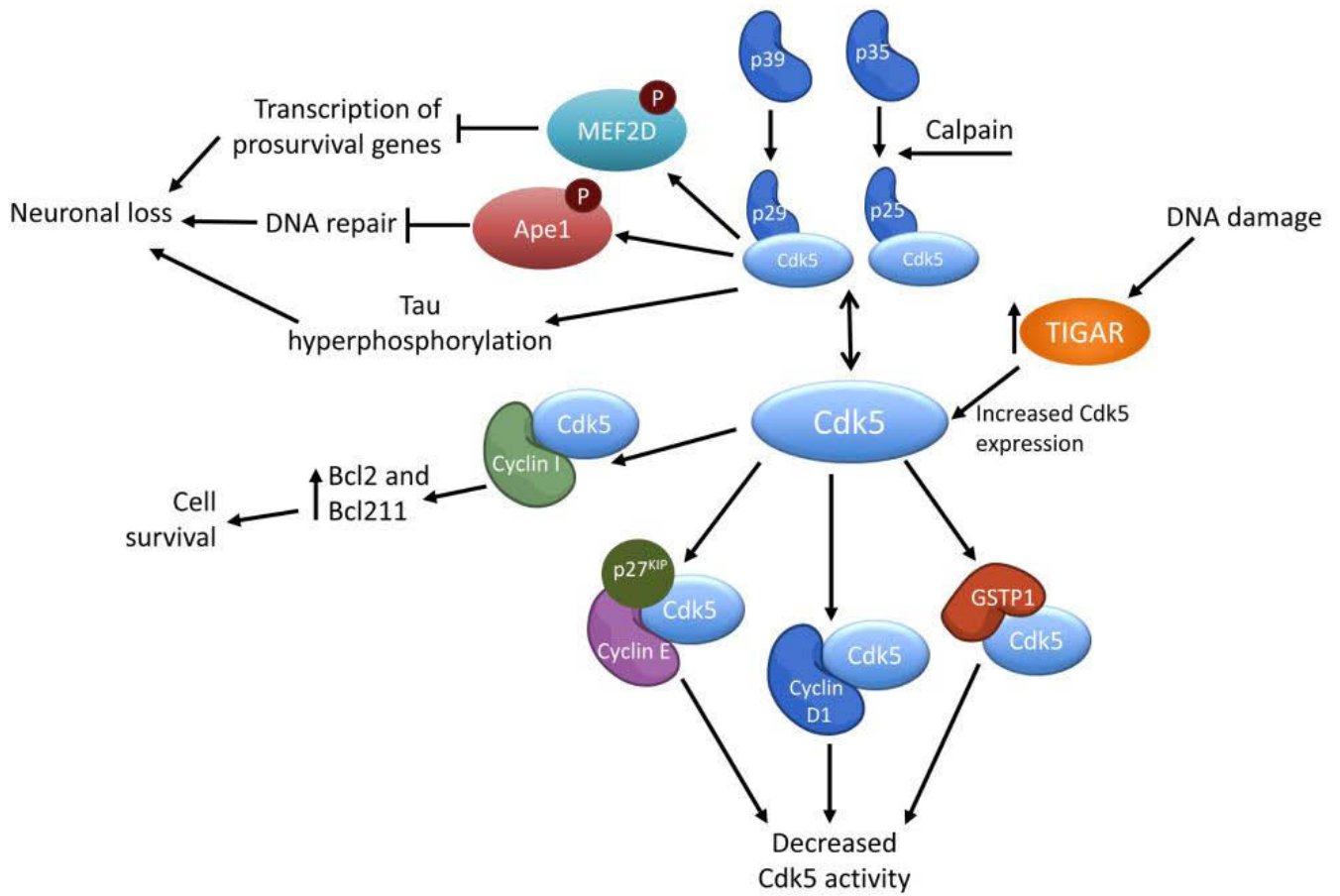


Figure 18 : Schéma de la régulation de l'activité de la Cdk5. (D'après Shupp et al., 2017)

En plus d'être activée par p35, p39 et cycline I, la Cdk5 est modulée par d'autres protéines, dont les cyclines D1 et E et la Glutathionne S Transférase (GSTP1). Ces protéines entrent en compétition avec la p35 pour se fixer sur la Cdk5 avec laquelle elles forment un complexe inactif (Xiong *et al.*, 1992; Bates *et al.*, 1994; Patrick *et al.*, 1999; Odajima *et al.*, 2011; Sundaram *et al.*, 2013).

Au niveau neuronal, la Cdk5 a un rôle à la fois pré- et postsynaptique (pour revues voir Dhavan & Tsai, 2001 ; Strock *et al.*, 2006). En effet, trois protéines présynaptiques, impliquées dans la neurosécrétion et l'endocytose – Synapsine 1, MUNC18 et amphiphysine – sont des cibles de Cdk5. Synapsine est une phosphoprotéine abondante dans les vésicules synaptiques. MUNC18 interagit avec la protéine SNARE : syntaxin. La phosphorylation de MUNC18 par la Cdk5 sur la Thr574 bloque le complexe MUNC18-syntaxin 1. Finalement, amphiphysine 1 participe à l'endocytose des vésicules synaptiques. Cdk5 pourrait ainsi jouer un rôle dans le transport vésiculaire et la sécrétion membranaire. Au niveau postsynaptique, la Cdk5 participe au développement de la jonction neuromusculaire : le complexe Cdk5/p35 co-localise avec les récepteurs à l'acétylcholine. De même, la Cdk5 phosphoryle DARPP32 qui module la signalisation dopaminergique dans le SNC : l'inhibition de l'activité Cdk5 potentialise la réponse dopaminergique dans le striatum.

Cdk5 joue aussi un rôle clé dans la signalisation de la douleur (Pareek *et al.*, 2006, Pareek & Kulkarni, 2006; Utreras *et al.*, 2009). Comparées à des souris sauvages, des souris p35<sup>-/-</sup> – subissant une réduction de l'activité Cdk5 – ou des souris KO conditionnelles pour la Cdk5 dans les neurones nociceptifs du Trijumeau, présentent une hypoalgésie tandis que des souris transgéniques qui surexpriment p35 (Tg p35) – avec une augmentation de l'activité Cdk5 –, présentent au contraire une hyperalgésie (Pareek *et al.*, 2006; Pareek & Kulkarni 2006; Pareek *et al.*, 2007; Prochazkova *et al.*, 2017).

Au niveau moléculaire, la Cdk5 phosphoryle plusieurs protéines impliquées dans la signalisation douloureuse (Contreras-Vallejos *et al.*, 2012), dont le canal TRPV1 (sur T407), avec pour conséquence une élévation du [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> dans le neurone nociceptif (Pareek *et al.*, 2007). De plus, elle contribue aussi au transport vésiculaire de ce récepteur vers la membrane plasmique (Liu *et al.*, 2015) à travers la phosphorylation du moteur moléculaire KIF13B (Xing *et al.*, 2012). Cdk5 phosphoryle aussi (i) le récepteur delta opioïde, contribuant à sa dérégulation et la tolérance à la morphine (Xie *et al.*, 2009 ; Beaudry *et al.*, 2015), (ii) TRPA1, modifiant la sensibilité chimique des neurones nociceptifs (Sulak *et al.*, 2018) et (iii) le récepteur P2X2 (sur T372), diminuant sa sensibilité (Coddou *et al.*, 2017). Cdk5 forme également un complexe trimérique avec P2X3, qu'elle phosphoryle (Nair *et al.*, 2010). Cdk5 phosphoryle plusieurs protéines importantes non seulement pour le développement du système nerveux mais aussi pour la signalisation douloureuse : ainsi le récepteur à la tyrosine kinase B (TrkB) (Zhang *et al.*, 2014), le type 5 du récepteur métabotrope au glutamate (mGluR5) (Li *et al.*, 2014), et la protéine basique de la myéline (MBP) (Luo *et al.*, 2016). Tout cela suggère une contribution de la Cdk5 à la sensibilisation périphérique.

Une inflammation périphérique à la suite d'une injection sous-cutanée de carraghénine (Pareek *et al.*, 2006)



ou de CFA (Fang *et al.*, 2015) dans la patte postérieure de rat augmente l'expression de p35 mais aussi l'activité de la calpaïne. Or cette enzyme scinde p35 en p25 et p10, avec pour conséquence une augmentation de l'activité de la Cdk5 dans les neurones nociceptifs de 1<sup>er</sup> ordre, dans les DRG, mais aussi de 2<sup>ème</sup> ordre, dans la DH (Pareek *et al.*, 2006 ; Yang *et al.*, 2007). En effet, le fragment p25 se fixe aussi sur la Cdk5. Or ce déplacement de p35 de la Cdk5 par le p25, qui ne comprend plus les séquences de myristoylation et d'ubiquitination pour la dégradation, contenues dans p10 (Patrick *et al.*, 1999) et a donc une vie moyenne supérieure à celle de p35, équivaut à une activité kinase plus élevée (Takahashi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2017). De plus en conditions inflammatoires, plusieurs médiateurs sécrétés dans le milieu extracellulaire modulent l'activité de la Cdk5 dans les neurones nociceptifs (Utreras *et al.*, 2009). Ainsi, l'expression de NGF augmente l'activité de la Cdk5, à travers l'activation de la voie de signalisation de ERK1/2, avec pour conséquence une sur-expression d'Egr-1, le facteur de transcription de la région promotrice du gène de p35, élevant l'expression de p35 et par conséquence l'activité kinase de la Cdk5 (Harada *et al.*, 2001). A noter qu'une telle fragmentation de p35 s'observe aussi au cours du stress, comme en présence du peptide amyloïde beta, d'excitotoxicité ou de stress oxydatif (Patrick *et al.*, 1999; Sahlgren *et al.*, 2006).

En conditions neuropathiques (lésion d'un nerf périphérique), on observe une élévation de la forme phosphorylée par la Cdk5 de la 'collapsin response mediator protein 2' (CRMP2) – une protéine qui régule les canaux Ca<sup>2+</sup> et Na<sup>+</sup> voltage-dépendants présynaptiques— dans le DRG et la DH (Moutal *et al.*, 2019). Or interférer avec l'expression de la CRMP2 (par l'injection intra-thécale d'un ARN interférent) ou injecter localement une forme de CRMP2 résistante à la phosphorylation par la Cdk5 normalise l'allodynie mécanique observée à la suite de la lésion du nerf périphérique. Ces résultats suggèrent que la Cdk5 pourrait être à la fois nécessaires et suffisante pour l'expression de la douleur neuropathique périphérique (Moutal *et al.*, 2019).

Tous ces travaux suggèrent l'implication de la Cdk5 dans les mécanismes périphériques de la douleur. Qu'en est-il de sa participation aux mécanismes centraux de la douleur, notamment au niveau du Sp5C ou de la DH? Certains travaux suggèrent que l'activation de la Cdk5 dans la DH contribue à la manifestation de la douleur. Ainsi, une injection intrathécale (i.t.) de roscovitine, l'inhibiteur de la Cdk5, réduit l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique dans des modèles de douleur cancéreuse (Zhang *et al.*, 2012), neuropathique (Yang *et al.*, 2014) ou post-opératoire (Liu *et al.*, 2014). De même, cette injection i.t. de roscovitine inhibe les élévations (i) de la synaptophysine dans la DH dans un modèle de douleur inflammatoire (modèle CFA ; Zhang *et al.*, 2012), (ii) de celle de la sous-unités NR2A du NMDAR dans le DRG dans un modèle de douleur neuropathique (Yang *et al.*, 2014), (iii) de celle de la sous-unité NR2B du NMDAR dans la DH dans un modèle de douleur cancéreuse (Zhang *et al.*, 2012) et (iv) de la phosphorylation de ces deux sous-unités du NMDAR et du mGluR5 dans la DH dans un modèle d'hyperalgésie post opératoire chez le rat provoquée par le remifentanyl (Liu *et al.*, 2014). Tous ces résultats suggèrent que la Cdk5 participe aux processus de sensibilisation centrale sous-tendant les douleurs chroniques.



## VII. OBJECTIFS DE CETTE THESE

Il est maintenant bien établi que la Cdk5 contribue aux mécanismes sous-tendant la manifestation d'une douleur chronique. Au niveau des neurones de 1<sup>er</sup> ordre sur les voies de la douleur, de nombreuses études montrent que la Cdk5 module la libération de neurotransmetteur et ainsi contribue à la sensibilisation périphérique. A l'autre extrémité de ces voies, au niveau du cortex pre- limbic, son activation promeut douleur chronique et anxiété en réduisant l'excitabilité intrinsèque des neurones excitateurs de ce cortex. Il est clair que la Cdk5 joue aussi un rôle dans la sensibilisation centrale au niveau segmentaire, comme le montrent les études comportementales ou les analyses par Western blot. Cependant, on ignore quels mécanismes cellulaires, moléculaires contribuant à cette sensibilisation centrale sont contrôlés spécifiquement par la Cdk5. Par exemple, on ne connaît la/les classes de neurones de la DH/du Sp5C dans lesquels le complexe Cdk5/p35 intervient.

Différents protocoles ont été utilisés pour tester l'effet de l'inhibition de la Cdk5 sur les douleurs chroniques, inflammatoire ou neuropathique. En effet, dans des conditions inflammatoires, la roscovitine est toujours appliquée avant la lésion inflammatoire périphérique – testant ainsi l'effet préventif de l'inhibition de la Cdk5 – alors que dans des conditions neuropathiques, la roscovitine est toujours appliquée après la lésion neuropathique périphérique – testant ainsi l'effet curatif de l'inhibition de la Cdk5. On ne sait donc pas si la Cdk5 joue le même rôle en conditions inflammatoires ou neuropathiques.

La plupart des travaux sur le rôle de la Cdk5 dans la sensibilisation centrale de la DH, ont exploré l'hyperalgie thermique. Peu ont exploré l'hypersensibilité mécanique cutanée.

**Nous avons utilisé l'analyse comportementale, l'électrophysiologie *in vivo*, l'analyse par Western blot et l'immunohistochimie pour étudier le rôle de la Cdk5 dans le Sp5C dans la manifestation spécifiquement de l'hypersensibilité mécanique douloureuse de la face à la suite d'une lésion inflammatoire ou neuropathique périphérique chez des rats mâles et femelles.**



# ARTICLES





# **ARTICLE 1**



**CYCLIN-DEPENDENT KINASE 5 INVOLVEMENT IN THE DORSAL HORN SENSITIZATION UNDERLYING MECHANICAL ALLODYNIA IS DEFINED BY THE NATURE OF THE INJURY**

**Nicolas PINTO-PARDO<sup>1,2,3</sup>, Karin HERAULT<sup>1</sup>, Radhouane DALLEL<sup>1</sup>  
and Alain ARTOLA<sup>1#</sup>**

<sup>1</sup>Université Clermont Auvergne, CHU Clermont-Ferrand, Inserm, Neuro-Dol, F-63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>2</sup>Universidad Viña del Mar. Escuela de ciencias de la salud, Viña del Mar, Chile

<sup>3</sup>Univesidad de los Andes. Facultad de medicina, Santiago, Chile

# Corresponding author: Alain ARTOLA, [alain.artola@uca.fr](mailto:alain.artola@uca.fr)

Inserm/UCA, U1107, Neuro-Dol, Trigeminal Pain and Migraine, Faculté de Chirurgie Dentaire  
2 rue de Braga, F-63100 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

**Key words (not included in the title):** Trigeminal pain, Spinal trigeminal nucleus caudalis, Inflammatory pain, Neuropathic pain

## **ABSTRACT**

**Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5), a serine/threonine kinase, plays important roles in neuronal development and neurodegenerative diseases. It also regulates pain signaling in primary nociceptors. Here we demonstrate that Cdk5 is critically involved in processing nociceptive information within the medullary dorsal horn (MDH) but, notably, differently in the settings of facial inflammatory and neuropathic pains. Intracisternally applied roscovitine, a Cdk5 antagonist, completely prevents inflammation-induced spontaneous pain behavior and mechanical allodynia. It also reversibly alleviates mechanical hypersensitivity after neuropathic injury but, notably, not after inflammatory injury. Local roscovitine strongly reduces baseline electrophysiological responses of MDH WDR neurons to high-strength mechanical and C-fiber electrical stimulations. It also prevents, but again cannot reverse, their inflammation-induced sensitization. p35, p25 and p-ERK1/2, but not Cdk5, protein expressions strongly increase in the trigeminal ganglion (TG) and MDH right after inflammatory injury but then decrease over time. On the other hand, p35, p25, p-ERK1/2 and Cdk5 protein expressions are still elevated in TG and MDH 2 weeks after neuropathic injury. Finally, in control conditions, Cdk5/p35 are readily apparent in all sub-classes of specifically small diameter TG neurons, C nociceptors and C-LTMRs, as well as in excitatory and inhibitory MDH neurons, but not glial cells. Cdk5/p35 cellular expression strongly increases after inflammatory injury, being then present in about 75% of MDH neurons as well as few astrocytes and microglia cells. Our findings establish Cdk5 signaling as a critical regulator of inflammatory and neuropathic MDH sensitization, making it an attractive potential target for the development of novel analgesics.**

## INTRODUCTION

The capacity to experience acute pain has a protective role. By contrast, persistent and chronic pain – whether it is initiated by peripheral tissue damage and inflammation (inflammatory pain) or lesions to the nervous system (neuropathic pain) – offers no biological advantage and causes suffering and distress (von Hehn *et al.*, 2012). Whether it is inflammatory or neuropathic, chronic pain is always characterized by persistent pain hypersensitivity, including spontaneous pain (pain experienced in the absence of any obvious peripheral stimulus), hyperalgesia (an increased responsiveness to noxious stimuli) and allodynia (pain in response to normally innocuous stimuli). Multiple molecular and cellular mechanisms operate alone or in combination within the peripheral and central nervous systems – referred to as peripheral and central sensitization, respectively – to produce these different pain symptoms (Ji *et al.*, 2003; Latremoliere & Woolf, 2009). Much of currently available treatment is only partially effective and may be accompanied by distressing side effects or have abuse potentials. Chronic pain thus constitutes an unmet medical need and it is therefore critical to discover new therapies (Finnerup & Jensen, 2006). Elucidation of the mechanisms of peripheral and central sensitizations is key to the development of treatments that specifically target underlying causes.

The cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) is a serine/threonine kinase directed by proline, activated by the neuron-specific p35 and p39 proteins, that functions in neuronal and non-neuronal cells (Su & Tsai, 2011; Contreras-Vallejos *et al.*, 2012). Cdk5 phosphorylates many cytoskeletal elements, signaling molecules, ion channels, and regulatory proteins that participate in the normal function of brain and neurodegenerative disorders. Cdk5 is also involved in pain signaling. Thus, extra-cephalic and orofacial responses to painful thermal and mechanical stimulation are decreased (hypoalgesia) in p35 knockout mice (p35<sup>-/-</sup>), which exhibit significantly reduced Cdk5 activity, whereas they are increased (hyperalgesia) in transgenic p35 (Tgp35) mice, with significantly enhanced Cdk5 activity (Pareek *et al.*, 2006; Prochazkova *et al.*, 2013). Much attention has been paid to the role of Cdk5/p35 activity in primary afferent nociceptive signaling and peripheral sensitization. On the one hand,

Cdk5/p35 protein expressions and Cdk5 activity are increased in nociceptive primary afferent neurons after inflammatory injury (Pareek *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007; Utreras *et al.*, 2009b). On the other hand, the responses to painful thermal stimuli are reduced in primary nociceptor-specific Cdk5 conditional-knockout mice (Pareek *et al.*, 2007). Moreover, some of the molecular targets of Cdk5 within primary nociceptors have been elucidated: Cdk5 potentiates TRPV1 Ca<sup>2+</sup> conductance (Pareek *et al.*, 2007; Utreras *et al.*, 2012; Rozas *et al.*, 2016; Jendryke *et al.*, 2016) and membrane trafficking (Xing *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015), delays the desensitization of P2X2/3 receptors (P2X2/3R), resulting in increased P2X2/3R-mediated Ca<sup>2+</sup> influx (Coddou *et al.*, 2017) and contributes to the production of reactive oxygen species (ROS) production by NOX1 and NOX2/NADPH oxidase complexes after inflammatory injury (Sandoval *et al.*, 2018). Altogether, these mechanisms, in combination, potentiate neurotransmitter release at the central terminals of primary nociceptors.

Whereas Cdk5 involvement in peripheral sensitization is now well established, its role in central sensitization, particularly in spinal dorsal horn (SDH) sensitization, underlying pain is much less known. Whereas intrathecally applied roscovitine, the Cdk5 antagonist, was consistently shown to attenuate pain sensitivity after inflammatory (Fang *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014), as well as neuropathic injury (Yang *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Zhong *et al.*, 2019; Gomez *et al.*, 2020), how Cdk5 activation contributes to SDH central sensitization is still unknown. Moreover, we ignore whether Cdk5 plays the same role in the setting of inflammatory and neuropathic pain. Indeed, in these previous experiments, roscovitine was always applied before inflammatory injury, thus testing the preventive effect of Cdk5 inhibition on inflammatory pain, but after neuropathic injury, testing the curative effect of Cdk5 inhibition on neuropathic pain. Finally, whether SDH Cdk5 similarly contributes to the set-up of heat and mechanical pain hypersensitivities is not clear. Indeed, whereas intrathecal administration of the Cdk5 antagonist, roscovitine, consistently prevents heat hyperalgesia (Fang *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Zhong *et al.*, 2019), it only attenuates (Yang *et al.*, 2014; Li *et*

*al.*, 2014; Zhong *et al.*, 2019; Gomez *et al.*, 2020) or even has not effect on mechanical allodynia (Yang *et al.*, 2007).

We used behavioral analysis, *in vivo* electrophysiological recordings from MDG WDR neurons, Western blot analysis and immunohistochemistry to address the role of Cdk5 in the medullary dorsal horn (MDH) in specifically mechanical pain hypersensitivity in the setting of facial inflammatory and neuropathic pain in adult male and female rats.



## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animals**

Adult males and females Sprague–Dawley rats (250 to 350g) were purchased from Charles River Laboratories (France). Rats were housed in plastic cages (3-4 rats per cage) with soft bedding and food and water *ad libitum*, maintained in climate- ( $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) and light-controlled (12 h dark/light cycle, lights on at 07:00 PM), protected units (Iffa-Credo, France) for at least 1 week before experiments. Housing cages were provided with environmental enrichment: tissue paper and cardboard (usually toilet paper rolls) for nesting and hiding. Rats were handled daily and their weight controlled as measure of wellbeing. Experiments followed the ethical guidelines of the International Association for the Study of Pain (Zimmermann, 1983) and ethical guidelines of the Directive 2010/63/UE of the European Parliament and of the Council and French Decree 2013–118 on the protection of animals used for scientific purposes. All efforts were made to minimize the number of animals used. Protocols were approved by the local animal experimentation committee: “Comité d’Ethique en Matière d’Expérimentation Animale Auvergne” (#C2EA-02) and the French Ministry for Research (#13828-2018022717075767V2).

All the experimental designs are summarized in Figure 01.

### **Behavior**

Rats were randomized into treatment groups before any assessment was performed. Behavioral assessments started on 9.00 AM. All experiments were conducted with the experimenters blinded to treatment conditions. Each rat was used only once.

### ***Facial CFA model***

Complete Freund's adjuvant (CFA; Becton Dickinson) was dissolved into saline containing Tween 80 and paraffin oil and kept at  $4^{\circ}\text{C}$ . Animals were briefly anesthetized ( $<3$  min) using a mask with 2% isoflurane and CFA (25  $\mu\text{l}$  of 5 mg/kg solution) was subcutaneously injected into the right lower lip

using a 30 gauge-needle coupled to a 100  $\mu$ l Hamilton syringe. Following recovery from anesthesia, animals were placed into the behavioral experimental room, where their mechanical sensitivity at the level of the right vibrissa pad – that is, within the area of secondary hyperalgesia – was assessed for 240 min at day 0 and once every day at days 1 to 3 (Fig. 1A).

### ***Facial formalin model***

The formalin solution was prepared at 1.5% from a commercially available stock solution (37% of formaldehyde); that is, at a final concentration of formaldehyde: 0.55%. Such concentration allows for the detection of hypo- as well as hyperalgesic effects and minimizes animal suffering (Clavelou *et al.*, 1995). The animals being habituated to the experimenter and to the contact of the needle of the syringe on the lower lip, they received a formalin (50  $\mu$ l of 1.5% solution) injection into the right lower lip using a 30 gauge-needle coupled to a 100  $\mu$ l Hamilton syringe. They were then immediately placed into the test box for a 45-min observation period. The recording time was divided into 15 3-min blocks, and a nociceptive score was determined for each block by measuring the time (in seconds) that the animals spent rubbing the injected area with the ipsilateral fore, but not the hind, paw. Of note, movements of the ipsilateral forepaw were accompanied by movements of the contralateral one. A video camera was used to record the rubbing response. Analysis of behavior was performed by an investigator who was blinded to animal's treatment. The mechanical sensitivity of rats at the level of the right vibrissa pad was subsequently assessed for another 300 min at day 0 and once every day at days 1 to 3 (Fig. 1A) or for 330 min at day 3 (Fig. 1B).

### ***Facial neuropathic pain model***

The unilateral ligation of the right infraorbital nerve (IoN) was performed as described previously (Vos, *et al.* 1994). Rats were anaesthetized with chloral hydrate (7%, 300 mg/kg, i.p.) and their body placed on a surgical table. Surgery was performed intraorally under direct visual control (modified from Lynds *et al.*, 2017). Briefly, a cut (~5-mm long) was made along the right gingivobuccal margin, starting ~3 mm distal to the incisal tooth. To give access to the IoN, the orbital content was gently repelled using a

cotton-tipped wooden rod. The IoN was dissected free and two chromic catgut ligatures (5–0) were loosely tied around the IoN (3 mm apart). The ligature slightly – i.e. just noticeable – decreased the diameter of the nerve and reduced, but did not interrupt, the circulation through superficial vessels of the nerve. The scalp incision was closed using polyester sutures (4–0). In sham operated rats, the IoN was exposed using the same procedure, but not ligated. Rats were randomly assigned to one of two experimental groups. It is important to note that, with such procedure, neither the hairs on snout nor the vibrissae are cut (Fig. 1C).

### ***Hind paw CFA model***

Animals were briefly anesthetized (<3 min) using a mask with 2% isoflurane and received a subcutaneous injection of CFA solution (25 µl of 5 mg/kg; see above) solution into the right hind paw using a 27 gauge-needle coupled to a 100 µl Hamilton syringe. Following recovery from anesthesia, animals were placed into the behavioral experimental room, where their mechanical sensitivity within the area of secondary hyperalgesia in the hind paw was assessed (Ducourneau *et al.*, 2014).

### ***Intracisternal or intrathecal injection of roscovitine***

To test whether Cdk5 is involved in spinal trigeminal nucleus caudalis or medullary dorsal horn (MDH) or spinal dorsal horn (SDH) central sensitization, we used the Cdk5 inhibitor, roscovitine. Animals were briefly anesthetized (<3 min) using a mask with 2% isoflurane and roscovitine (100 µg in 10 µl of 50% DMSO) or vehicle alone (DMSO 50% v/v) was injected into the *cisterna magna* (intracisternal; Miraucourt *et al.*, 2009) or intrathecally (between L4–L5) using a 10-µl Hamilton syringe (Dominique Dutscher, France). Rats were then placed in the observation field for a 30-min recovery period.

To investigate the preventive effect of roscovitine on CFA-induced facial mechanical hypersensitivity or formalin-induced facial spontaneous pain behavior and mechanical hypersensitivity, rats received an intracisternal injection of roscovitine or vehicle 30 min before the CFA or formalin injection into the right lower lip (Fig. 1A). To assess the preventive effect of roscovitine on CFA-induced mechanical hypersensitivity of the hind paw, rats received an intrathecal injection of

roscovitine or vehicle 30 min before the CFA injection into the plantar aspect of the hindpaw. To test the curative effect of roscovitine on CFA- or formalin-induced facial mechanical hypersensitivity, roscovitine or vehicle was intracisternally injected 3 days after the CFA or formalin injection (Fig. 1B). We also investigated the curative effect of roscovitine on neuropathic facial mechanical hypersensitivity. Fourteen days after surgery, rats were placed into the observation chamber for a 30-min habituation period to evaluate the new static and dynamic mechanical allodynia scores and thus confirm the neuropathic mechanical hypersensitivity. Roscovitine or vehicle was then intracisternally injected and static and dynamic mechanical sensitivities were evaluated, after an initial 30-min recovery period, every hour (x 8/day) until static and dynamic allodynia scores had returned to pre-roscovitine levels (Fig. 1C).

### ***Mechanical sensitivity***

*Habituation.* Behavioral testing was performed as previously described (Miraucourt *et al.*, 2009; Boyer *et al.*, 2014). To assess static and dynamic mechanical sensitivity, rats were first habituated to the 0.6 x 0.6 m<sup>2</sup> glass chamber used for behavioral testing as well as to innocuous mechanical stimulation for 3 days before the actual testing session. Behavioral testing took place in a quiet, temperature-controlled (21–23°C) room. The habituation required 1/2 h, each day, during which animals were tested with von Frey (vF) filaments or gentle air puffing using a calibrated pump onto a region either (i) between the right vibrissa pad and the upper right lip, with carefully avoiding touching any of the vibrissa or (ii) the plantar aspect of the right hind paw. Ascending and descending series of vF filaments (2-6 g on the vibrissa pad, 1-26 g on the hind paw (Bioseb, France) were used. Each filament was tested five times at intervals of at least 5 s. At the end of the 3<sup>rd</sup> day, all rats responded to 6 g (right vibrissa pad) and 8-10 g (hind paw) vF filament with only a simple detection, showing a non-aversive response for the mechanical stimulus.

*Facial mechanical sensitivity.* For the actual behavioral testing session, rats were first placed into the observation glass chamber under red light for a 30-min habituation period, during which the

experimenter reached into the chamber applying 6-g vF filament or gentle air puffing on the face of the animal to establish baseline static and dynamic mechanical sensitivities. After the sub-cutaneous injection of CFA or formalin at day 0 (Fig. 1A) or the intracisternal injection of roscovitine/vehicle at days 3 (Fig. 1B) or 14 (Fig. 1C), animals were placed back into the observation chamber to assess mechanical sensitivity. Static (6-g vF filament) and dynamic (1-s long gentle air puffing) mechanical stimuli were applied to the right vibrissa pad – in the region of secondary hyperalgesia – every 30 min. Each series of stimuli (static and dynamic) consisted of five stimuli, applied at an interval of at least 10 s. We selected the 6-g vF filament because it was, on one side, innocuous (Oshinsky & Gomonchareonsiri, 2007; Miraucourt *et al.*, 2009) but, on the other hand, close to the aversive threshold (Miraucourt *et al.*, 2009). Stimulation was carried out when the rat was in a sniffing/no locomotion state: with four paws placed on the ground, neither moving nor freezing. The tip of the pump or vF filament was moved toward the target from behind the animal so that it could not see it. Behavioral responses to mechanical stimulations were observed and quantified by a second experimenter according to Vos *et al* (1994). Rat responses to mechanical stimuli consisted of one or more of the following elements: (1) detection, the rat turns head toward stimulus; (2) withdrawal reaction, the rat turns head away or pulls it briskly backward when stimulation is applied (a withdrawal reaction is assumed to include a detection element preceding the head withdrawal and therefore consists of two responses elements); (3) escape/ attack, the rat avoids further contact with the stimulus, either passively by moving its body away from the stimulus or actively by attacking the tip of the pump or the filament; and (4) asymmetric rubbing/grooming, the rat displays an uninterrupted series of at least three wash strokes directed to the stimulated area. The following rank-ordered descriptive responses categories were formulated: no response, non-aversive response, mild aversive response, strong aversive response, and prolonged aversive behavior. Each category was given a score based on the number of observed response elements: 0 in case of no response to 4 when prolonged aversive behavior. A mean score value was then calculated for each stimulation series. According to Vos *et al* (1994), such score is assumed to reflect the magnitude of the aversiveness evoked by mechanical stimuli.

*Hindpaw mechanical sensitivity.* Rats were first placed into the observation chamber under red light for a 30-min habituation period to evaluate baseline hindpaw mechanical withdrawal thresholds. They were assessed using vF filaments, applied at the plantar aspect of the hindpaw (maximum filament strength: 26 g), via the descending-ascending method. Each filament was applied to the skin 5 times for 3 s (at 10 s intervals). The vF filament threshold (in grams) was that evoking a hind paw withdrawal response in three out of five trials. Stimulations were carried out when the rat was in a sniffing/no locomotion state: with four paws placed on the ground, neither moving nor freezing.

### ***Locomotor function***

Rats were tested 30 min after intracisternal injection of roscovitine (see above) or vehicle with the accelerating rotarod (LE 8500; Ugo Basile), in which rats are required to walk against the motion of a rotating drum, with the speed increasing from 4 to 40 rpm over 5 min (Luccarini *et al.*, 2004). The time taken to fall off the rotarod is recorded as the latency (in seconds). Twenty-four hours before drug testing, rats were trained to stay on the accelerating rotarod for 60 s. The next day, rotarod latencies were measured after intracisternal injections of roscovitine or vehicle.

### **Immunohistochemistry**

*Cdk5 and p35 expression in the trigeminal ganglion (TG) and MDH neurons in control conditions.* Rats were deeply anesthetized with intraperitoneal urethane (1.5 g/kg). Twenty minutes after the injection, the depth of the anesthesia was assessed and rats were perfused transcardially with warm heparinized saline followed by cold 0.1 M phosphate-buffered solution pH 7.6 containing 4% paraformaldehyde and 0.03% picric acid. TG and brainstem were removed and post-fixed for 2h in the same fixative solution at 4°C and then cryoprotected in 30% sucrose diluted in 0.05M Tris-buffered saline (TBS) pH 7.4 at 4°C for 24h. Thirty micrometer coronal sections were cut on a freezing microtome (brainstem) and a freezing cryostat (TG) and collected in TBS before being processed (brainstem sections) or mounted directly on gelatinized coverslips (TG sections). Coverslips and free-floating sections were blocked in 5% normal donkey normal serum (DNS) diluted in TBS containing 0.25% bovine serum

albumin (BSA) and 1% Triton X-100 (TBST) for 1 h. After, samples were incubated in rabbit p35/25 antibody (1:200; [C64B10] Cell Signaling Technology, USA), mouse Cdk5 antibody (1:100; [DC17] Santa Cruz Biotechnology, USA), goat CGRP antibody (1:1000; [ab36001] Abcam), Alexa Fluor 488 isolectin GS-IB4 conjugate (1:500; life technologies, Carlsbad, Ca, USA), chicken neurofilament 220 antibody (1:1000; [Ab5539] Merck-Millipore, USA), rabbit tyrosine hydroxylase rabbit antibody (1:1000; [AB152] Millipore, USA), guinea pig TLX3 antibody (1:2000, a gift from Dr. Carmen Birchmeier, Max Delbruck Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany), and goat Pax2 antibody (1:200; [AF3364] R&D Systems, USA) diluted in TBS–0.3% Triton X-100 overnight at room temperature. Next, slices were washed three times with TBST–0.3% Triton X-100 and incubated in the corresponding secondary antibody (all from Jackson ImmunoResearch Laboratories) for 2 h at room temperature: Cy5 AffiniPure donkey anti-guinea pig (1:200, 706-175-148), anti-rabbit (1:200, 711-175-152) anti-goat (1:200, 705-175-147) and anti-mouse IgG (HL) (1:200, 715-175-151); Alexa Fluor 488 AffiniPure donkey anti-rabbit (1:200, 711-545-152), anti-goat (1:200, 705-545-003) and anti-chicken IgG (HL) (1:200, 703-545-155). All slices were mounted on gelatinized slides in a DPX mounting medium, coverslipped, and conserved at 4°C. Specificity controls consisted of omitting the primary antibody and incubating sections in inappropriate secondary antibodies. In all these controls, no specific staining was evident.

*Cdk5 and p35 expressions in the neurons, microglia and astrocytes of the MDH after inflammatory injury.* Under deep anesthesia (urethane; see above), rats received an injection of capsaicin (25 µg in 25 µl endolipid) or vehicle alone or of formalin (see above) or vehicle alone into the right vibrissa pad using a 30-gauge needle. Twenty seven minutes (capsaicin; Fig. 1D), 57 min (formalin, acute inflammation conditions; Fig. 1D) or 3 days later (formalin, chronic inflammation conditions; Fig. 1E), rats were stimulated on the right upper lip, 0.5-1 cm to the injection site – that is, well outside this site, in the anticipated region of secondary hyperalgesia – during 3 min using a 6 g vF filament (0.5 Hz). At the end of this 3-min stimulation, rats were then perfused transcardially and 30 µm coronal sections of the brainstem were prepared as described above. Samples were incubated in the following primary

antibodies: rabbit p35/25 antibody (1:200; [C64B10] Cell Signaling Technology, USA), mouse Cdk5 antibody (1:100; [DC17] Santa Cruz Biotechnology, USA), guinea pig NeuN antibody (1:1000; [ABN90] Merk-Millipore, USA), goat Iba1 antibody (1:1000; [PA5-18039] Invitrogen, USA) and goat Sox9 antibody (1:2000; [AF3075] R&D systems) diluted in TBS–0.3% Triton X-100 overnight at room temperature. Next, slices were washed three times with TBST–0.3% Triton X-100 and incubated in the corresponding secondary antibody (all from Jackson ImmunoResearch Laboratories) for 2 h at room temperature: Cy5 AffiniPure donkey anti-guinea pig (1:200, 706-175-148) donkey anti-goat (1:200, 705-175-147) anti-mouse IgG (HL) (1:200, 715-175-151); Alexa Fluor 488 AffiniPure donkey anti-rabbit IgG (HL) (1:200, 711-545-152). All slices were mounted on gelatinized slides in a DPX mounting medium, coverslipped, and conserved at 4°C. Specificity controls consisted of omitting the primary antibody and incubating sections in inappropriate secondary antibodies. In all these controls, no specific staining was evident.

*Confocal imaging and cell counting.* For quantifications of Cdk5/p35 and NeuN or Iba1 or Sox9-immunoreactive (IR) cell numbers in the MDH were first scanned at 350 µm parasagittal slices sequentially z-scanned with a Zeiss LSM 800 AiryScan confocal microscope using a 40x objective and additional magnification of 2.0x. Images were sampled at a resolution of 2048 x 2048 pixels and a z-step size of 0.21 µm. Image analyses and quantifications were performed using Fiji ImageJ version 1.51 software (<http://rsbweb.nih.gov/ij>). Sections were analyzed at -1,200 µm from the obex aperture, i.e., at about the middle of the rostrocaudal extent of MDH (Strassman & Vos, 1993; Miraucourt *et al.*, 2011), for each rat (n = 3). For cell counting, a 300 x 400 µm window was positioned so that its median axis was perpendicular to the MDH border and its dorsolateral end at the border between the white and gray matter (Lorenzo *et al.*, 2008). In addition, the center of this window was on the diagonal of a rectangle enclosing the whole MDH as previously described (Peirs *et al.*, 2014). Cdk5/p35 and NeuN/Iba1/Sox9 immunoreactivity profiles were counted separately using the cell counter plug-in of Fiji- ImageJ. Laminae were delimited on merged Cdk5/p35 and NeuN/Iba1/Sox9 images: (i) laminae I-II<sub>o</sub> border, so that lamina I contained the apparently unicellular layer of characteristic large neurons, (ii) laminae II<sub>o</sub>-



II<sub>i</sub> border, based on the lack of a Cdk5/p35-immunoreactive band in control conditions, and (iii) laminae II<sub>i</sub>-III<sub>o</sub> border, so that laminae II<sub>o</sub> and II<sub>i</sub> had an equivalent size. As we used no neurochemical markers to delineate the laminae III-IV border (Polgar *et al.*, 2006), they were not separated. A cell was counted as immuno-positive if 1) immunostaining was clearly delineated as a single cell; 2) immunostaining level was at least two times the background; and 3) it had disappeared at both the top and bottom surfaces of a z-stack. To ensure that a cell was not counted several times, the immediately looked-up z-section was used as a reference and compared with the subsequent one. 3D reconstruction using the 3D-viewer plug-in was also used to compare our counting and the representative neuronal structure, reconstructed from the z-series (Williams & Rakic, 1988). If there was any doubt, cells were reanalyzed at a higher magnification (x63, oil immersion lens).

### **Western blot analysis**

*Facial CFA and formalin models.* Under deep anesthesia (urethane; see above), rats received an injection of CFA, formalin or vehicle alone into the right vibrissa pad. Fifty seven minutes (acute inflammation conditions; Fig. 1F) or 3 days (including 27 min anesthesia; chronic inflammation conditions; Fig. 1G) later, rats were stimulated for 3 min (as described above). Immediately after, rats were decapitated for rapid tissue harvesting.

*IoN model.* An unilateral ligation of the right IoN was performed (see above). Fourteen days later, rats were deeply anesthetized (urethane; see above) and stimulated for 3 min with a 6 g vF filament (0.5 Hz) at the level of the right upper lip. Immediately after, rats were decapitated for rapid tissue harvesting (Fig. 1H).

TGs were completely dissected out. Tissues containing the MDH, from 0 to -2,400 μm from obex aperture, were removed. The latter limit corresponds to the end of the brainstem enlargement compared with the cervical spinal cord (Peirs *et al.*, 2014). The ventral part of the brainstem was not removed as MDH represents most of the tissue at this level. Ipsilateral and contralateral sides were separated by cutting the middle of the brainstem. Tissue was then rapidly frozen on nitrogen and stored at -80°C for

later use. Proteins were extracted and homogenized in 400  $\mu$ l radio-immunoprecipitation assay buffer (Sigma-Aldrich, France) containing 0.5% of protease inhibitors (Sigma-Aldrich, France) and 0.5% of phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich, France). The homogenate was centrifuged at 4°C for 30 min at 22.000 g to remove debris. The protein concentration of the supernatant was measured using the Micro Lowry total protein kit (Sigma-Aldrich, France) and a spectrophotometer (Bio-Rad, France) at a wavelength of 750 nm. The supernatant (90  $\mu$ g) was heated for 5 min at 95°C and loaded onto 4–15% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ (Protein Gels, 10 well, 50  $\mu$ l #4568084) sodium dodecyl sulfate (SDS)–polyacrylamide gels for protein separation. Electrophoresis was carried out in 25 mM Tris, 192 mM glycine, and 1% SDS buffer for 2.5 h at 90 V, until the reference colorant reached the end of the gel. Proteins were then electrophoretically transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, France) in a buffer containing 25 mM Tris, 192 mM glycine, 10% SDS, and 20% methanol for 1 h at 100 V. Transferred samples were confirmed by Ponceau Red membrane staining following blotting. The membranes were blocked with 5% nonfat dry milk and subsequently incubated overnight at 4°C in primary antibodies: rabbit p35/25 antibody (1:250; [C64B10] Cell Signaling Technology, USA), mouse Cdk5 mouse antibody (1:500; [DC17] Santa Cruz Biotechnology, USA) or rabbit phospho p44/42 MAPK (Erk1/2) antibody (1:1000; [9101L] Cell Signaling) diluted in 0.05M TBS, 1% nonfat dry milk, and 0.1% Tween® 20 (Sigma-Aldrich, France) with moderate shaking. The membranes were then incubated 1 h at room t°C with a donkey anti-rabbit or anti-mouse secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:10,000; GE Healthcare, France) diluted in 0.05 M TBS, 1% nonfat dry milk, and 0.1% Tween® 20. ECL Plus solution (GE Healthcare) was used to visualize blots. Blots were captured using an automated image acquisition system (Fusion FX7; Vilber Lourmat, France) for 15 min. They were then incubated in a stripping buffer (62.5 mM Tris, 100mM  $\beta$ -mercaptoethanol, and 2% SDS, pH 6.7) for 30 min at 50°C and probed again 1 h at room t°C with a polyclonal rabbit primary antibody directed against mouse alpha tubulin (1:15000; [T6199] Sigma) diluted in 0.05M TBS, 1% nonfat dry milk, and 0.1% Tween® 20(Sigma-Aldrich, France) as loading control.

## **MDH extracellular recordings**

*Animal preparation.* As previously described (Lapirot *et al.*, 2011; Boyer *et al.*, 2014), animals were anesthetized with 2% isoflurane in a NO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> mixture (2:1). The trachea was cannulated and the carotid artery and external jugular vein catheterized. Animals were then paralyzed by an intravenous perfusion of vecuronium bromide (0.6 mg/h) and artificially ventilated with a volume-controlled pump (54–55 strokes/min). Levels of isoflurane, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, and end-tidal CO<sub>2</sub> (3.5–4.5%) were measured by an anesthetic gas analyzer (Vamos, Dräger, Lübeck, Germany) during the entire experimental period. These parameters were digitally displayed and under the control of alarms. The arterial catheter was attached to a calibrated pressure transducer (UFI, Morro Bay, CA, USA) connected to an amplifier (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) for continuous monitoring of the mean arterial blood pressure (90–110 mm Hg). The analog output from the blood pressure amplifier was connected to a computer data sampling system (Cambridge Electronics Design 1401 computer interface; Cambridge, UK). Heart rate was continuously monitored and cutaneous vascularization periodically checked by observing the color of the paw extremities and the rapidity by which they regained normal color after pressure application. Colorectal temperature was kept constant at  $38 \pm 0.5$  °C by means of a feedback-controlled heating blanket. Surgical level of anesthesia was verified by a stable mean arterial blood pressure and a constant heart rate during noxious stimulation.

The animals were placed in a stereotaxic frame with the head fixed in a ventroflexed position (incisor bar dropped 5 mm under the standard position) by means of an adapted metallic bar. To expose the MDH, the overlying musculature, atlanto-occipital membrane and dura mater were removed. A camera (DinoLite® Digital microscope PREMIER) was used to help reaching a good position for the electrode into MDH. After surgery, the level of isoflurane was reduced to 0.6 – 0.7% and maintained at this level during the recording period.

*Unitary extracellular recordings.* We used glass micropipettes (8–10 MΩ) filled with pontamine 8% - NaCl 5%, sky blue solution to explore the MDH (from 0.5 mm rostral to 2.3 mm caudal to the obex). Single unit activities were amplified and displayed on oscilloscopes and led into a window discriminator

connected to a CED 1401 plus interface and a computer (Spike 2.05 software, version 6.16) to allow sampling and analysis of the spontaneous and evoked neuronal activities. Wide dynamic range (WDR) neurons were recognized on the basis of their responses to mechanical and percutaneous electrical stimulations of their receptive field (Dallel *et al.*, 1999). Specifically, neurons that responded in a graded manner with increasing firing rates to the stimulus range from non-noxious to noxious intensities were classified as WDR cells. Once a neuron had been identified, its receptive field was mapped. Electrical square-wave stimuli (2-ms duration) were applied through a pair of stainless-steel needle electrodes subcutaneously placed into the center of the previously delineated receptive field and thresholds for eliciting A- and C-fiber-evoked responses determined. In post-stimulus time histograms (PSTHs), C- and A-fiber-evoked responses were distinguished according to their latencies: all spikes between 30 and 200 ms after stimulus were considered as C fiber evoked (Hu, 1990; Dallel *et al.*, 1999).

We measured C-fiber-evoked responses to peripheral electrical stimuli. Sequences of 30 electrical shocks were applied repeatedly (0.66 Hz) to the excitatory receptive field at 1.5 times the threshold for C-fiber activation. During repetitive stimulation, C-fiber-evoked responses of WDR neurons usually progressively increased, reached a maximum and then plateaued, i.e. wind-up phenomenon. Fits of the wind-up plots were obtained by a least-squares fitting algorithm. The dynamic properties of the successive responses were best fitted by a second-order polynomial regression ( $R^2 = 0.99$ ), indicating that in all cases there was a strong correlation between the amplitude of the response and the number of repetitive stimuli (Coste *et al.*, 2008). Because the initial slope of the polynomial fit curves (coefficient of the first degree of x) corresponded to the ability of the neuron to amplify its response, it was used to quantify wind-up. We also assessed responses to peripheral mechanical stimuli. Ten-seconds sequences (1Hz) of dynamic (brush) and static (6 – 8 – 26 – 60 g vF filaments) mechanical stimuli were applied to the excitatory receptive field at 15-min intervals.

We also assessed the diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). Sequences of 105 electrical stimuli (0.66 Hz) were applied to the receptive field at 1.5 times the threshold for C fibers at 30-min intervals. A 30-min interval was selected because it gives a sufficient delay to allow full recovery to

baseline response between sequences. DNIC were triggered by alternatively immersing the right or left hind paw—only one hind paw was immersed during each sequence—into a 48°C water bath between the 36<sup>th</sup> and 60<sup>th</sup> stimuli (duration: 37.5 s). In each sequence, the PSTHs built from the first to 30<sup>th</sup> responses were used for studying the unconditioned response, those built from the responses to 36<sup>th</sup> to 105<sup>th</sup> stimuli for studying DNIC. To assess the inhibitory effect of noxious heat stimulation, only the 46<sup>th</sup> to 60<sup>th</sup> responses were considered, responses to earlier 36<sup>th</sup> to 45<sup>th</sup> stimuli during immersion being discarded owing to the latency (5–10 s) of the maximal inhibitory effects. Post-effects were measured on the 61<sup>th</sup> to 75<sup>th</sup> and 76<sup>th</sup> to 90<sup>th</sup> responses, 0–22 s and 22–44 s after the end of noxious heat stimulation, respectively. In each sequence, PSTHs, built from 46<sup>th</sup> to 60<sup>th</sup> (effect), 61<sup>st</sup> to 75<sup>th</sup> (first post-effect) and 76<sup>th</sup> to 90<sup>th</sup> (second post-effect) responses, were normalized to that built from the 21<sup>st</sup> to 35<sup>th</sup> responses (before noxious heat stimulation; baseline). The inhibitory effect of DNIC was computed as the percent decrease in the number of C-fiber-evoked action potentials.

The effect of locally applied roscovitine on the responses to peripheral electrical and mechanical stimuli and on DNIC of MDH WDR neurons were assessed in two different experimental conditions: acute and chronic inflammation conditions. To test whether roscovitine can prevent MDH sensitization (acute inflammation condition), sequences of 30 electrical shocks or mechanical stimuli (see above) were repeated at 15-min intervals. When 2 successive control sequences had been recorded with a variation of less than 10% in C-fiber-evoked responses (baseline), roscovitine (100 µg in 10 µl [DMSO 50% v/v]) or vehicle (saline 0.9% in 10 µl) was applied into the cisterna magna. Such a volume is consistent with an easy diffusion of the drugs into the MDH. Indeed, autoradiographic data (Dickenson & Le Bars, 1987; Burkey *et al.*, 1996) have demonstrated that 0.2 µL of morphine can diffuse in a 1.5 mm diameter sphere of brain tissue. Another 2 sequences (at 30-min intervals) were then recorded to evaluate the effect of roscovitine application alone. Sixty min later, CFA (125 µg in 25 µl) was then injected into the right vibrissa pad, 1–1.5 cm to the stimulating electrodes. Responses to electrical and mechanical peripheral stimulations (at 15-min intervals) were recorded for up to 120 min after CFA

injection (Fig. 1I). Responses — either wind-up slope or number of spikes — were normalized to the averaged 2 responses recorded before drugs application (baseline, see above). Under chronic inflammation conditions, unitary extracellular recordings and roscovitine/vehicle applications were performed 3 days after CFA injection into the right vibrissa pad (Fig. 1J). Only one cell was recorded in each animal, and only cells showing no change in spike amplitude or waveform during the complete experimental procedure were considered.

*Histology.* Recording sites were visualized by injecting at the end of the experiment pontamine sky blue contained in the recording electrode (by passing anodal current – 20 mA for 20 s – through the tip of the recording electrode). Rats were killed by an overdose of urethane (1.5 g/kg intraperitoneal), brains removed and put into fixative (formaldehyde: 25%). Ninety mm-thick transverse sections were cut from brainstems using a freezing microtome. The recording site was visualized with a microscope by the pontamine sky blue solution.

### **Statistical analysis**

All data are presented as the mean  $\pm$  S.D or SEM. Numbers (n) of animals or neurons included in each analysis are displayed in the corresponding figures or tables. All graphs and statistical analysis were performed on GraphPad Prism version 7.04 software. Parametric statistical tests were used to compare different experimental groups (after confirmation the normality distribution of data). Paired Student's t test was used to compare two groups. The t-values were expressed with their associated degrees of freedom (tdf). When three groups and only one factor were compared, we used one-way non-repeated-measures ANOVA followed by Tukey's HSD *post-hoc* test. Two-way repeated or non-repeated measures ANOVA followed by Tukey's HSD (when compared with respective control group) or Dunnett's/Sidak's multiple-comparisons (when compared with baseline measures in the same group or between all groups) *post-hoc* tests were used to compare three or more groups with two factors. F-values were expressed with their associated degrees of freedom (df): F (df of group, residual) for one-

way ANOVA.  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$  were considered to be statistically significant. Figures were produced using CorelDraw Graphics version 12.0 software.

## RESULTS

### **1. Local Cdk5 inhibition prevents spontaneous pain behavior and mechanical hypersensitivity in both male and female rats after inflammatory injury**

We first evaluated the functional consequences of the Cdk5/p35 complex on trigeminal pain behavior after facial inflammatory injury. Formalin injection into the right lower lip produces two pain symptoms: (i) spontaneous pain behavior, manifested as a 2-phase nociceptive rubbing response – an early, short-lasting phase I and a late long-lasting phase II – that has completely recovered after about 1 h (Pelissier *et al.*, 2002; Raboisson & Dallel, 2004) and (ii) chronic mechanical hypersensitivity, manifested as both dynamic and static mechanical allodynia. To examine the role of Cdk5 in inflammatory trigeminal pain, we locally delivered the Cdk5 inhibitor, roscovitine (100µg), into the *cisterna magna* (i.c.), 30 min before formalin injection. I.c. roscovitine strongly reduced both phase I and phase II of formalin-induced spontaneous pain in male and female rats (Figure 2). We also assessed facial mechanical sensitivity for 3 more days after formalin injection. I.c. roscovitine completely suppressed the two mechanical allodynia, static and dynamic, again, in male and female rats (Figure 3 A, B). This indicates that Cdk5 inhibition can prevent formalin-induced spontaneous pain behavior and mechanical pain hypersensitivity. But can Cdk5 inhibition reverse formalin-induced mechanical pain hypersensitivity once it is established? To address this issue, we i.c. injected roscovitine (100 µg) 3 days after formalin injection. It failed to reverse mechanical allodynia in male as well as female rats (Figure 3 C). Thus, locally applied roscovitine can prevent, but not reverse, mechanical pain hypersensitivity after inflammatory injury.

To strengthen this conclusion, we tested the effect of i.c. applied roscovitine in another rat model of chronic facial inflammatory pain, the CFA model (Alba-Delgado *et al.*, 2018). CFA injection into the right lower lip produces a chronic static, but not dynamic, mechanical allodynia in both male and female rats. Roscovitine, when preemptively i.c. injected 30 min before CFA injection, prevented CFA-induced static mechanical allodynia in both male and female rats (Figure 4 A, B). On the other hand,



roscovitine, when i.c. injected 3 days after CFA injection, failed to reverse static mechanical allodynia in both male and female rats (Figure 3 C). Altogether, these results indicate that Cdk5 activation within the MDH is necessary for the induction, but not the maintenance, of facial mechanical pain hypersensitivity in male and female rats after inflammatory injury.

Our results indicate that inhibition of MDH Cdk5 can prevent facial inflammatory pain in male as well as female rats. But, the involvement of another enzyme, p38 MAP kinase, was recently shown to be sex specific: skepinone, a p38 MAP kinase inhibitor, when preemptively intra-theccally (i.t.) injected, could partially inhibit formalin-induced spontaneous pain behavior and mechanical pain hypersensitivity in male, but not female, mice (Taves *et al.*, 2016). Importantly, these latter results were obtained using a model of hindpaw inflammatory injury, raising the possibility for area specificities. To address this issue, we examined the effect of the intra-theccal (i.t.) injection of roscovitine, 30 min before formaline or CFA injection into the hind-paw, on mechanical thresholds (vF filaments). It completely prevented both formaline- ( $P = 0.0062$ ) and CFA-induced ( $P = 0.0031$ ) hind-paw mechanical pain hypersensitivities (Figure 5). This establishes that Cdk5 activity is necessary for the induction of hind-paw as well as facial mechanical pain hypersensitivities in female rats in the setting of inflammatory pain.

## **2. Local Cdk5 inhibition can reverse mechanical allodynia in both male and female rats after neuropathic injury**

We also tested whether inhibiting MDH Cdk5 can alleviate facial mechanical allodynia in the model of chronic constriction injury to the infraorbital nerve (IoN-CCI). IoN-CCI produces both dynamic and static mechanical allodynia (Alvarez *et al.*, 2009). I.c. injection of roscovitine, 14 days after neuropathic injury could reverse – for more than 3 days – these dynamic and static mechanical allodynias in male as well as female rats (Figure 6). This indicates a role for Cdk5 signaling in the maintenance of mechanical pain hypersensitivity after neuropathic injury.

### **3. Decreased responsiveness of MDH WDR neurons to noxious mechanical stimuli after Cdk5 inhibition.**

If activation of Cdk5 is essential for the transmission of mechanical information within the MDH, then its inhibition should alter the responsiveness of MDH neurons to mechanical stimuli. Extracellular recordings were obtained from a total of 45 MDH wide-dynamic range neurons (WDR;  $n = 45$  rats) (Figure 7) with a cutaneous receptive fields within the maxillary division of the trigeminal nerve (V2) (Figure 7 B). These neurons were recorded within MDH, at depths ranging from -1600 to -400  $\mu\text{m}$  (Figure 7 B).

We first tested the effect of an i.c. application of roscovitine (100  $\mu\text{g}$ ) on the responsiveness of WDR neurons to acute mechanical stimulation – gently stroking the skin with a brush or applying von Frey filaments (vF) – of their receptive field. Neither response to brush stimulation (+ 180 min after i.c. roscovitine:  $-8.7 \pm 13.2\%$  of baseline,  $P = 0.7119$ ) nor that to low vF strength (6 g; + 180 min after i.c. roscovitine:  $-2.7 \pm 8.2\%$  of baseline,  $P = 0.9419$ ) were altered following i.c. roscovitine (Figure 8 A, B). On the other hand, responses to higher vF strengths strongly decreased under Cdk5 inhibition (+ 180 min after i.c. roscovitine, 8, 26 and 60 g vF:  $-30.2 \pm 11.9\%$ ,  $-45 \pm 6.1\%$  and  $-50.7 \pm 7.0\%$  of baseline, respectively;  $P = 0.05$  (8 g vF),  $P < 0.001$  (26 and 60 g vF); Figure 8 A, B). This indicates that tonic Cdk5 signaling regulates baseline MDH WDR neuron responsiveness to specifically high-threshold – including noxious – mechanical stimuli. We therefore assessed the effect of i.c. roscovitine on directly electrically-evoked C-fiber responses, as C-fiber primary afferents include most nociceptors that detect painful mechanical stimuli. I.c. roscovitine, significantly inhibited the firing of WDR evoked by electrical stimulation of C-fiber afferents from their receptive field (+ 180 min after i.c. roscovitine:  $-41.17 \pm 7.791\%$  of baseline,  $P = 0.0019$ ; Figure 8 C, D). These results thus confirm that tonic Cdk5 signaling regulates baseline C fiber inputs to MDH WDR neurons. Of note, roscovitine-induced

depressions of the responses to mechanical stimulation and C fiber activation were rather in the same range (compare Figure 8 B and D).

#### **4. Cdk5 inhibition suppresses MDH WDR neuron sensitization**

We next determined whether the inhibition of Cdk5 can affect MDH central sensitization. We first evaluated the effect of subcutaneous CFA injection into the vibrissa pad on the responsiveness of WDR neurons to acute mechanical stimulation of their cutaneous receptive field. The number of action potentials produced by brush stroke (+ 120 min after CFA injection:  $525.1 \pm 209.5\%$  of baseline;  $n = 8$ ; compared with vehicle injection:  $P = 0.0397$ ; Figure 9 A, B) as well as by graded vF stimulation progressively increased over time (+ 120 min after CFA injection, 6, 8, 26 and 60 g vF:  $138.8 \pm 29.6\%$ ,  $181.9 \pm 57.9\%$ ,  $256.3 \pm 64.5\%$  and  $255.3 \pm 41.5\%$  of baseline, respectively;  $n = 6$  in each group; compared with vehicle injection:  $P = 0.0019$ ,  $P = 0.0169$ ,  $P = 0.005$  and  $P < 0.001$  ; Figure 9 A, B). We also assessed the effect of CFA on electrically-evoked C-fiber responses: it potentiated C-fiber-evoked responses in only half of the recorded WDR neurons (8 out of 16; + 120 min after CFA injection:  $164.1 \pm 21.19\%$  of baseline;  $n = 8$ ; compared with vehicle injection:  $P < 0.001$ ; Figure 9 C, D).

We then tested whether an i.c. application of roscovitine, 60 min before CFA injection, can affect CFA-induced MDH sensitization. The total activities evoked by brush stroke or vF application on the receptive field were significantly decreased compared with controls (i.c. vehicle + CFA-treatment) (Figure 10). However, whereas brush-evoked activity stayed at baseline levels (+ 120 min after CFA injection:  $-2.7 \pm 8.7\%$  of baseline;  $n = 8$ ; compared with vehicle injection:  $P = 0.0173$ ), vF-evoked ones were actually depressed compared with baseline (+ 120 min after CFA injection, 6, 8, 26 and 60 g vF:  $-29.7 \pm 4.3\%$ ,  $-33.2 \pm 6.3\%$ ,  $-51.4 \pm 7.0\%$  and  $-50.5 \pm 7.2\%$  of baseline, respectively;  $n = 8$  in each group; compared with baseline:  $P = 0.0045$ ,  $P < 0.001$ ,  $P = 0.003$  and  $P = 0.003$ ) (Figure 10 A, B). Similarly, i.c. roscovitine, 60 min before CFA injection, also not only prevented CFA-induced sensitization of electrically-evoked C-fiber responses but actually depressed them (+120 min after CFA

injection:  $-31.6 \pm 4.6\%$  of baseline;  $n = 8$ ;  $P < 0.001$ ) (Figure 10 C, D). Of note, these roscovitine-induced depressions of the responses to mechanical stimulation and C fiber activation were rather in the same range as those after roscovitine alone (compare Figure 8 C, D and 10 C, D).

It was previously shown that systemic morphine can selectively depress C-fiber evoked responses in trigeminal neurons (Dallel *et al.*, 1996; Melin *et al.*, 2013). This effect, at least in part, is due to the selective blocking of C-fiber inputs to MDH neurons (Dallel *et al.*, 1998). That inhibition of MDH Cdk5 also leads to the depression of WDR neuron responsiveness to C-fiber raises the possibility that morphine act through Cdk5 inhibition. We directly tested this hypothesis by testing the effect of systemic naloxone on C-fiber-evoked responses of WDR neurons in roscovitine- and CFA-treated rats. It readily potentiated C-fiber-evoked neuronal activity (+ 30 min after systemic naloxone:  $202 \pm 26.4\%$  of baseline before naloxone injection,  $P < 0.0228$ ;  $n = 4$ ). These results are thus not consistent with Cdk5 inhibition mediating morphine-induced depression of the C-fiber-evoked responses of MDH WDR neurons.

Finally, we tested whether i.c. application of roscovitine at post-CFA injection day 3 can reverse MDH sensitization. Roscovitine failed to change mechanically- (+180 min after roscovitine administration, 3 days after CFA injection: brush, 6, 8, 26 and 60 g vF:  $49.67 \pm 22.4\%$ ,  $42.2 \pm 36.9\%$ ,  $31.2 \pm 17.2\%$ ,  $10.5 \pm 12.1\%$  and  $16.2 \pm 5.4\%$  of baseline, respectively;  $n = 6$  in each group; compared with vehicle administration:  $P = 0.1753$ ,  $P = 0.7515$ ,  $P = 0.568$ ,  $P = 0.92$  and  $P = 0.65$ ) (Figure 11 A, B) as well as electrically-evoked responses (+180 mins after roscovitine administration, 3 days after CFA injection:  $12.7 \pm 11.0\%$  of baseline;  $n = 6$  in each group; compared with vehicle administration:  $P = 0.6861$ ) (Figure 11 C, D).

Altogether, these results indicate that Cdk5 signaling is necessary for the induction, but not the maintenance, of the MDH central sensitization which underlies facial mechanical pain hypersensitivity after inflammatory injury.

## **5. The p25, p35 and p-ERK1/2, but not Cdk5, protein expressions are up-regulated in both TG and MDH in the setting of inflammatory pain**

To explore the molecular mechanisms of Cdk5 contribution to inflammatory pain, we examined the protein contents of Cdk5 and its activators (p35 and p25) in bilateral TG and MDH. We also assessed the expression of p-ERK1/2 as ERK phosphorylation, which is involved in generating pain hypersensitivity (Ji *et al.*, 1999; Malik-Hall *et al.*, 2005), is known to elevate Cdk5 activity through increased expressions of the transcription factor early growth response 1 (Egr-1) and, in turn, of p35 (Harada *et al.*, 2001; Utreras *et al.*, 2009; 2012). We used two rat models of facial chronic inflammatory pain, following formalin or CFA injection into the right vibrissa pad. Western blot analysis of TGs revealed that the two Cdk5 activators, p35 and p25, and p-ERK1/2, but not Cdk5, were strongly up-regulated in the ipsilateral TG, soon (1 h) after formalin or CFA inflammatory injury, compared with values in contralateral TG (Formalin:  $F(7, 14) = 19.6$ ,  $P < 0.001$ ; CFA:  $F(7, 14) = 5.446$ ;  $P = 0.0035$ ) and those obtained in the ipsilateral TG of saline-injected animals (Formalin:  $F(23, 46) = 20.85$ ,  $P < 0.001$ ; CFA:  $F(23, 46) = 7.401$ ,  $P < 0.001$ ) (Figure 12). Of note, CFA and formalin were equally efficient in up-regulating p35, p25 and p-ERK1/2. To assess the time-course of inflammation-induced elevations in p35, p25 and p-ERK1/2 protein expressions, ipsilateral TGs were harvested 1 h and 3 days after formalin injection. Whereas p35, p25 and p-ERK1/2 protein levels, at 3 days after formalin injection, were still elevated compared with values in the ipsilateral TG of saline-injected animals ( $F(7, 14) = 651.7$ ,  $P < 0.0001$ ), they nevertheless tended to decrease over time compared with values at 1 h after formalin injection ( $F(7, 14) = 23.08$ ,  $P < 0.0001$ ) (Figure 13A). Finally, we tested the effect of a light mechanical stimulation (6g von Frey filament, at 0.5 Hz for 3 min) of the right upper lip – the putative area of secondary hyperalgesia – on the p35, p25, Cdk5 and p-ERK1/2 protein expressions in ipsilateral TG: mechanical stimulation further increased the p35, p25, and p-ERK1/2 protein expressions compared with those after inflammatory injury alone ( $F(15, 30) = 304.6$ ,  $P < 0.0001$ ) (Figure 13B) while it had no effect in control conditions (see Figure 12).

Western blot analysis of the p35, p25, p-ERK1/2 and Cdk5 protein expression in the MDH provided rather the same results as in TG. The protein expressions of p35, p25 and p-ERK1/2, but not Cdk5, were strongly up-regulated in the ipsilateral MDH, soon after inflammatory injury compared with values in contralateral MDH (Formalin:  $F(7, 14) = 26.41, P < 0.0001$ ; CFA:  $F(7, 14) = 18.84, P < 0.0001$ ) and those obtained in the ipsilateral MDH of saline-injected animals (Formalin:  $F(23, 46) = 19.01, P < 0.0001$ ; CFA:  $F(23, 46) = 20.41, P < 0.0001$ ) (Figure 14). The p35, p25 and p-ERK1/2 protein levels were still elevated at 3 days after formalin injection compared with values in the ipsilateral MDH of saline-injected animals ( $F(7, 14) = 297, P < 0.0001$ ). Nevertheless, the p35 and p25, but surprisingly not p-ERK1/2, protein expressions tended to decrease over time compared with values at 1 h after formalin injection ( $F(7, 14) = 24.49, P < 0.0001$ ) (Figure 15A). Finally, compared with the p35, p25, and p-ERK1/2 protein levels after inflammatory injury alone, mechanical stimulation of the area of secondary hyperalgesia further increased the p35, p25, and p-ERK1/2 protein expressions ( $F(15, 30) = 170, P < 0.0001$ ) (Figure 15B) while it had no effect in control conditions (see Figure 14). Altogether, these results indicate that, in the setting of inflammatory pain, the protein levels of p35, p25 and p-ERK1/2 are strongly increased within both TG and MDH, but they tend to decrease over time. Notably, Cdk5 protein expression is never enhanced.

## **6. The p35, p25, p-ERK1/2 and Cdk5 protein expressions are significantly upregulated in in both TG and MDH in the setting of neuropathic pain**

The TG and MDH of rats were harvested and proceeded for Western blot analysis 14 days after CCI-ION. The p35, p25, p-ERK1/2 and Cdk5 protein expressions were all enhanced in the ipsilateral TG ( $F(7, 21) = 100.3, P < 0.001$ ) (Figure 16A) and MDH ( $F(7, 21) = 12.72, P < 0.001$ ) (Figure 16B) compared with values in the contralateral TG and MDH, respectively. Therefore, in the setting of neuropathic conditions, the very protein content of Cdk5, as those of p35, p25 and p-ERK1/2, were all increased in both the TG and MDH. Nevertheless, the magnitude of the protein level elevations appears to be lower

in neuropathic conditions than in inflammatory ones: indeed, 14 days after CCI-ION, the protein levels were only about two times the controls.

## **7. Immunocytochemical localization of Cdk5/p35 in the TG and MDH**

Immunocytochemical localization was performed to identify the subsets of TG and MDH cells which express p35/Cdk5 in control conditions as well as in the setting of inflammatory pain.

### *Immunocytochemical localization of Cdk5/p35 in the TG of control rats*

In control rats ( $n = 7$ ), p35/Cdk5 labelling was readily apparent in small-diameter neurons in the TG ( $100 \pm 25$  neurons; mean  $\pm$  S.D.) whereas large-diameter neurons were rather spared with p35/Cdk5 expression. Importantly, Cdk5/p35 immunoreactivity was rather equally distributed in peptidergic (CGRP<sup>+</sup>) and non-peptidergic (IB4<sup>+</sup>) C nociceptors as well as C-LTMRs (TH<sup>+</sup>) (Figure 17).

### *Immunocytochemical localization of Cdk5/p35 in the MDH of control rats*

Double-immunofluorescence of Cdk5/p35 with cell-specific markers – NeuN (neurons), Sox9 (astrocytes) and Iba1 (microglial cells) – revealed that only neurons in the MDH express Cdk5/p35 in control conditions. Neither astrocytes nor microglia were then Cdk5/p35 immunoreactive (Figure 18A).

We also examined the effect of time and mechanical stimulation (6g vF filament, at 0.5 Hz for 3 min) on Cdk5/p35 expression in MDH neurons in control conditions: neither time nor stimulation effect could be detected (Figure 18B). But, notably, baseline Cdk5/p35 neuronal expression displays a very specific laminar distribution. On the one hand, Cdk5/p35 immunoreactivity tends to be more expressed in deep laminae (in  $31.8 \pm 6.2\%$  of III-V neurons) than in superficial laminae (in  $12.8 \pm 5.9\%$  of layer I-II neurons) (Figure 18B). On the other hand, using the co-expression of Cdk5/p35 with Tlx3 and with Pax2 to establish the neurotransmitter phenotype of Cdk5/p35 immunoreactive neurons – glutamatergic excitatory or GABAergic inhibitory neurons, respectively – reveals a clearly different laminar distribution of Cdk5/p35 immunoreactive excitatory and inhibitory neurons ( $F(3, 16) = 45.4$ ,  $P$

<0.0001), with Cdk5/p35 immunoreactive neurons in laminae I-II<sub>o</sub> being mostly excitatory and in laminae III-V, mostly inhibitory (Figure 18 C, E). Altogether, there are more Cdk5/p35 immunoreactive GABAergic neurons than Cdk5/p35 immunoreactive glutamatergic ones (64.9%/35.1%) (Figure 18 D). Thus, in control conditions, Cdk5/p35 immunoreactivity within MDH is exclusively expressed in neurons, predominantly in deep laminae and in GABAergic neurons.

#### *Immunocytochemical localization of Cdk5/p35 in the MDH after inflammatory injury*

Since according to our Western blot analysis, p35 expression within MDH increases in the setting of inflammatory pain, we also assessed its cellular localization in two models of facial inflammatory pain in rats, following formalin or capsaicin injection into the right vibrissa pad. Compared with saline injection, Cdk5/p35 neuronal expression strongly enhanced right after both formalin ( $F(6, 12) = 21.26$ ,  $P < 0.001$ ) (Figure 19 A) and capsaicin-induced inflammatory injury ( $F(2, 4) = 275.2$ ,  $P < 0.001$ ) (Figure 20 A, B). Of note, such increase occurred in all laminae after the formalin inflammatory injury (Figure 19 A) but, in the present experimental conditions – animals were sacrificed 30 min after capsaicin injection –, only in superficial ones (I-II) after the capsaicin inflammatory injury (Figure 20 B). Nevertheless, as with the Western blot analysis, mechanical stimulation (6g vF filament, at 0.5 Hz for 3 min) further enhanced Cdk5/p35 neuronal expression. Cdk5/p35 neuronal expression was then elevated in all laminae right (compared with Cdk5/p35 neuronal expression after inflammatory injury alone:  $F(3, 16) = 16.47$ ,  $P < 0.0001$ ; or after saline injection with mechanical stimulation:  $F(3, 16) = 13.14$ ,  $P = 0.0001$ ; Figure 19 A) as well as 3 days after formalin with mechanical stimulation (compared with Cdk5/p35 neuronal expression after inflammatory injury alone:  $F(3, 16) = 20.63$ ,  $P < 0.0001$ ; or after saline injection with mechanical stimulation:  $F(3, 16) = 8.123$ ,  $P = 0.0016$ ; Figure 19 D) or right after capsaicin injection with mechanical stimulation (compared with Cdk5/p35 neuronal expression after inflammatory injury alone:  $F(3, 16) = 4.878$ ,  $P = 0.0135$ ; or after saline injection with mechanical stimulation:  $F(3, 16) = 10.65$ ,  $P = 0.0004$ ; Figure 20 B). Then, the vast majority of MDH neurons in the two models of inflammatory pain did express Cdk5/p35. Moreover, all laminae displayed rather the



same ratio of Cdk5/p35 expressing neurons (about 75%) (Figure 19 A, C and 20 B). Since, under control conditions, fewer neurons express Cdk5/p35 in superficial laminae, especially in lamina II<sub>i</sub>, than in all other laminae (see above), this implies that formalin (Figure 19B) as well as capsaicin inflammatory injury (Figure 20C), lead to a much larger increase in Cdk5/p35 immunoreactivity in the very lamina II<sub>i</sub> than in all other laminae. Thus, most neurons in all MDH laminae quickly express Cdk5/p35 in the setting of inflammatory pain.

We also examined the time-course of Cdk5/p35 neuronal expression within MDH in the formalin model. Compared with Cdk5/p35 neuronal expression 1 hour after formalin injection, Cdk5/p35 neuronal expression was increased 3 days later ( $F(1, 16) = 15.41, P = 0.0012$ ), specifically in superficial laminae (I-II) (Figure 19D)

Altogether, these results indicate that, in the setting of inflammatory pain, neuronal expression of the Cdk5/p35 is quickly increased in all MDH laminae, but predominantly in lamina II<sub>i</sub>. Such enhanced neuronal expression of p35 is associated with low astrocytic and microglial p35 expression (Figure 21).

## DISCUSSION

These results show that intracisternal application of the Cdk5 antagonist, roscovitine, completely prevents peripheral inflammation-induced spontaneous pain behavior as well as mechanical allodynia in male and female rats. It can alleviate neuropathic, but importantly not inflammatory, mechanical hypersensitivity up to 3 days. Local roscovitine strongly reduces the baseline firing of MDH WDR neurons in response to high-strength mechanical stimulation and electrical stimulation of C-fiber. It also prevents, but cannot reverse, their inflammation-induced sensitization. These results indicate that Cdk5 activity regulates inflammatory as well as neuropathic facial mechanical hypersensitivity and its underlying mechanism, MDH central sensitization. This led us to assess the protein expression of Cdk5 and its activators within the MDH in the setting of both inflammatory and neuropathic pain. The p35, p25 and p-ERK1/2, but not Cdk5, protein levels strongly increase in the TG and MDH right after the initiation of peripheral inflammation. But, they then decrease over time. On the other hand, 2 weeks after CCI-ION, Cdk5, as well as p35, p25 and p-ERK1/2, protein expressions are enhanced in both the TG and MDH. Finally, immunohistochemistry reveals that, in control conditions, Cdk5/p35 are readily apparent in all sub-classes of small diameter TG neurons – peptidergic and non-peptidergic C nociceptors and C-LTMRs – as well as in excitatory and inhibitory neurons, but not glial cells, in all MDH laminae. Following peripheral inflammation, p35 expression strongly increases, being detected in about 75% of neurons in all MDH laminae. Moreover, few astrocytes as well as microglia cells then do express p35 in all MDH laminae.

Our evidence that prior intracisternal roscovitine almost completely suppressed the two phases of the facial formalin test indicates that Cdk5 activation is necessary for the manifestation of both phases of spontaneous pain behavior. Similarly, intrathecal roscovitine dose-dependently reduces both phases of the hind paw formalin test (Wang *et al.*, 2014). The first phase of the formalin test is directly linked to the stimulation of C-fiber primary sensory neurons whereas its second phase involves central

sensitization (for review see Sawynok & Liu, 2004). Given the location of the trigeminal ganglion, intracisternal roscovitine can only affect the central terminals of the trigeminal primary afferents. Therefore, our results strongly suggest that Cdk5 is involved in the first phase of the facial formalin test by directly modulating presynaptic release at C-fiber terminals. This is consistent with Cdk5 expression at C fiber central terminals in the MDH (Pareek *et al.*, 2006; present results) as well as SDH (Ino *et al.*, 1994; Terada *et al.*, 1998; Pareek *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007) where it facilitates presynaptic transmitter release (see Discussion below). That intracisternal roscovitine also suppressed the second phase of spontaneous pain behavior in the facial formalin test is consistent with our other evidence that Cdk5 contributes to inflammation-induced central sensitization.

Intracisternal roscovitine prevents the development of mechanical hypersensitivity in the two models of facial inflammatory pain we tested – the formalin and CFA models – in adult male as well as female rats. Prior intrathecal application of roscovitine also dose-dependently attenuates heat hyperalgesia (Yang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014; but see Beaudry *et al.*, 2015), but surprisingly not mechanical allodynia (Yang *et al.*, 2007), after inflammatory injury of the hind paw (CFA model) in male rats. But notably, intracisternal roscovitine fails to alleviate mechanical hypersensitivity, 3 days after facial inflammatory injury. This is thus different from the setting of neuropathic pain where intrathecal (Yang *et al.*, 2014; Zhong *et al.*, 2019; Gomez *et al.*, 2020) or intracisternal roscovitine (present results) can transiently rescue the heat and mechanical pain hypersensitivities, 2 weeks after nerve injury. Our results thus reveal that, while Cdk5 activation within SDH/MDH appears to be necessary for the expression of heat hyperalgesia/mechanical allodynia, its very role depends on the injury type: Cdk5 activation is only needed for the induction of pain hypersensitivity after inflammatory injury, but it is also required for its maintenance after neuropathic injury. Of note, that daily applied roscovitine from the 1<sup>st</sup> to the 7<sup>th</sup> day after nerve injury (sciatic nerve CCI) attenuates mechanical allodynia (Li *et al.*, 2014) might indicate that Cdk5 activation is also involved in the induction of neuropathic mechanical pain hypersensitivity. This raises the question as

to whether SDH/MDH Cdk5 activation alone be sufficient for thermal and mechanical hypersensitivity. Accordingly, endogenous activation of CDK5, through the overexpression of either p35 in transgenic (Tgp35) mice (Pareek *et al.*, 2006; Prochazkova *et al.*, 2013) or the spinal piwi-Interacting RNA, DQ541777, and, in turn, reduced expression of the endogenous CDK5 inhibitor, cdk5rap1 (Zhang *et al.*, 2019), produces both heat and mechanical pain hypersensitivities in naive mice.

*In vivo* electrophysiology adds functional information on the role of Cdk5 in MDH baseline and sensitized neuronal activity. Cdk5 inhibition produces two series of effects on the electrophysiological responses of MDH WDR neurons to peripheral stimuli. First, roscovitine, applied alone or prior to CFA injection – i.e. when CFA-induced central sensitization was prevented –, inhibits baseline responses to predominantly high-threshold static mechanical stimuli and specifically C-fiber stimulation. That a single sub-class of inputs – here, the C-fiber input – be selectively inhibited strongly suggests a direct effect on these primary afferents, consistent with Cdk5 selective expression in small diameter C primary afferent TG (Pareek *et al.*, 2006; present results) and DRG neurons (Ito *et al.*, 1994; Terada *et al.*, 1998; Pareek *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007). Our electrophysiological results thus provide strong support for the conclusion that Cdk5 activation is required to sustain full activation of MDH WDR neurons by C fiber primary afferents. In agreement with such conclusion, p35 knock-out mice, which exhibit decreased Cdk5 activity, display hind-paw heat (Pareek *et al.*, 2006) as well as orofacial mechanical hypoalgesia (Prochazkova *et al.*, 2013). Likewise, primary nociceptor-specific Cdk5 conditional-knockout mice show significant thermal hypoalgesia (Pareek *et al.*, 2007). Several Cdk5 targets can account for a Cdk5-dependent modulation of presynaptic transmitter release at C fiber primary afferent-2<sup>nd</sup> order neuron synapses. Thus, Cdk5-mediated phosphorylation (i) of Ca<sub>v</sub>3.2 channels, favors their membrane localization and thus increases C-fiber excitability (Gomez *et al.*, 2020), (ii) of TRPV1, potentiates agonist-induced Ca<sup>2+</sup> influx into cultured dorsal root ganglia (DRG) neurons (Pareek *et al.*, 2007; Jendryke *et al.*, 2016), TG neurons (Utreras *et al.*, 2012; Rozas *et al.*, 2016) and odontoblast-like cells (Utreras *et al.*, 2013), (iii) of kinesin 13B, increases TRPV1 membrane trafficking (Xing *et al.*,

2012; Liu *et al.*, 2015) and (iv) of P2X2/3R, delays their desensitization and thus potentiates P2X2/3R-mediated increases in intracellular Ca<sup>2+</sup> (Coddou *et al.*, 2017).

Cdk5 inhibition also prevents CFA-induced sensitization of MDH WDR neuronal responses to peripheral stimuli. All responses – to low- as well as high-threshold mechanical stimuli and to A- as well as C-fiber electrical stimulation – were potentiated after facial CFA injection and all these changes were prevented by prior intracisternal roscovitine. Accordingly, genetic impairment of Cdk5 suppresses the enhancement of Fos expression in SDH after neuropathic injury (Zhang *et al.*, 2019). Notably, however, roscovitine cannot reduce responses once they are potentiated. This suggests that Cdk5 activation is required for the induction, but not the maintenance, of inflammation-induced MDH/SDH central sensitization, in agreement with its role in inflammatory pain (present results). Multiple cellular mechanisms are known to operate alone or in combination within the SDH/MDH to produce neuronal sensitization, including enhanced neuronal excitability, potentiated synaptic excitation and/or reduced synaptic inhibition (Latremoliere & Woolf, 2009). With respect to neuronal excitability, there is evidence for rather a decrease in intrinsic excitability of excitatory neurons via Cdk5 in the rat prelimbic cortex (Wang *et al.*, 2015). Cdk5 appears to regulate essential proteins in synaptic transmission. It thus promotes the increase in synaptophysin in SDH neurons after inflammatory injury (Zhang *et al.*, 2012). In the SDH, Cdk5 associates with and phosphorylates the GluN2A (Li *et al.*, 2001) and GluN2B subunits (Zhang *et al.*, 2008) of NMDA receptors. It also mediates the bone cancer-induced increase in NR2B mRNA expression in the spinal cord (Zhang *et al.*, 2012). It might thus facilitate the long-term potentiation (LTP) of synaptic transmission within the SDH/MDH as GluN2A and GluN2B are both important modulators of LTP induction. It is interesting to note that Cdk 5 has very different functions on excitatory synaptic transmission according to area. In hippocampal CA1, it facilitates the proteolysis of NR2B via calpain and, in turn, conversely inhibits use-dependent potentiation of excitatory synaptic transmission (Hawasli *et al.*, 2007; 2009; Plattner *et al.*, 2014; Posada-Duque *et al.*, 2017). Finally, inhibition of Cdk5 was recently shown to increase GABA release at inhibitory synapses in the rat

*substantia nigra pars reticulata* (Loya-López *et al.*, 2020), suggesting that Cdk5 activation might produce disinhibition. Disinhibition is a common feature of a variety of chronic pain states, including those resulting from inflammation (Harvey *et al.*, 2004), nerve injury (Moore *et al.*, 2002; Coull *et al.*, 2003; Scholz *et al.* 2005) and spinal cord injury (Drew *et al.*, 2004). Of note, we cannot eliminate the possibility that the inhibitory effect of roscovitine on MDH central sensitization be accounted for by a direct – i.e. CDK5-independent – facilitating effect on GABA-mediated tonic currents as in hippocampus (Ivanov *et al.*, 2008). Altogether, these electrophysiological results identify the activation of Cdk5 signaling pathways as potential mechanisms supporting (i) baseline transmission at C fiber afferent-2<sup>nd</sup> order neuron synapses, likely through facilitation of presynaptic release, as well as (ii) SDH/MDH central sensitization. Finally, evidence that endogenous activation of CDK5 alone can potentiate SDH Fos expression (Zhang *et al.*, 2019) suggests that Cdk5 activation alone might even be sufficient for producing MDH/SDH sensitization.

Our Western blot analysis revealed that p35, p25, and p-ERK1/2, but not Cdk5, protein expressions strongly increased in both TG and MDH after facial inflammatory – formalin as well as CFA – injury. The protein levels of the Cdk5 activators, p35 (Yang *et al.*, 2007) and p25 (Pareek *et al.*, 2006), also increase in dorsal root ganglions (DRGs) after hind-paw inflammatory injury. On the other hand, Cdk5 protein expression was shown to stay constant (Yang *et al.*, 2007) as well as to increase (Pareek *et al.*, 2006). Nevertheless, Cdk5 activity was consistently found elevated (Pareek *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007) – likely because of enhanced p35 and p25 protein levels – in the setting of inflammatory pain. Cdk5 protein expression within SDH was also shown to stay constant (Yang *et al.*, 2007) or to increase (Pareek *et al.*, 2006) after hind-paw inflammatory injury. But, again, Cdk5 activity was consistently elevated, manifested as enhanced phosphorylation (i) of DARPP-32, its downstream targets (Wang *et al.*, 2005) or (ii) of histone in an *in vitro* kinase activity assay (Pareek *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007). Several mechanisms can account for an elevated Cdk5 activity within SDH after hind-paw inflammatory injury: in addition to a putative enhancement of Cdk5 protein levels (see above),

Cdk5 autophosphorylation on S159 (Zhang *et al.*, 2014) and enhanced expression of Cdk5 activators, p35 (Yang *et al.*, 2007), p25 (Pareek *et al.*, 2006) and phospho-ERK1/2 (Zhang *et al.*, 2014; Zhong *et al.*, 2019). Therefore, our observation of elevated p35, p25, and p-ERK1/2 protein expressions is consistent with an increased Cdk5 activity within MDH in the setting of facial inflammatory pain. Importantly, p35, p25, and p-ERK1/2 protein expressions significantly decreased within 3 days after the onset of inflammation, suggesting that Cdk5 activity, too, declines over time. This is consistent with a role of MDH Cdk5 in specifically the induction, but not maintenance, of mechanical hypersensitivity and central sensitization in the setting of facial inflammatory pain (see above).

Our Western blot analysis also revealed that not only p35, p25 and p-ERK1/2 but also Cdk5 protein expressions are still increased in both TG and MDH, 2 weeks after CCI-ION. Measurements of Cdk5 protein levels after neuropathic injury have provided conflicting results, the Cdk5 protein expression being found elevated (DRG: Gomez *et al.*, 2020; present results; MDH: present results; SDH: Li *et al.*, 2014) or constant (MDH: Li *et al.*, 2010; SDH: Gomez *et al.*, 2020). Nevertheless, Cdk5 activity in the MDH (Li *et al.*, 2010) as well as SDH (Li *et al.*, 2014) is consistently elevated 2 weeks after neuropathic injury. Such elevated Cdk5 activity is likely due to enhanced expression of p35 (TG: present results; DRG: Gomez *et al.*, 2020; MDH: Li *et al.*, 2010; present results; SDH: Zhong *et al.*, 2019; Gomez *et al.*, 2020) and p25 (DRG: Gomez *et al.*, 2020; MDH: present results; but see SDH: Gomez *et al.*, 2020), in addition to enhanced Cdk5 expression (see above) after neuropathic injury. Our result that Cdk5 expression remains elevated 2 weeks after CCI-ION is consistent with a role of MDH Cdk5 in the maintenance of mechanical hypersensitivity in the setting of facial neuropathic pain (see above).

Although the cellular expression of Cdk5 has already been reported in control conditions in the peripheral nervous system, in TG (Ino *et al.*, 1994; Pareek *et al.*, 2006) as well as DRG (Terada *et al.*, 1998; Pareek *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007), and SDH (Pareek *et al.*, 2006), its precise cellular localization has not been fully characterized. In the peripheral nervous system, Cdk5 was shown to be

present specifically in small to medium size (Yang *et al.*, 2007) and TRPV1<sup>+</sup> DRG/TG neurons (Pareek *et al.*, 2006), thus in neurons with an expression pattern consistent with C fiber nociceptors. Our immunohistochemical analysis reveals that, in control conditions, Cdk5/p35 is equally expressed in all subclasses of C-fiber neurons within TG; that is, not only in peptidergic (CGRP<sup>+</sup> primary neurons) and non peptidergic (IB4<sup>+</sup> primary neurons) C-fiber nociceptors but also C-fiber low-threshold mechanoreceptors (TH<sup>+</sup> primary neurons). In MDH, Cdk5/p35 is expressed exclusively in neurons and predominantly in deep laminae (III-V) in control conditions. Notably, it is mostly present in excitatory neurons in superficial laminae and in inhibitory neurons in deeper laminae.

As in SDH (Zhang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019), Cdk5/p35 neuronal expression strongly increases in MDH after inflammatory injury – in the formalin as well as capsaicin models. Moreover, few astrocytes and microglia cells then express Cdk5/p35 in MDH as in SDH (Hu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019). We did not directly address the neurotransmitter phenotype of Cdk5<sup>+</sup>/p35<sup>+</sup> neurons in such sensitized conditions. However, that Cdk5/p35 was then detected in about 75% of MDH neurons strongly suggest that it was then expressed in most excitatory as well as inhibitory MDH neurons. A very important observation is that such enhancement in Cdk5/p35 neuronal expression occurs predominantly in superficial laminae and in lamina II<sub>i</sub>. It was recently shown that mechanical allodynia is associated with the activation, within the SDH/MDH of dorsally-directed, polysynaptic circuits whereby tactile inputs that terminate in deep laminae – from inner lamina II (II<sub>i</sub>) to laminae V-VI – can gain access to the pain circuitry in superficial SDH/MDH [laminae I and outer lamina II (II<sub>o</sub>)] (Torsney and McDermott, 2006; Miraucourt *et al.*, 2006; 2009). Lamina II<sub>i</sub> and the dorsal part of lamina III appear to be a region critical for the development of mechanical allodynia after injury. A class of SDH/MDH excitatory interneurons that express the  $\gamma$  isoform of protein kinase C (PKC $\gamma$ ), predominantly located in lamina II<sub>i</sub>, have already be shown to play a critical role in the mechanism of mechanical allodynia during chronic pain (for review see Artola *et al.*, 2020). It is interesting to note that Cdk5 and PKC $\gamma$  in the SDH/MDH appear to share many functional properties.



First, mechanical allodynia is also associated with enhanced PKC $\gamma$  immunoreactivity (Mao *et al.*, 1995<sub>b</sub>; Martin *et al.*, 1999), increased PKC $\gamma$  phosphorylation (Peirs *et al.*, 2016), Fos expression, and ERK phosphorylation in PKC $\gamma$  neurons (Miraucourt *et al.*, 2007, 2009; Petitjean *et al.*, 2015; Pham Dang *et al.*, 2016). Second, pharmacological (Shumilla *et al.*, 2005; Miraucourt *et al.*, 2007, 2009; Petitjean *et al.*, 2015; Pham Dang *et al.*, 2016; Alba-Delgado *et al.*, 2018) or genetic inhibition of PKC $\gamma$  (Malmberg *et al.*, 1997<sub>a, b</sub>; Zhao *et al.*, 2011; Zou *et al.*, 2011) can reduce or prevent mechanical allodynia in different experimental settings. Finally, mechanical allodynia can be triggered by PKC $\gamma$  activation alone (Pham Dang *et al.*, 2016). Cdk5 at lamina II<sub>i</sub> might thus be also required for the activation of allodynia circuits. But our electrophysiological results indicate that Cdk5 activation also contributes to the potentiation of high-threshold mechanical C-fiber nociceptor inputs onto WDR neurons. Interestingly, these nociceptors terminate in superficial SDH/MDH (laminae I/II) where Cdk5 expression is also strongly increased after inflammatory injury. This suggests complementary roles of a Cdk5-dependent potentiation of C-fiber nociceptor input, on the one hand, and activation of allodynia circuits, on the other hand. These two phenomenon would contribute in the leftward shift of the whole mechanical stimulus–response function (LaMotte *et al.* 1991; Kilo *et al.*, 1994; Magerl *et al.*, 1998), which actually encompasses decreased pain thresholds and increased pain to suprathreshold stimuli, referred to as mechanical allodynia and hyperalgesia, respectively.

Altogether, our results indicate an important role for Cdk5/p35 activity in DH sensitization as a result of peripheral inflammatory or neuropathic injury. Notably, they provide evidence for the very role of Cdk5/p35 in MDH pain signaling depending on the injury type – Cdk5/p35 contributes to only the induction of the MDH sensitization underlying mechanical pain hypersensitivity after inflammatory injury but also to its maintenance after neuropathic injury –, in agreement with the recent evidence that neurons engaged in SDH/MDH microcircuits underlying mechanical allodynia depend on the injury type (Peirs *et al.*, 2021). Furthermore, our results obtained in the setting of neuropathic pain suggest that Cdk5/p35 activation MDH, as in primary afferents (Pareek *et al.*, 2006; Prochazkova *et al.*, 2013;

Zhang *et al.*, 2019), might alone be sufficient for pain hypersensitivity. Finally, these results confirm that Cdk5 may be a target for the development of analgesic drugs.

## LITTERATURE CITED

- Alba-Delgado C, S. Mountadem N, Mermet-Joret L, Monconduit R, Dallel A, Artola A, Antri M (2018) 5-HT<sub>2A</sub> Receptor-Induced Morphological Reorganization of PKCgamma-Expressing Interneurons Gates Inflammatory Mechanical Allodynia in Rat. *J Neurosci* **38**(49): 10489-10504.
- Alvarez P, Dieb W, Hafidi A, Voisin DL, Dallel R (2009) Insular cortex representation of dynamic mechanical allodynia in trigeminal neuropathic rats. *Neurobiol. Dis.* **33**(1): 89-95.
- Artola A, Voisin DL, Dallel R (2020) PKCgamma interneurons, a gateway to pathological pain in the dorsal horn. *J Neural Transm. (Vienna)* **127**(4): 527-540.
- Beaudry H., Mercier-Blais AA, Delaygue C, Lavoie C, Parent JL, Neugebauer W, Gendron L (2015) Regulation of mu and delta opioid receptor functions: involvement of cyclin-dependent kinase 5. *Br J Pharmacol* **172**(10): 2573-2587.
- Boyer N, Dallel D, Artola A, Monconduit L (2014) General trigemino-spinal central sensitization and impaired descending pain inhibitory controls contribute to migraine progression. *Pain* **155**(7), 1196-1205.
- Burkey A R, Carstens E, Wenniger JJ, Tang J, Jasmin L (1996) An opioidergic cortical antinociception triggering site in the agranular insular cortex of the rat that contributes to morphine antinociception. *J Neurosci.* **16**(20): 6612-6623.
- Clavelou P, Dallel R, Orliaguet T, Woda A, Raboisson P (1995) The orofacial formalin test in rats: effects of different formalin concentrations. *Pain* **62**(3): 295-301.
- Coddou C, Sandoval R, Castro P, Lazcano P, Hevia MJ, Rokic M, Hall B, Terse A, Gonzalez-Billault C, Kulkarni AB, Stojilkovic SS, Utreras E (2017) Cyclin-dependent kinase 5 modulates the

- P2X2a receptor channel gating through phosphorylation of C-terminal threonine 372. *Pain* **158(11)**: 2155-2168.
- Contreras-Vallejos E., Utreras E, Gonzalez-Billault C (2012) Going out of the brain: non-nervous system physiological and pathological functions of Cdk5. *Cell Signal* **24(1)**: 44-52.
- Coste J, Voisin DL, Luccarini P, Dallel R (2008) A role for wind-up in trigeminal sensory processing: intensity coding of nociceptive stimuli in the rat. *Cephalalgia* **28(6)**:631-639.
- Dallel R, Duale C, Luccarini P, Molat JL (1999) Stimulus-function, wind-up and modulation by diffuse noxious inhibitory controls of responses of convergent neurons of the spinal trigeminal nucleus oralis. *Eur J Neurosci* **11(1)**: 31-40.
- Dallel R, Duale C, Molat JL (1998) Morphine administered in the substantia gelatinosa of the spinal trigeminal nucleus caudalis inhibits nociceptive activities in the spinal trigeminal nucleus oralis. *J Neurosci* **18(10)**: 3529-3536.
- Dallel R, Luccarini P, Molat JL, Woda A (1996) Effects of systemic morphine on the activity of convergent neurons of spinal trigeminal nucleus oralis in the rat. *Eur J Pharmacol* **314(1-2)**: 19-25.
- Dickenson AH, Le Bars D (1987) Lack of evidence for increased descending inhibition on the dorsal horn of the rat following periaqueductal grey morphine microinjections. *Br J Pharmacol* **92(2)**: 271-280.
- Ducourneau VRR, Dolique T, Hachem-Delaunay S, Miraucourt LS, Amadio A, Blaszczyk L, Jacquot F, Ly J, Devoize L, Oliet SHR, Dallel R, Mothet JP, Nagy F, Fenelon FS, Voisin DL(2014) Cancer

- pain is not necessarily correlated with spinal overexpression of reactive glia markers. *Pain* **155**(2): 275-291.
- Fang H, Zhang HH, Yang BX, Huang JL, Shun JL, Kong FJ, Peng X, Chen ZG, Lu JM(2015). Cdk5 contributes to inflammation-induced thermal hyperalgesia mediated by the p38 MAPK pathway in microglia. *Brain Res.* **1619**: 166-175.
- Finnerup NB, Jensen TS (2006) Mechanisms of disease: mechanism-based classification of neuropathic pain-a critical analysis. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* **2**(2): 107-115.
- Gomez K, Calderon-Rivera A, Sandoval A, Gonzalez-Ramirez R, Vargas-Parada A, Ojeda-Alonso J, Granados-Soto V, Delgado-Lezama R, Felix R (2020) Cdk5-Dependent Phosphorylation of CaV3.2 T-Type Channels: Possible Role in Nerve Ligation-Induced Neuropathic Allodynia and the Compound Action Potential in Primary Afferent C Fibers. *J Neurosci.* **40**(2): 283-296.
- Harada S, Esch GL, Holgado-Madruga M, Wong AJ (2001) Grb-2-associated binder-1 is involved in insulin-induced egr-1 gene expression through its phosphatidylinositol 3'-kinase binding site. *DNA Cell Biol.* **20**(4): 223-229.
- Hu JW (1990) Response properties of nociceptive and non-nociceptive neurons in the rat's trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) related to cutaneous and deep craniofacial afferent stimulation and modulation by diffuse noxious inhibitory controls. *Pain* **41**:331–345.
- Hu H, Zhang H-H, Yang B-X, Huang J-L, Shun J-L, Kong F-J, Xu P, Chen Z-G, Lu J-M (2015) Cdk5 contributes to inflammation-induced thermal hyperalgesia mediated by the p38 MAPK pathway in microglia. *Brain Res.* **1619**:166-175.

- Ino H, Ishizuka T, Chiba T, Tatibana M (1994) Expression of CDK5 (PSSALRE kinase), a neural cdc2-related protein kinase, in the mature and developing mouse central and peripheral nervous systems. *Brain Res.* **661**, 196–206.
- Jendryke T, Prochazkova M, Hall BE, Nordmann GC, Schladt M, Milenkovic VM, Kulkarni AB, Wetzel CH (2016) TRPV1 function is modulated by Cdk5-mediated phosphorylation: insights into the molecular mechanism of nociception. *Sci Rep* **6**:22007.
- Ji RR, Baba H, Brenner GJ, Woolf CJ (1999) Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nat. Neurosci.* **2(12)**:1114-1119.
- Ji RR, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ (2003) Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci.* **26(12)**:696-705.
- Kilo S, Schmelz M, Koltzenburg M, Handwerker HO (1994) Different patterns of hyperalgesia induced by experimental inflammation in human skin. *Brain* **117(Pt 2)**:385-396.
- LaMotte RH, Shain CN, Simone DA, Tsai EF (1991) Neurogenic hyperalgesia: psychophysical studies of underlying mechanisms. *J Neurophysiol.* **66(1)**:190-211.
- Lapirot O, Melin C, Modolo A, Nicolas C, Messaoudi Y, Monconduit L, Artola A, Luccarini P, Dallel R (2011) Tonic and phasic descending dopaminergic controls of nociceptive transmission in the medullary dorsal horn. *Pain* **152(8)**:1821-1831.
- Latremoliere A, Woolf CJ (2009) Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* **10(9)**:895-926.

- Li W, Fang M, Cai XH (2010). [Expression and activity of Cdk5/p35 in a rat model of trigeminal neuropathic pain]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* **19(5)**:545-548.
- Li BS, Sun MK, Zhang L, Takahashi S, Ma W, Vinade L, Kulkarni AB, Brady RO, Pant HC (2001) Regulation of NMDA receptors by cyclindependent kinase-5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:12742–12747.
- Li K, Zhao GQ, Li LY, Wu GZ, Cui SS (2014) Epigenetic upregulation of Cdk5 in the dorsal horn contributes to neuropathic pain in rats. *Neuroreport* **25(14)**:1116-1121.
- Liu J, Du J, Yang Y, Wang Y (2015) Phosphorylation of TRPV1 by cyclindependent kinase 5 promotes TRPV1 surface localization, leading to inflammatory thermal hyperalgesia. *Exp Neurol* **273**:253–262.
- Lorenzo LE, Ramien M, St Louis M, De Koninck Y, Ribeiro-da-Silva A (2008) Postnatal changes in the Rexed lamination and markers of nociceptive afferents in the superficial dorsal horn of the rat. *J Comp Neurol* **508**:592–604.
- Luccarini P, Perrier L, Degoulange C, Gaydier AM, Dallel R (2004) Synergistic antinociceptive effect of amitriptyline and morphine in the rat orofacial formalin test." *Anesthesiology* **100(3)**:690-696.
- Lynds R, Lyu C, Lyu GW, Shi XQ, Rosen A, Mustafa K, Shi TJS (2017) Neuronal plasticity of trigeminal ganglia in mice following nerve injury. *J Pain Res* **10**:349-357.
- Magerl W, Wilk SH, Treede RD (1998) Secondary hyperalgesia and perceptual wind-up following intradermal injection of capsaicin in humans. *Pain* **74(2-3)**:257-268.

- Malik-Hall M, Dina OA, Levine JD (2005) Primary afferent nociceptor mechanisms mediating NGF-induced mechanical hyperalgesia. *Eur. J Neurosci.* **21(12)**:3387-3394.
- Malmberg AB, Chen C, Tonegawa S, Basbaum AI (1997) Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC $\gamma$ . *Science* **278(5336)**:279-283.
- Mao J, Price DD, Phillips LL, Lu J, Mayer DL (1995) Increases in protein kinase C  $\gamma$  immunoreactivity in the spinal cord dorsal horn of rats with painful mononeuropathy. *Neurosci. Lett.* **198(2)**:75-78.
- Martin WJ, Liu H, Wang H, Malmberg AB, Basbaum AI (1999) Inflammation-induced up-regulation of protein kinase C $\gamma$  immunoreactivity in rat spinal cord correlates with enhanced nociceptive processing. *Neuroscience* **88(4)**:1267-1274.
- Melin CF, Jacquot F, Dallel R, Artola A (2013) Segmental disinhibition suppresses C-fiber inputs to the rat superficial medullary dorsal horn via the activation of GABAB receptors. *Eur. J Neurosci.* **37(3)**:417-428.
- Miracourt LS, Dallel R, Voisin DL (2007) Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through PKC $\gamma$  interneurons. *PLoS One* **2(11)**:e1116.
- Miracourt LS, Moisset X, Dallel R, Voisin DL (2009) Glycine inhibitory dysfunction induces a selectively dynamic, morphine-resistant, and neurokinin 1 receptor-independent mechanical allodynia. *J Neurosci* **29(8)**:2519-2527.
- Miracourt LS, Peirs C, Dallel R, Voisin DL (2011) Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through astrocyte-derived D-serine. *Pain* **152(6)**:1340-1348.



- Oshinsky ML, Gomonchareonsiri S (2007) Episodic dural stimulation in awake rats: a model for recurrent headache. *Headache* **47(7)**:1026-1036.
- Pareek TK, Keller J, Kesavapany S, Agarwal N, Kuner R, Pant HC, Iadarola MJ, Brady RO, Kulkarni AB (2007) Cyclin-dependent kinase 5 modulates nociceptive signaling through direct phosphorylation of transient receptor potential vanilloid 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104(2)**:660-665.
- Pareek TJ, Keller J, Kesavapany S, Pant HC, Iadarola MJ, Brady RO, Kulkarni AB (2006) Cyclin-dependent kinase 5 activity regulates pain signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103(3)**:791-796.
- Peirs C, Bourgois N, Artola A, Dallel R (2016) Protein Kinase C gamma Interneurons Mediate C-fiber-induced Orofacial Secondary Static Mechanical Allodynia, but Not C-fiber-induced Nociceptive Behavior. *Anesthesiology* **124(5)**:1136-1152.
- Peirs C, Patil S, Bouali-Benazzouz R, Artola A, Landry M, Dallel R (2014) Protein kinase C gamma interneurons in the rat medullary dorsal horn: distribution and synaptic inputs to these neurons, and subcellular localization of the enzyme. *J Comp. Neurol.* **522(2)**:393-413.
- Peirs C, Williams SG, Zhao X, Arokiaraj CM, Ferreira DW, Noh MC, Smith KM, Halder P, Corrigan KA, Gedeon JY, Lee SJ, Gatto G, Chi D, Ross SE, Goulding M, Seal RP (2021). Mechanical Allodynia Circuitry in the Dorsal Horn Is Defined by the Nature of the Injury. *Neuron* **109(1)**:73-90 e77.
- Pelissier T, Pajot J, Dallel R (2002) The orofacial capsaicin test in rats: effects of different capsaicin concentrations and morphine. *Pain* **96(1-2)**:81-87.

- Petitjean H, Pawlowski SA, Fraine SL, Sharif B, Hamad D, Fatima T, Berg J, Brown CM, Jan LY, Ribeiro-da-Silva A, Braz JM, Basbaum AI, Sharif-Naeini R (2015) Dorsal Horn Parvalbumin Neurons Are Gate-Keepers of Touch-Evoked Pain after Nerve Injury. *Cell Rep* **13(6)**:1246-1257.
- Pham-Dang N, Descheemaeker A, Dallel R, Artola A (2016) Activation of medullary dorsal horn gamma isoform of protein kinase C interneurons is essential to the development of both static and dynamic facial mechanical allodynia. *Eur. J Neurosci.* **43(6)**:802-810.
- Polgar E, Furuta T, Kaneko T, Todd A (2006) Characterization of neurons that express preprotachykinin B in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience* **139(2)**:687-697.
- Prochazkova M, Terse A, Amin ND, Hall B, Utreras E, Pant HC, Kulkarni AB (2013) Activation of cyclin-dependent kinase 5 mediates orofacial mechanical hyperalgesia. *Mol. Pain* **9**:66.
- Raboisson P, Dallel R (2004) The orofacial formalin test. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **28(2)**:219-226.
- Rozas P, Lazcano P, Pina R, Cho A, Terse A, Pertusa M, Madrid R, Gonzalez-Billault C, Kulkarni AB, Utreras E (2016) Targeted overexpression of tumor necrosis factor-alpha increases cyclin-dependent kinase 5 activity and TRPV1-dependent Ca<sup>2+</sup> influx in trigeminal neurons. *Pain* **157(6)**:1346-1362.
- Sandoval R, Lazcano P, Ferrari F, Pinto-Pardo N, Gonzalez-Billault C, Utreras E (2018) TNF-alpha Increases Production of Reactive Oxygen Species through Cdk5 Activation in Nociceptive Neurons. *Front Physiol.* **9**:65.
- Sawynok J, Liu XJ (2004) The Formalin test: characteristics and usefulness of the model. *Rev Analg.* **7(2)**:145-163.

- Strassman AM, Vos BP, Mineta Y, Naderi S, Borsook D, Burstein R (1993) Fos-like immunoreactivity in the superficial medullary dorsal horn induced by noxious and innocuous thermal stimulation of facial skin in the rat. *J Neurophysiol.* **70(5)**:1811-1821.
- Su SC, Tsai L-H (2011) Cyclin-dependent kinases in brain development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**:465-91.
- Taves S, Berta T, Liu DL, Gan S, Chen G, Kim YH, Van de Ven T, Laufer S, Ji RR (2016) Spinal inhibition of p38 MAP kinase reduces inflammatory and neuropathic pain in male but not female mice: Sex-dependent microglial signaling in the spinal cord. *Brain Behav. Immun.* **55**:70-81.
- Terada M, Yasuda H, Kogawa S, Maeda K, Haneda M, Hidaka H, Kashiwagi A, Kikkawa R(1998) Expression and activity of cyclin-dependent kinase 5/p35 in adult rat peripheral nervous system. *J Neurochem.* **71(6)**:2600-2606.
- Torsney C, MacDermott AB (2006) Disinhibition opens the gate to pathological pain signaling in superficial neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord. *J Neurosci.* **26(6)**: 1833-1843.
- Utreras, E., Futatsugi A, Rudrabhatla P, Keller J, Iadarola MJ, Pant HC, Kulkarni AB (2009) Tumor necrosis factor-alpha regulates cyclin-dependent kinase 5 activity during pain signaling through transcriptional activation of p35. *J Biol. Chem.* **284(4)**:2275-2284.
- Utreras E, Keller J, Terse A, Prochazkova M, Iadarola MJ, Kulkarni AB (2012) Transforming growth factor-beta1 regulates Cdk5 activity in primary sensory neurons. *J Biol. Chem.* **287(20)**: 16917-16929.

- Utreras E, Prochazkova M, Terse A, Gross J, Keller J, Iadarola MJ, Kulkarni AB (2013) TGF-beta1 sensitizes TRPV1 through Cdk5 signaling in odontoblast-like cells. *Mol Pain* **9**:24.
- von Hehn CA, Baron R, Woolf CJ (2012) Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. *Neuron* **73(4)**:638-652.
- Vos BP, Strassman AM, Maciewicz RJ (1994) Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *J Neurosci.* **14(5 Pt 1)**:2708-2723.
- Wang G-Q, Cen C, Li C, Cao S, Wang N, Zhou Z, Liu X-M, Xu Y, Tian N-X, Zhang Y, Wang J, Wang L-P, Wang Y (2015) Deactivation of excitatory neurons in the prelimbic cortex via Cdk5 promotes pain sensation and anxiety. *Nat Commun.* **6**:7660.
- Williams R W, Rakic P (1988) Three-dimensional counting: an accurate and direct method to estimate numbers of cells in sectioned material. *J Comp. Neurol.* **278(3)**:344-352.
- Xing BM, Yang YR, Du JX, Chen HJ, Qi C, Huang ZH, Zhang Y, Wang Y (2012) Cyclin-dependent kinase 5 controls TRPV1 membrane trafficking and the heat sensitivity of nociceptors through KIF13B. *J Neurosci.* **32**:14709–14721.
- Yang L, Gu X, Zhang W, Zhang J, Ma Z (2014) Cdk5 inhibitor roscovitine alleviates neuropathic pain in the dorsal root ganglia by downregulating N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2A. *Neurol. Sci.* **35(9)**:1365-1371.
- Yang YR, He Y, Zhang Y, Li Y, Li Y, Han Y, Zhu H, Wang Y (2007) Activation of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) in primary sensory and dorsal horn neurons by peripheral inflammation contributes to heat hyperalgesia. *Pain* **127(1-2)**:109-120.

- Zhang S, Edelmann L, Liu J, Crandall JE, Morabito MA (2008) Cdk5 regulates the phosphorylation of tyrosine 1472 NR2B and the surface expression of NMDA receptors. *J Neurosci.* 28:415–24.
- Zhang R, Liu Y, Zhang J, Zheng Y, Gu X, Ma Z (2012) Intrathecal administration of roscovitine attenuates cancer pain and inhibits the expression of NMDA receptor 2B subunit mRNA. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **102(1)**:139-145.
- Zhang C, Sha H, Peng Y, Wang Y, Liu C, Zhou X (2019) PiRNA-DQ541777 Contributes to Neuropathic Pain via Targeting Cdk5rap1. *J Neurosci.* **39(45)**:9028-9039.
- Zhang HH, Zhang XQ, Wang WY, Xue QS, Lu H, Huang JL, Gui T, Yu BW (2012) Increased synaptophysin is involved in inflammation-induced heat hyperalgesia mediated by cyclin-dependent kinase 5 in rats. *PLoS One* **7(10)**:e46666.
- Zhang HH, Zhang XQ, Xue QS, Yan L, Huang JL, Zhang S, Shao HJ, Lu H, Wang WY, Yu BW (2014) The BDNF/TrkB signaling pathway is involved in heat hyperalgesia mediated by Cdk5 in rats. *PLoS One* **9(1)**:e85536.
- Zhao C, Leitges M, Gereau RWt (2011) Isozyme-specific effects of protein kinase C in pain modulation. *Anesthesiology* **115(6)**:1261-1270.
- Zhong Y, Chen J, Chen J, Chen Y, Li L, Xie Y (2019) Crosstalk between Cdk5/p35 and ERK1/2 signalling mediates spinal astrocyte activity via the PPARgamma pathway in a rat model of chronic constriction injury. *J Neurochem.* **151(2)**:166-184.
- Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* **16(2)**:109-110.

Zou W, Song Z, Guo Q, Liu C, Zhang Z, Zhang Y (2011) Intrathecal lentiviral-mediated RNA interference targeting PKC $\gamma$  attenuates chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Hum. Gene Ther.* **22(4)**:465-475.

## LEGENDS TO THE FIGURES

**Figure 1: Schematic representation of the experimental designs.** Green rectangle: Assessment of spontaneous pain behavior; Blue rectangles: Assessment of static (6 g von Frey filament stimulation) and dynamic (air puff stimulation) mechanical allodynia; Orange rectangle: Mechanical stimulation of the right upper lip, 0.5-1 cm to the injection site, for 3 min using a 6 g vF filament (0.5 Hz); Empty rectangles: Deep anesthesia (urethane); Grey rectangles: *In vivo* electrophysiological recordings of the responses of MDH WDR neurons to mechanical and electrical stimulation of their receptive field.

**Figure 2: Intracisternal roscovitine prevents facial formalin-induced spontaneous pain behavior.**

**A.** Time courses of the rubbing response to subcutaneous formalin injection (50  $\mu$ l, 1.5%) into the right lower lip in adult male and female rats preemptively injected with either roscovitine (100  $\mu$ g in 10  $\mu$ l of vehicle) or vehicle (10  $\mu$ l) into the cisterna magna (i.c.), 30 min before formalin injection. 2 ways ANOVA, followed by *post hoc* multiple comparison Bonferroni's test. Comparison between vehicle and roscovitine-treated rats: \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$  for male and #  $P < 0.05$ , ###  $P < 0.001$  for female; n = 5, 5, 5 and 5 in roscovitine- and vehicle-treated male and female groups, respectively. **B.** Bar histograms of the duration (mean + s.e.m.) of the first and second phases of rubbing behavior in the four groups of rats as above. Both male and female roscovitine-treated rats display similar reduced nocifensive behaviors during phases I and II of the formalin test. Of note, the durations of phases I and II in saline-treated male and female rats are not significantly different. Welch's unpaired t-test. Comparison between vehicle and roscovitine-treated rats: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; n = 5, 5, 5 and 5 in roscovitine- and vehicle-treated male and female groups, respectively.

**Figure 3: Intracisternal roscovitine can prevent, but not reverse, the enduring facial static and dynamic mechanical allodynias in male and female rats, after formalin inflammatory injury. A,**

**B.** Time courses of changes (mean  $\pm$  s.d.) in behavioral responses (allodynic score) evoked by dynamic

(air puff; AP) or static mechanical stimuli (6g von Frey filament; vF) applied on the face of formalin-injected male (**A**) or female (**B**) rats. Rats were preemptively i.c. injected with either roscovitine or vehicle, 30 min before formalin injection. Formalin produces both dynamic and static mechanical allodynia, the latter being stronger than the former and roscovitine completely prevents both dynamic and static mechanical pain hypersensitivities for the duration of the experiment (3 days after formalin injection). Two-way ANOVA, followed by post hoc multiple comparison Dunnett. Comparison between saline and roscovitine-treated rats: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ;  $n = 5, 5, 5$  and  $5$  in roscovitine- and vehicle-treated male and female groups, respectively. **C.** Bar histograms of the behavioral responses evoked by dynamic or static mechanical stimuli (as above) applied on the face of formalin-injected male (left bars) or female rats (right bars), 6 h after i.c. injection of either vehicle (empty bars) or roscovitine (filled bars). I.c. injections were performed 3 days after formalin injection, that is, once mechanical allodynia was well established. There was no difference between roscovitine- and vehicle-injected rats, indicating that roscovitine fails to suppress formalin-induced dynamic and static mechanical allodynias, once they are established, in male and female rats. Welch's unpaired t-test.  $n = 10, 10, 10$  and  $10$  in roscovitine- and saline-treated male and female groups, respectively.

**Figure 4: Intracisternal roscovitine can prevent, but not reverse, facial enduring static mechanical allodynia in male and female rats after CFA inflammatory injury. A, B.** Time courses of changes (mean  $\pm$  s.e.m.) in behavioral responses (allodynic score) evoked by dynamic (air puff; AP) or static mechanical stimuli (6g von Frey filament; vF) applied on the face of CFA (125  $\mu$ g in 25  $\mu$ l into the right lower lip)-injected male (**A**) or female (**B**) rats. Rats were preemptively i.c. injected with either roscovitine or vehicle, 30 min before CFA injection. CFA produces only a static mechanical allodynia and roscovitine completely prevents such CFA-induced static mechanical pain hypersensitivity for the duration of the experiment (3 days after CFA injection). Two-way ANOVA, followed by post hoc multiple comparison Dunnett. Comparison between saline and roscovitine-treated rats: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ;  $n = 5, 5, 5$  and  $5$  in roscovitine- and saline-treated male and female groups,



respectively. **C.** Bar histograms of the behavioral responses evoked by dynamic or static mechanical stimuli (as above) applied on the face of CFA-injected male (empty and filled black bars) or female rats (empty and filled grey bars), 6 h after i.c. injection of either vehicle (empty bars) or roscovitine (filled bars). I.c. injections were performed 3 days after CFA injection, that is, once mechanical allodynia was well established. There was no difference between roscovitine- and vehicle-injected rats, indicating that roscovitine fails to suppress CFA-induced static mechanical allodynia, once it is established, in male and female rats. Welch's unpaired t-test.  $n = 10, 10, 10$  and  $10$  in roscovitine- and saline-treated male and female groups, respectively.

**Figure 5: Intracisternal roscovitine prevents hind-paw formalin- and CFA-induced enduring mechanical pain hypersensitivities in female rats.** Bar histograms (mean + s.e.m.) of mechanical thresholds (von Frey filaments) of the hind-paw of adult female rats before (Baseline; empty bars) and 1 day (filled bars) after subcutaneous formalin and CFA injection into the hind-paw. Rats were preemptively i.c. injected with either roscovitine ( $100 \mu\text{g}$  in  $10 \mu\text{l}$ ) or vehicle ( $10 \mu\text{l}$ ), 30 min before the formalin or CFA injection. Treatments and numbers of animals in the different groups are indicated below the histograms. Roscovitine completely prevents both formalin- and CFA-induced static mechanical pain hypersensitivity for the duration of the experiment (1 day after formalin or CFA injection). Welch's unpaired t-test.  $** P < 0.01$

**Figure 6: Intracisternal roscovitine transiently reverses facial mechanical allodynia after neuropathic injury. A, B.** Time courses of changes (mean  $\pm$  s.e.m.) in behavioral responses (allodynic score) evoked by dynamic (air puff; AP) or static mechanical stimuli (6g von Frey filament; vF) applied on the face of neuropathic male (**A**) or female (**B**) rats, before and after i.c. injection. Rats were i.c. injected with either roscovitine or vehicle 2 weeks after unilateral IoN-CCI. At that time, rats showed dramatic facial dynamic and static mechanical allodynias. I.c. roscovitine nearly completely suppressed – allodynic scores were decreased to near 1 – dynamic and static mechanical pain hypersensitivities in

both male and female rats for almost 3 days. Two-way ANOVA, followed by post hoc multiple comparison Dunnett. Comparison between roscovitine- and vehicle-treated rats: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ;  $n = 10, 10, 10$  and  $10$  in roscovitine- and saline-treated male and female groups, respectively.

**Figure 7: Experimental set-up for *in vivo* electrophysiology.** **A. Aa.** Photograph of the rat in the stereotaxic frame. The incisor bar is dropped 5 mm under the standard position to fix the head in a slightly ventroflexed position. **Ab.** View of the dorsal face of the brainstem through the camera. **Ac.** Example of a response of a WDR neuron to electrical stimulation of its cutaneous receptive field. C- and A-fiber-evoked responses are distinguished according to their latencies: all spikes between 30 and 200 ms after stimulus were considered as C fiber evoked. **B.** Schematic drawing of the cutaneous innervation (up) and projections into the trigeminal sub-nucleus caudalis/medullary dorsal horn (down) of the 3 branches, ophthalmic (V1), maxillary (V2) and mandibular (V3), of the trigeminal nerve in the rat. The 5 laminae of the MDH are also indicated.

**Figure 8: In control conditions, intracisternal roscovitine reduces the responses of MDH WDR neurons to specifically high-threshold mechanical stimulation and C-fiber electrical stimulation.** **A.** Representative responses of WDR neurons to brush (Br) and 6, 8, 26 and 60g von Frey (vF) filament stimuli, before and 180 min after i.c. saline (Vehicle) or roscovitine (100 $\mu$ g) application. **B.** Bar histograms (mean - s.e.m.) of changes (normalized with Baseline) in brush- and 6, 8, 26 and 60g (vF) filament-evoked responses of WDR neurons 180 min after i.c. saline (V; empty bars;  $n = 6$  each in brush and 6, 8, 26 and 60g vF groups, respectively) or roscovitine application (R; filled bars;  $n = 6$  each in brush and 6, 8, 26 and 60g vF groups, respectively). Intracisternal application of roscovitine preferentially reduces the neuronal responses to high strength mechanical stimulation (26 and 60g vF). **C.** Post-stimulus histogram (PSTH) of 30 successive responses (0.66 Hz) of two WDR neurons to electrical stimulation of their cutaneous receptive field before (Baseline) and 180 min after i.c. saline

or roscovitine application. Intracisternal application of roscovitine reduces exclusively C-fiber-evoked neuronal responses. **D.** Bar histograms (mean +/- s.e.m.) of changes (normalized with baseline) in C-fiber-evoked responses of WDR neurons 180 min after i.c. saline (empty bar; n = 6) or roscovitine application (filled bar; n = 6). Comparison between saline and roscovitine-treated WDR neurons/ rats: Unpaired t-test (two tailed). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

**Figure 9: Responses of MDH WDR neurons to peripheral stimulation are sensitized after CFA inflammatory injury.** **A.** Representative responses of WDR neurons to brush (Br) and 6, 8, 26 and 60g von Frey (vF) filament stimuli, before (Baseline) and 180 min after injection of saline (Vehicle) or CFA (125 $\mu$ g) into the right vibrissa pad, 1–1.5 cm to the stimulating electrodes. **B.** Bar histograms (mean + s.e.m.) of changes (normalized with Baseline) in brush- (Br) and 6, 8, 26 and 60g vF filament-evoked responses of WDR neurons 180 min after cutaneous saline (V; empty bars; n = 7 each in Br and 6, 8, 26 and 60g vF groups, respectively) or CFA (125 $\mu$ g) injection (C; filled bars; n = 8 each in Br and 6, 8, 26 and 60g vF groups, respectively). All neuronal responses to low and high strength mechanical stimulation are significantly increased after cutaneous CFA injection. **C.** PSTH of 30 successive responses (0.66 Hz) of two WDR neurons to percutaneous electrical stimulation of their receptive field before (Baseline) and 180 min after saline (Vehicle) or CFA (125 $\mu$ g) injection into the right vibrissa pad. **D.** Bar histograms (mean +/- s.e.m.) of changes (normalized with Baseline) in C-fiber-evoked responses of WDR neurons 180 min after saline (Vehicle; empty bar; n = 6) or CFA (125 $\mu$ g; filled bar; n = 8) injection into the right vibrissa pad. C-fiber-evoked neuronal responses are strongly increased after cutaneous CFA injection. Comparison between saline and roscovitine-treated WDR neurons/ rats: Unpaired t-test (two tailed). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

**Figure 10: Intracisternal roscovitine prevents the sensitization of MDH WDR neurons.** **A.** Representative responses of WDR neurons to brush (Br) and 6, 8, 26 and 60g von Frey (vF) filament stimuli, before (Baseline) and 180 min after cutaneous CFA injection in rats preemptively treated with

i.c. application of saline (Vehicle + CFA) or roscovitine (100  $\mu$ g; (Rosco + CFA) application. **B.** Bar histograms (mean  $\pm$  s.e.m.) of changes (normalized with Baseline) in brush- (Br) and 6, 8, 26 and 60g (vF) filament-evoked responses of WDR neurons 180 min after cutaneous CFA injection in rats preemptively treated with i.c. application of saline (V; empty bars;  $n = 6$  each in Br and 6, 8, 26 and 60g vF groups, respectively) or roscovitine application (R; filled bars;  $n = 8$  each in Br and 6, 8, 26 and 60g vF groups, respectively). The preemptive treatment with roscovitine not only prevents all CFA-induced changes (brush and vF stimuli) but actually depresses neuronal responses to predominantly high strength vF stimuli. **C.** PSTH of 30 successive responses (0.66 Hz) of two WDR neurons to percutaneous electrical stimulation of their receptive field before (Baseline) and 180 min after cutaneous CFA injection into the right vibrissa pad in rats preemptively treated with i.c. saline (Vehicle + CFA) or roscovitine application (Rosco + CFA). **D.** Bar histograms (mean  $\pm$  s.e.m.) of changes (normalized with Baseline) in C-fiber-evoked responses of WDR neurons 180 min after cutaneous CFA injection in rats preemptively treated with i.c. saline (V + C; empty bars;  $n = 6$ ) or roscovitine application (R + C; filled bars;  $n = 10$ ). The preemptive treatment with roscovitine not only prevents all CFA-induced changes in C-fiber evoked response but actually strongly depresses these responses. Unpaired t-test (two tailed). Comparison between saline and roscovitine-treated WDR neurons/rats: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Comparison between Baseline and post-CFA responses: ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ .

**Figure 11: Intracisternal roscovitine does not suppress established MDH central sensitization. A.** Representative responses of WDR neurons to brush (Br) and 6, 8, 26 and 60g von Frey (vF) filament stimuli before cutaneous CFA injection (Baseline) and 3 days after CFA injection and 180 min after i.c. application of saline (CFA + Vehicle) or roscovitine (100  $\mu$ g) (CFA + Rosco). **B.** Bar histograms (mean  $\pm$  s.e.m.) of changes (normalized with Baseline before CFA injection) in brush- (Br) and 6, 8, 26 and 60g (vF) filament-evoked responses of WDR neurons 3 days after CFA injection and 180 min after i.c. application of saline (V; empty bars;  $n = 6$  each in Br and 6, 8, 26 and 60g vF groups, respectively) or

roscovitine (100  $\mu$ g) (R; filled bars; n = 6 each in Br and 6, 8, 26 and 60g vF groups, respectively). Intracisternal roscovitine has no effect on the potentiated response after peripheral inflammation. **C.** PSTH of 30 successive responses (0.66 Hz) of two WDR neurons to percutaneous electrical stimulation of their receptive field before (Baseline) and 180 min after i.c. application of saline (CFA + Saline) or roscovitine (CFA + Rosco) in allodynic rats, 3 days after subcutaneous CFA injection. **D.** Bar histograms (mean + s.e.m.) of C-fiber-evoked responses (normalized to Baseline) of WDR neurons 180 min after i.c. saline (C + V; empty bars; n = 6) or roscovitine (C + R; filled bars; n = 10).application, in allodynic rats, 3 days after subcutaneous CFA injection. Unpaired t-test (two tailed). Comparison between saline and roscovitine-treated WDR neurons in allodynic rats, 3 days after subcutaneous CFA injection:

**Figure 12: p35, p25 and p-ERK1/2, but not Cdk5, protein expressions are significantly upregulated in ipsilateral TG in the setting of inflammatory pain.** **A.** Representative blots of the protein contents of p35, p25, Cdk5 and p-ERK1/2 in the ipsilateral TG of saline ( $\pm$  mechanical stimulation) and formalin and CFA (+ mechanical stimulation) treated rats. **B.** Bar histograms (+ S.E.M.) of the protein content of p35, p25, Cdk5 and p-ERK1/2, 1 h after saline (white bars), saline (+ mechanical stimulation; light grey bars), CFA (+ mechanical stimulation; dark grey bars) or formalin injection (+ mechanical stimulation; black bars) into the right vibrissa pad, in the ipsilateral or contralateral TGs (as indicated on the graph). Protein levels are normalized to those measured in saline + mechanical stimulation rats. The right upper lip – the putative area of secondary hyperalgesia – was stimulated with normally innocuous (6g) von Frey filament (0.5 Hz for 3 min) just before animals were transcardially perfused. Note that the two models of facial inflammatory pain produce rather the same elevations in p35, p25 and p-ERK1/2, but not Cdk5, protein levels in specifically the ipsilateral TG. Two-ways ANOVA protein x treatment x side followed by Tukey's *post hoc* test: ipsilateral vs.

contralateral: \*\*\*  $P < 0.001$  and treatment vs. saline + mechanical stimulation  $^{++} P < 0.01$ ,  $^{+++} P < 0.001$ ;  $n = 3$ .

**Figure 13: Time course and mechanical stimulation dependency of the protein contents of p35, p25, Cdk5 and p-ERK1/2 in the ipsilateral TG in the setting of inflammatory pain.** **A.** Bar histograms (+ S.E.M.) of the protein contents of p35, p25, Cdk5 and p-ERK1/2 in the ipsilateral TG, 1 h and 3 days (as indicated on the graph) after saline (white bars), CFA (grey bars) or formalin injection (black bars) into the right vibrissa pad (+ 6g von Frey filament stimulation of the upper lip; 0.5 Hz for 3 min). Protein levels are normalized to those measured in saline-injected rats. Note that, in the two models of facial inflammatory pain, p35, p25 and p-ERK1/2 expressions tended to decrease over time. Two-ways ANOVA protein x treatment x time followed by Tukey's *post hoc* test: 3 d vs. 1 h: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  and treatment vs. saline  $^{+} P < 0.05$ ,  $^{++} P < 0.01$ ,  $^{+++} P < 0.001$ ;  $n = 3$ . **B.** **Top:** Representative blots of the protein contents of p35, p25, Cdk5 and p-ERK1/2 in the ipsilateral TG of saline (+ mechanical stimulation) and formalin and CFA ( $\pm$  mechanical stimulation) treated rats. **Bottom:** Bar histograms (+ S.E.M.) of the protein contents of p35, p25, Cdk5 and p-ERK1/2 in the ipsilateral TG, 3 days after saline, CFA or formalin injection into the right vibrissa pad, with or without mechanical stimulation (6g von Frey filament stimulation of the upper lip; 0.5 Hz for 3 min; as indicated on the graph). Protein levels are normalized to those measured in saline-injected rats. Note that, in the two models of facial inflammatory pain, p35, p25 and p-ERK1/2 expressions increased with stimulation. Two-ways ANOVA protein x treatment x stimulation followed by Tukey's *post hoc* test: Stim. vs. No Stim.: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  and treatment vs. saline  $^{+} P < 0.05$ ,  $^{++} P < 0.01$ ,  $^{+++} P < 0.001$ ;  $n = 3$ .

**Figure 14: p35, p25 and p-ERK1/2, but not Cdk5, protein expressions are significantly upregulated in ipsilateral MDH in the setting of inflammatory pain.** **A.** Representative blots of the protein content of p35, p25, Cdk5 and p-ERK1/2 in the ipsilateral MDH of saline ( $\pm$  mechanical

stimulation) and formalin and CFA (+ mechanical stimulation) treated rats. **B.** Bar histograms (+ S.E.M.) of the protein content of p35, p25, Cdk5 and p-ERK1/2, 1 h after saline (white bars), saline (+ mechanical stimulation; light grey bars), CFA (+ mechanical stimulation; dark grey bars) or formalin injection (+ mechanical stimulation; black bars) into the right vibrissa pad, in the ipsilateral or contralateral MDHs (as indicated on the graph). Protein levels are normalized to those measured in saline + mechanical stimulation rats. Protein levels are normalized to those measured in saline-injected rats. The right upper lip – the putative area of secondary hyperalgesia – was stimulated with normally innocuous (6g) von Frey filament (0.5 Hz for 3 min) just before animals were transcardially perfused. Note that the two models of facial inflammatory pain produce rather the same elevations in p35, p25 and p-ERK1/2, but not Cdk5, protein levels in specifically the ipsilateral MDH. Two-ways ANOVA protein x treatment x side followed by Tukey's *post hoc* test: ipsilateral vs. contralateral: \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 and treatment vs. saline (+ mechanical stimulation): ++ P < 0.01, +++ P < 0.001; n = 3.

**Figure 15: Time course and mechanical stimulation dependency of the protein contents of p35, p25, Cdk5 and p-ERK1/2 in the ipsilateral MDH in the setting of inflammatory pain.** **A.** Bar histograms (+ S.E.M.) of the protein contents of p35, p25, Cdk5 and p-ERK1/2 in the ipsilateral MDH, 1 h and 3 days (as indicated on the graph) after saline (white bars), CFA (grey bars) or formalin injection (black bars) into the right vibrissa pad (+ 6g von Frey filament stimulation of the upper lip; 0.5 Hz for 3 min). Protein levels are normalized to those measured in saline-injected rats. Note that, in the two models of facial inflammatory pain, p35, p25 and p-ERK1/2 expressions decreased with time. Two-ways ANOVA protein x treatment x time followed by Tukey's *post hoc* test: 3 d vs. 1 h: \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 and treatment vs. saline + P < 0.05, ++ P < 0.01, +++ P < 0.001; n = 3. **B. Top:** Representative blots of the protein contents of p35, p25, Cdk5 and p-ERK1/2 in the ipsilateral MDH of saline (+ mechanical stimulation) and formalin and CFA ( $\pm$  mechanical stimulation) treated rats. **Bottom:** Bar histograms (+S.E.M.) of the protein contents of p35, p25, Cdk5 and p-ERK1/2 in the

ipsilateral MDH, 3 days after saline, CFA or formalin injection into the right vibrissa pad, with or without mechanical stimulation (6g von Frey filament stimulation of the upper lip; 0.5 Hz for 3 min; as indicated on the graph). Protein levels are normalized to those measured in saline-injected rats. Note that, in the two models of facial inflammatory pain, p35, p25 and p-ERK1/2 expressions increased with stimulation. Two-ways ANOVA protein x treatment x stimulation followed by Tukey's *post hoc* test: Stim. vs. No Stim.: \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 and treatment vs. saline + P < 0.05, ++ P < 0.01, +++ P < 0.001; n = 3.

**Figure 16: The protein contents of p35, Cdk5 and p-ERK1/2 are significantly upregulated in ipsilateral TG and MDH in the setting of neuropathic pain. A, B. Top:** Representative blots of the protein contents of p35, p25, Cdk5 and p-ERK1/2 in the ipsilateral TG (A) and MDH (B) of saline or CCI and Sham or CCI (+ mechanical stimulation) 14 days after CCI-ION. **Bottom:** Bar histograms (+S.E.M.) of the protein contents of p35, p25, Cdk5 and p-ERK1/2 in the ipsilateral (black bars) and contralateral (white bars) TG (A) and MDH (B), 14 days after CCI-ION. Protein levels are normalized to those measured in contralateral TG (A) or MDH (B). Note that in the model of facial neuropathic pain, p35, p-ERK1/2 as well as Cdk5 expression are elevated. The protein contents of p25 is elevated in ipsilateral MDH but not TG. Two-ways ANOVA protein x treatment x side followed by Tukey's *post hoc* test: ipsilateral vs. contralateral: \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001; n = 3.

**Figure 17: Colocalization of Cdk5/p35 with CGRP<sup>+</sup>, IB4<sup>+</sup> and TH<sup>+</sup> TG neurons in control rats. A.** Representative double-immunofluorescence images showing that Cdk5/p35 co-labeled with CGRP (a specific marker for peptidergic C nociceptors), IB4 (a specific marker for non-peptidergic C nociceptors) and TH (a specific marker for C-LTMRs). **B.** Double-immunolabeling experiments show that the CGRP protein is present in 32.9 ± 4.4% (black; mean ± S.E.M.; n = 7), the IB4 protein, in 42.7 ± 5.1% (white) and the TH<sup>+</sup> protein, in 24.3 ± 2.1% of Cdk5<sup>+</sup>/P35<sup>+</sup> neurons (grey).



**Figure 18. Cdk5/p35 colocalizes with neuronal but neither with astrocyte nor microglia markers in MDH of control rats.** **A.** Representative double-immunofluorescence images showing Cdk5/p35 and NeuN (neuronal marker) co-labelling in the ipsilateral MDH, 3 days after saline injection into the right vibrissa pad (top row) or 1 h (middle row) or 3 days (bottom row) after saline injection (bottom row) + mechanical stimulation. The right upper lip was stimulated with 6g vF filament (0.5 Hz, 3 min) just before animals were transcardially perfused. **B.** Bar histograms of the mean (+ S.E.M.) Cdk5/p35 neuronal expression in the different laminae of the ipsilateral MDH, 3 days after saline injection into the right vibrissa pad without mechanical stimulation (white bars) or 1 h (grey bars) or 3 days (black bars) after saline injection with mechanical stimulation. Note that the 3 conditions produce the same laminar distribution of Cdk5/p35 neuronal expression, with a clear tendency to a larger Cdk5/p35 neuronal expression in deep laminae. **C.** Representative double-immunofluorescence images showing Cdk5/p35 and Tlx3 (top row; marker for glutamatergic excitatory neurons) or Pax2 (bottom row; marker for GABAergic inhibitory neurons) co-labelling 1 h after saline injection into the right vibrissa pad with mechanical stimulation. **D.** Percentage of Cdk5/p35 immunoreactive glutamatergic excitatory (white) and GABAergic inhibitory neurons (black) in the whole ipsilateral MDH. **E.** Bar histograms of the mean (+ S.E.M.) Cdk5/p35 and TLX3 (white bars) or Pax2 (black bars) neuronal co-expression in the different laminae of ipsilateral MDH, 1h after saline injection into the right vibrissa pad with mechanical stimulation. Two-ways ANOVA, immunoreactivity x lamina followed by Tukey's *post hoc* test: Pax2 vs. TLX3: \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ;  $n = 3$ .

**Figure 19. Formalin inflammatory injury potentiates Cdk5/p35 neuronal expression in the MDH.**

**A.** Bar histograms of the mean (+ S.E.M.) Cdk5/p35 neuronal expression in the different laminae of ipsilateral MDH, 1 h after saline injection into the right vibrissa pad with mechanical stimulation (white bars), formalin injection without mechanical stimulation (grey bars) or formalin injection with mechanical stimulation (black bars) as indicated in the graph. The right upper lip was stimulated with 6g vF filament (0.5 Hz, 3 min) just before animals were transcardially perfused. Two-ways ANOVA,

treatment x stimulation x lamina followed by Tukey's *post hoc* test: formalin + vF stimulation vs. formalin alone: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; formalin vs. saline: +  $P < 0.05$ , ++  $P < 0.01$ , +++  $P < 0.001$ ;  $n = 3$ . **B.** Computed formalin/saline (+ mechanical stimulation) -induced Cdk5/p35 neuronal expression ratio (from data in A). Note that the inflammation-induced increase in Cdk5/p35 neuronal expression in lamina II<sub>i</sub> is about 4 times that in all other laminae, in both capsaicin- and formalin-treated rats. Are inflammation-induced changes in Cdk5/p35 neuronal expression different between laminae? More specifically, is the difference in % change in lamina II<sub>i</sub> compared with % change in other laminae significant? **C.** Bar histograms of the mean (+ S.E.M.) Cdk5/p35 neuronal expression in the different laminae of ipsilateral MDH, 3 days after saline or formalin injection into the right vibrissa pad, with or without mechanical stimulation as indicated in the graph. Two-ways ANOVA, treatment x stimulation x lamina followed by Tukey's *post hoc* test: treatment + vF stimulation vs. treatment alone: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; formalin vs. saline: +  $P < 0.05$ , ++  $P < 0.01$ , +++  $P < 0.001$ ;  $n = 3$ . **D.** Bar histograms of the mean (+ S.E.M.) Cdk5/p35 neuronal expression in the different laminae of ipsilateral MDH, 1 h or 3 days after saline or formalin injection into the right vibrissa pad (+ mechanical stimulation) as indicated in the graph. Note that Cdk5/p35 neuronal expression remains stable or increases within 3 days after formalin injection. Two-ways ANOVA, treatment x time x lamina followed by Tukey's *post hoc* test: 3 days vs. 1h: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; formalin vs. saline: +  $P < 0.05$ , ++  $P < 0.01$ , +++  $P < 0.001$ ;  $n = 3$ .

**Figure 20. CFA inflammatory injury potentiates Cdk5/p35 neuronal expression in the MDH. A.** Representative double-immunofluorescence images showing Cdk5/p35 and NeuN (neuronal marker) co-labelling in the ipsilateral MDH, 30 min after saline (top row) or capsaicin (bottom row) injection into the right vibrissa pad. **B.** Bar histograms of the mean (+ S.E.M.) Cdk5/p35 neuronal expression in the different laminae of ipsilateral MDH, 30 min after saline injection into the right vibrissa pad with mechanical stimulation (white bars), capsaicin injection without mechanical stimulation (grey bars) or capsaicin injection with mechanical stimulation (black bars) as indicated in the graph. The right upper

lip was stimulated with 6g vF filament (0.5 Hz, 3 min) just before animals were transcardially perfused. Two-ways ANOVA, treatment x lamina followed by Tukey's *post hoc* test: capsaicin + vF stimulation vs. capsaicin alone: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; capsaicin vs. saline: +  $P < 0.05$ , ++  $P < 0.01$ , +++  $P < 0.001$ ;  $n = 3$ . **C.** Computed capsaicin/saline (+ mechanical stimulation) -induced Cdk5/p35 neuronal expression ratio (from data in B). Note that the inflammation-induced increase in Cdk5/p35 neuronal expression in lamina II<sub>i</sub> is more than 2 times that in all other laminae, in both capsaicin- and formalin-treated rats.

**Figure 21. Cdk5/p35 expression within MDH astrocytes and microglia in the setting of facial inflammatory pain.** **A.** Representative double-immunofluorescence images showing that Cdk5/p35 co-labeled with Sox9 (astrocyte marker) and Iba1 (microglial marker). **B, C.** Bar histograms of the mean (+ S.E.M.) Cdk5/p35 expression in MDH astrocytes (Sox<sup>+</sup>; **B**) and microglia (Iba1<sup>+</sup>; **C**), 1 h (grey bars) and 3 days (black bars) after formalin injection into the right vibrissa pad. Cdk5/p35, which is not present in glial cells in control conditions (white bars), becomes expressed in few astrocytes (Sox<sup>+</sup>; **B**) and microglia cells after facial inflammatory injury. Two-ways ANOVA, treatment x time x lamina followed by Tukey's *post hoc* test: formalin vs. saline: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; 3 days vs. 1 h: ++  $P < 0.01$ , +++  $P < 0.001$ ;  $n = 3$ .

**Supplementary Figure 1.** Representative double-immunofluorescence images showing Cdk5/p35 and NeuN (neuronal marker), Iba1 (microglial cell marker) or Sox9 (astrocyte marker) without (3 upper rows) and with mechanical stimulation (3 bottom rows), 1 h after saline (A) or formalin (B) injection into the right vibrissa pad. The right upper lip – the putative area of secondary hyperalgesia – was stimulated with normally innocuous (6g) von Frey filament (0.5 Hz for 3 min) just before animals were transcardially perfused.

**Supplementary Figure 2.** Representative double-immunofluorescence images showing Cdk5/p35 and NeuN (neuronal marker), Iba1 (microglial cell marker) or Sox9 (astrocyte marker) without (3 upper rows) and with mechanical stimulation (3 bottom rows), 3 days after saline (A) or formalin (B) injection into the right vibrissa pad. The right upper lip – the putative area of secondary hyperalgesia – was stimulated with normally innocuous (6g) von Frey filament (0.5 Hz for 3 min) just before animals were transcardially perfused.

Figure 1

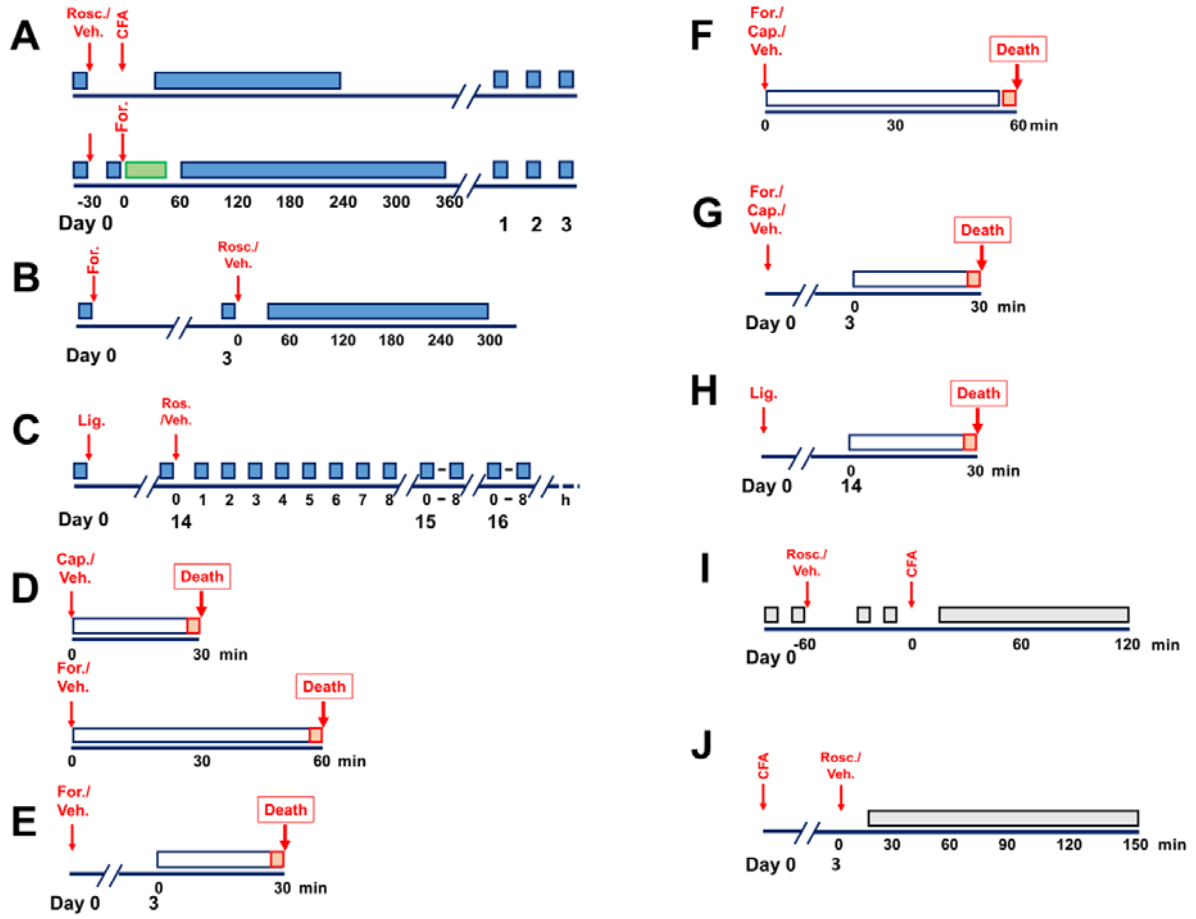
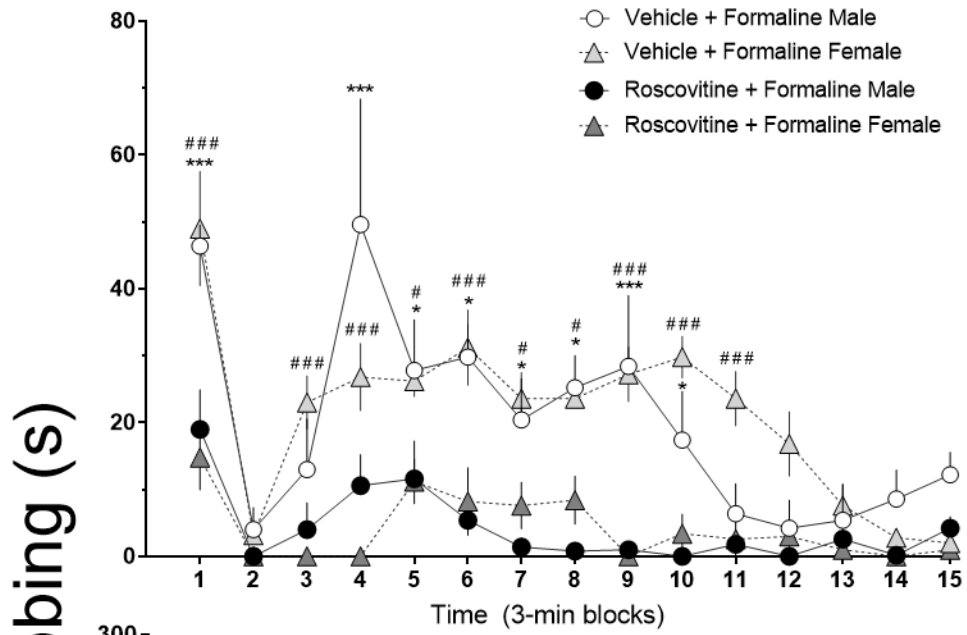
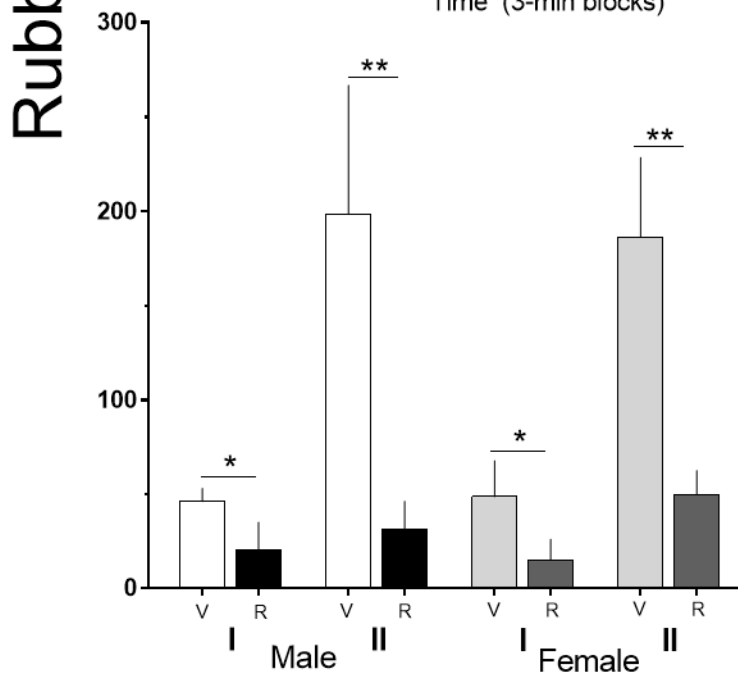


Figure 2

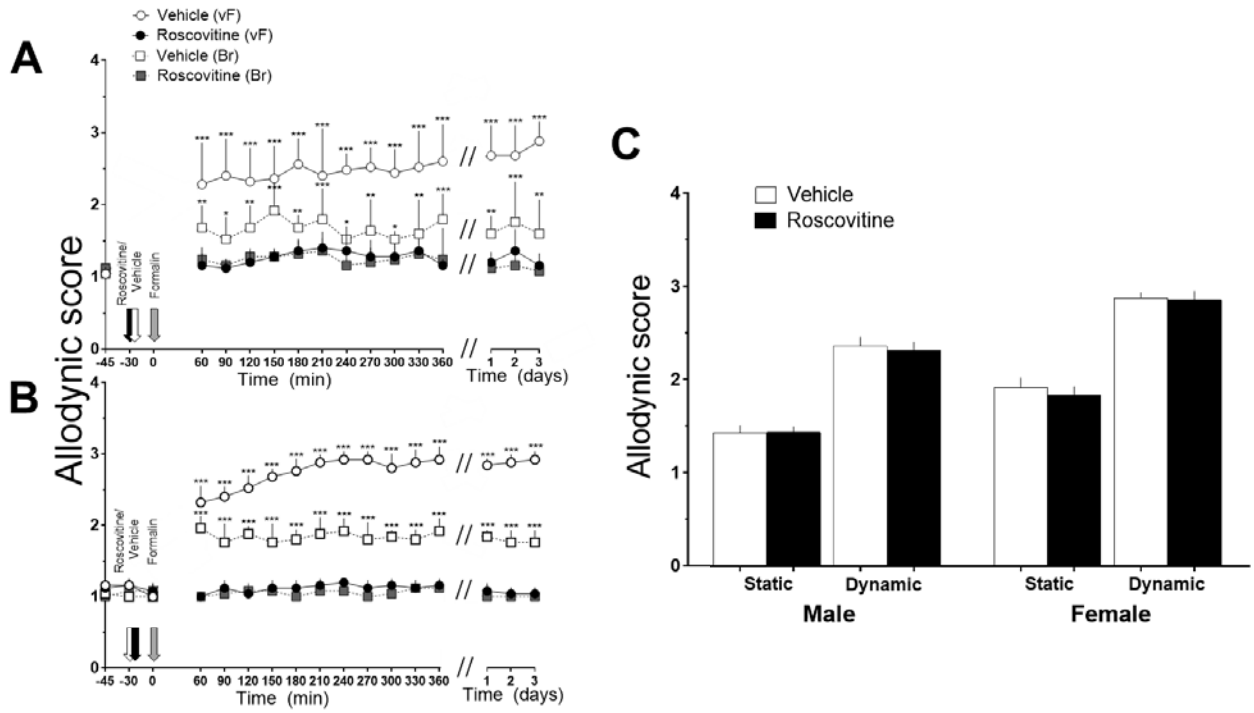
**A**



**B**



**Figure 3**



**Figure 4**

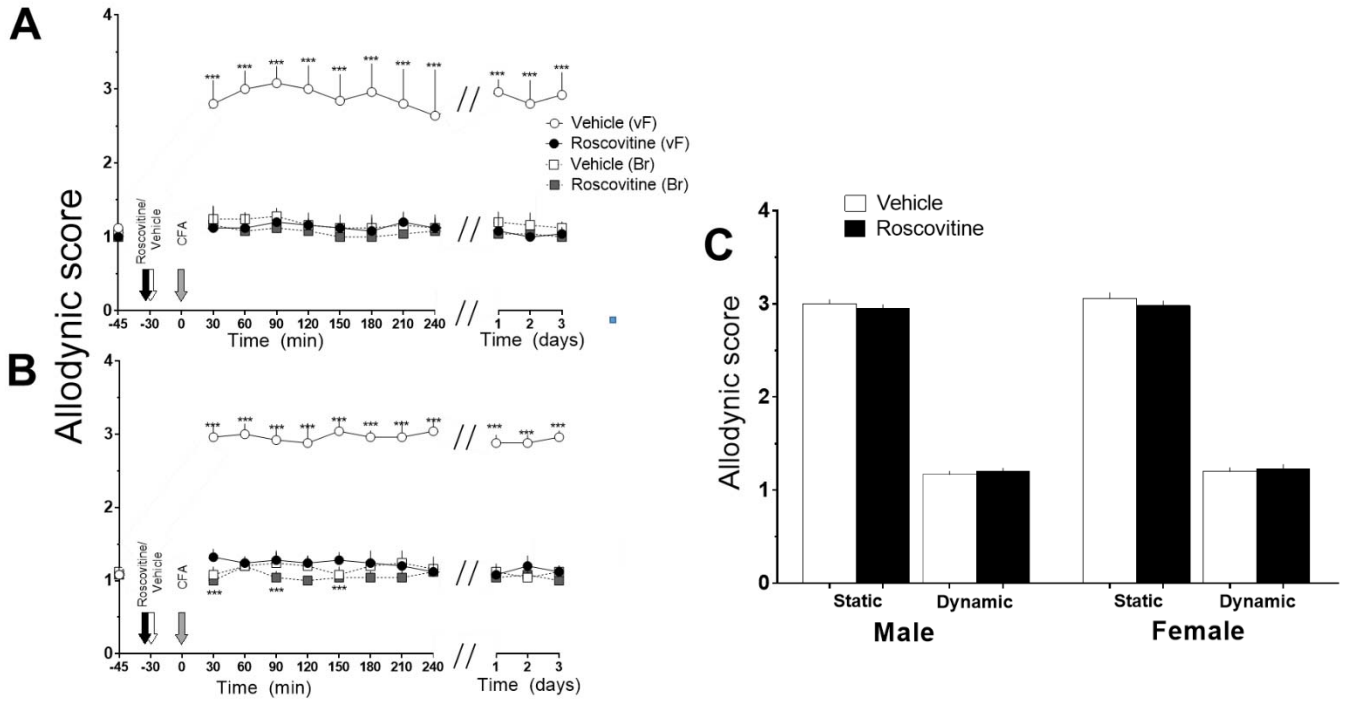




Figure 5

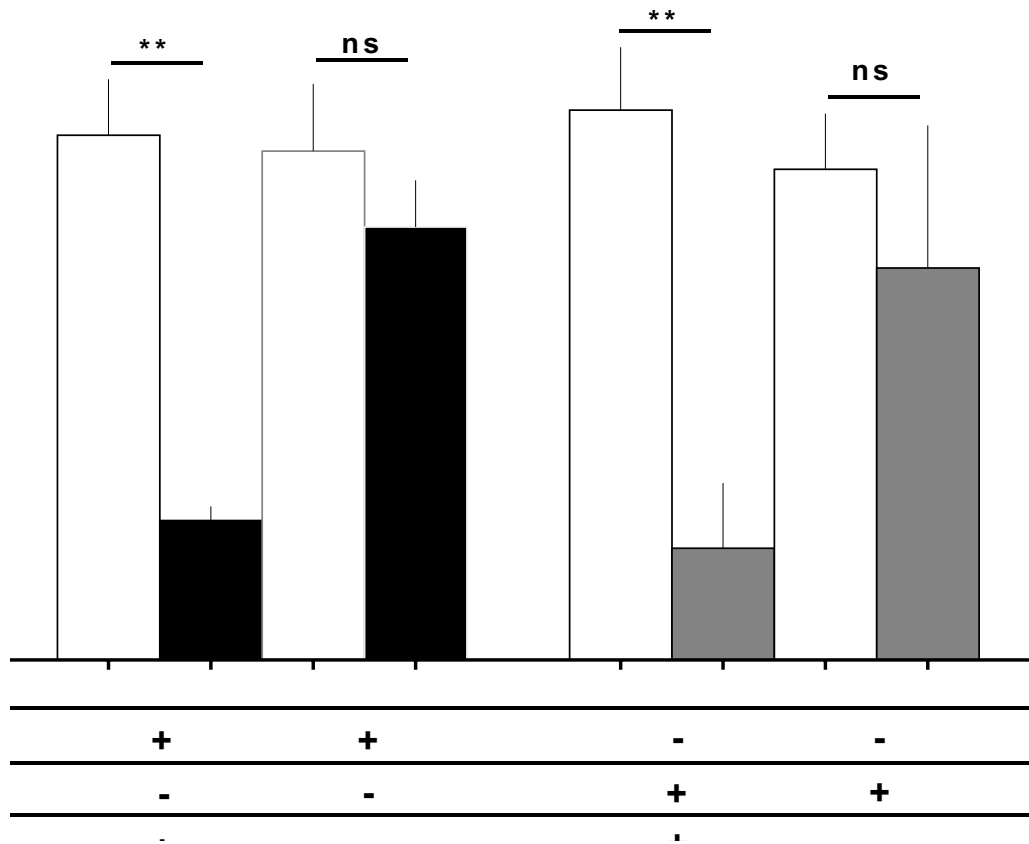


Figure 6

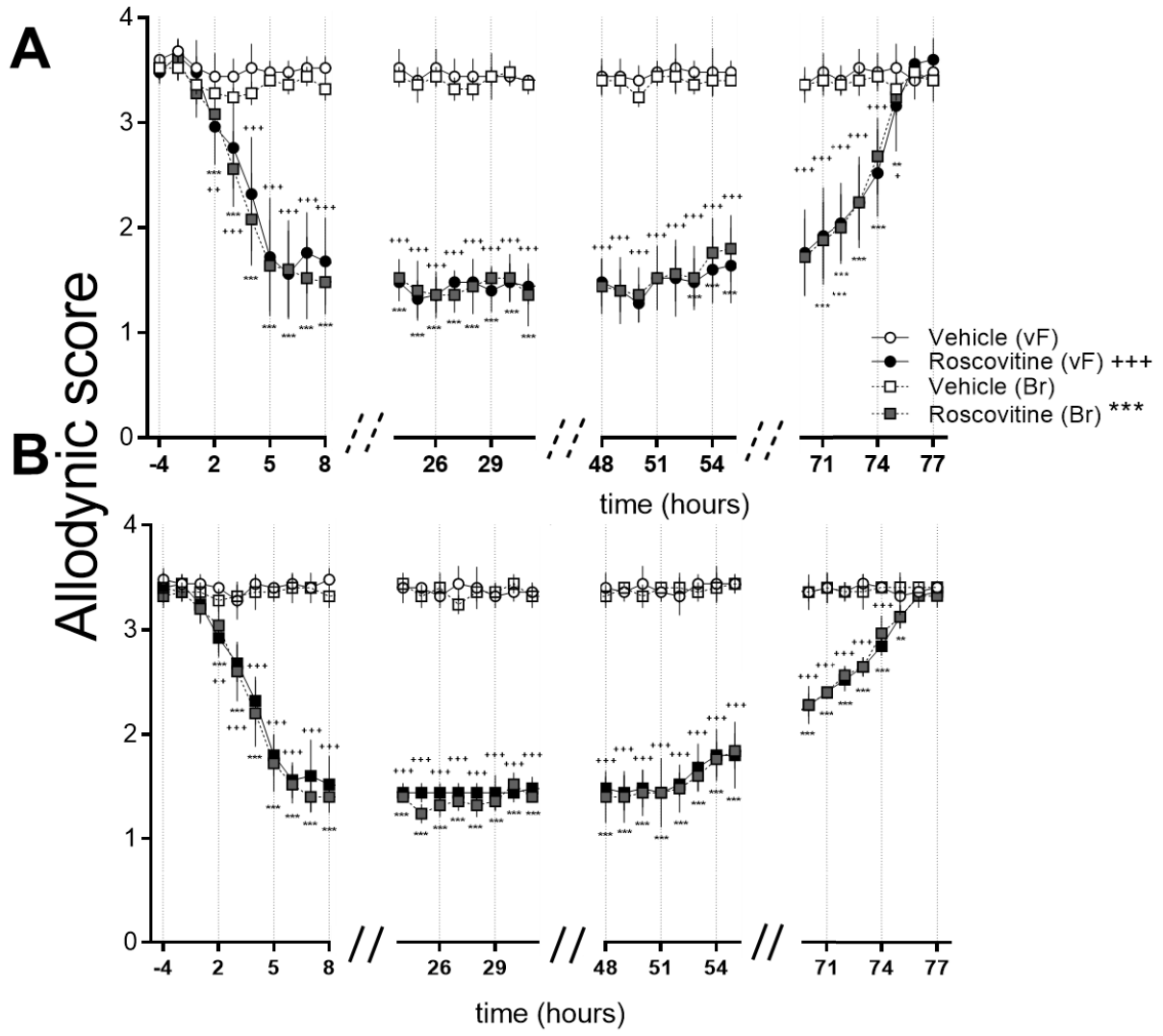


Figure 7

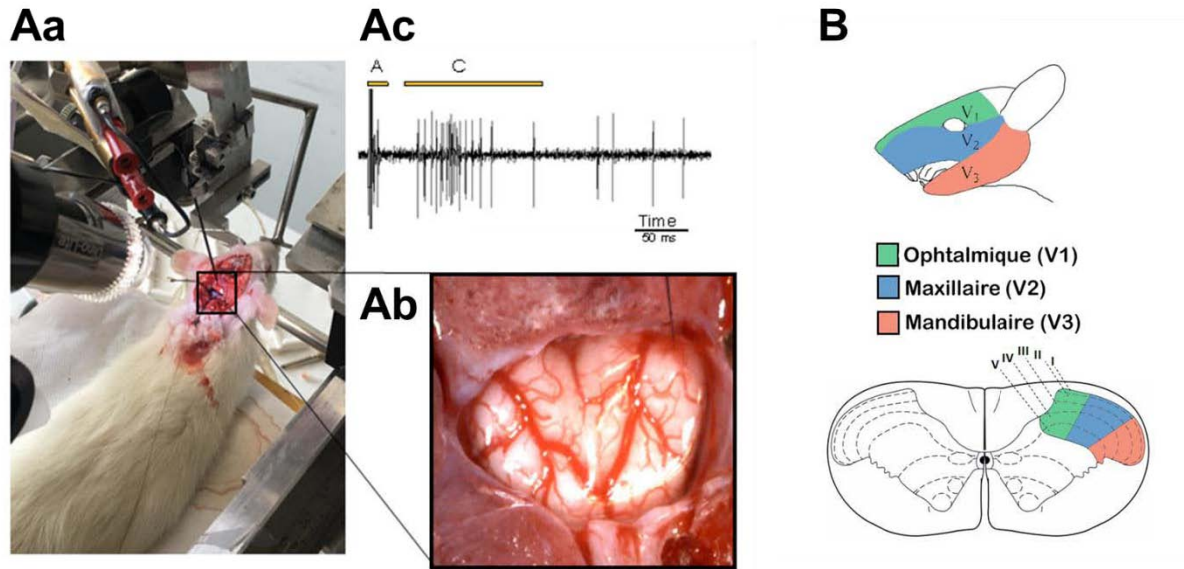


Figure 8

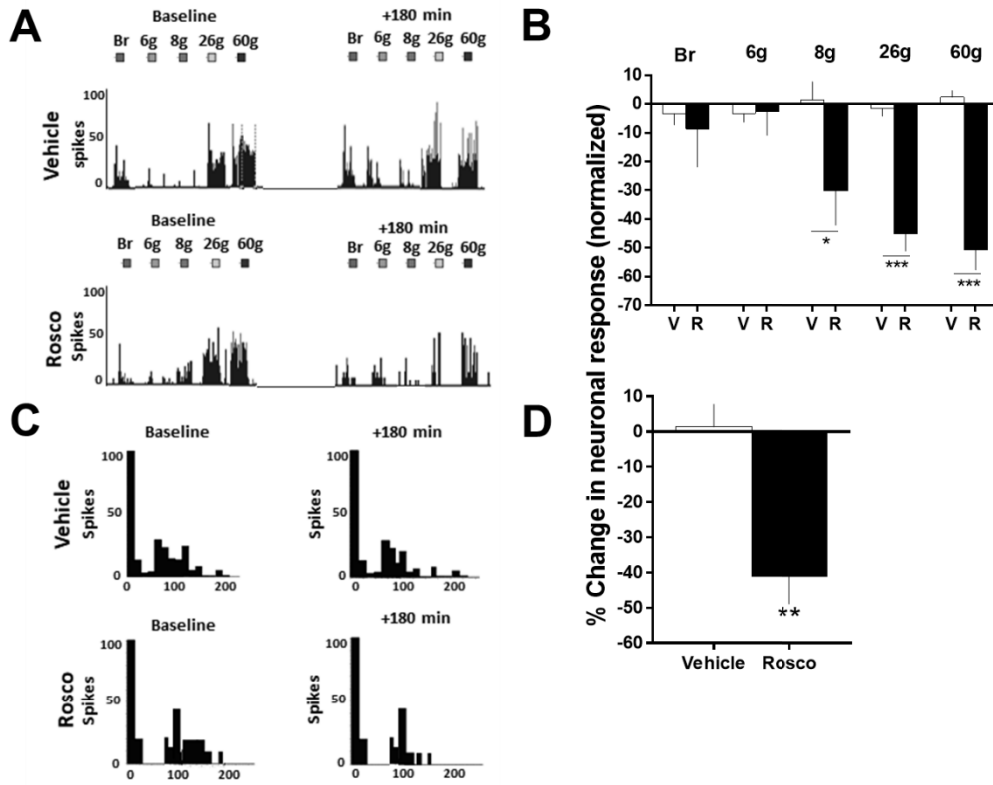


Figure 9

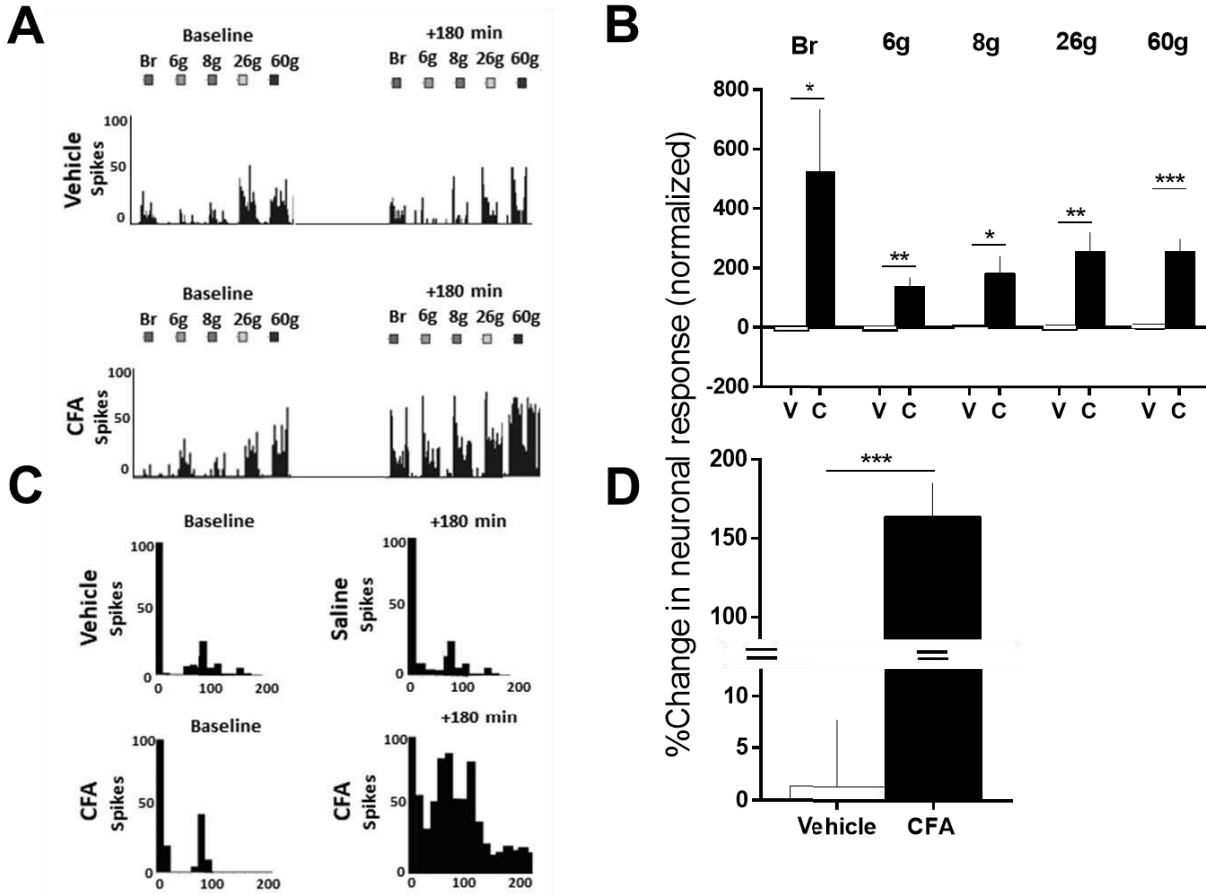


Figure 10

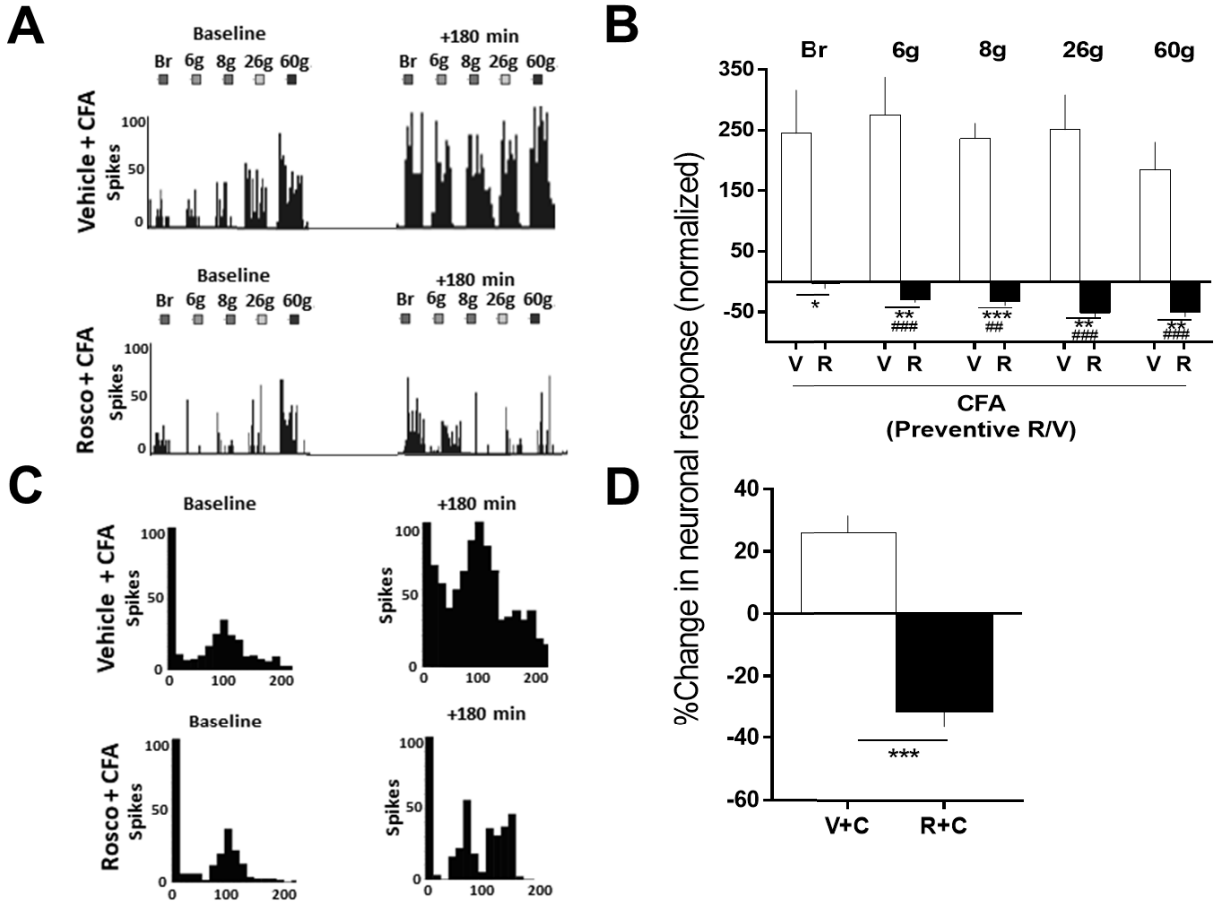


Figure 11

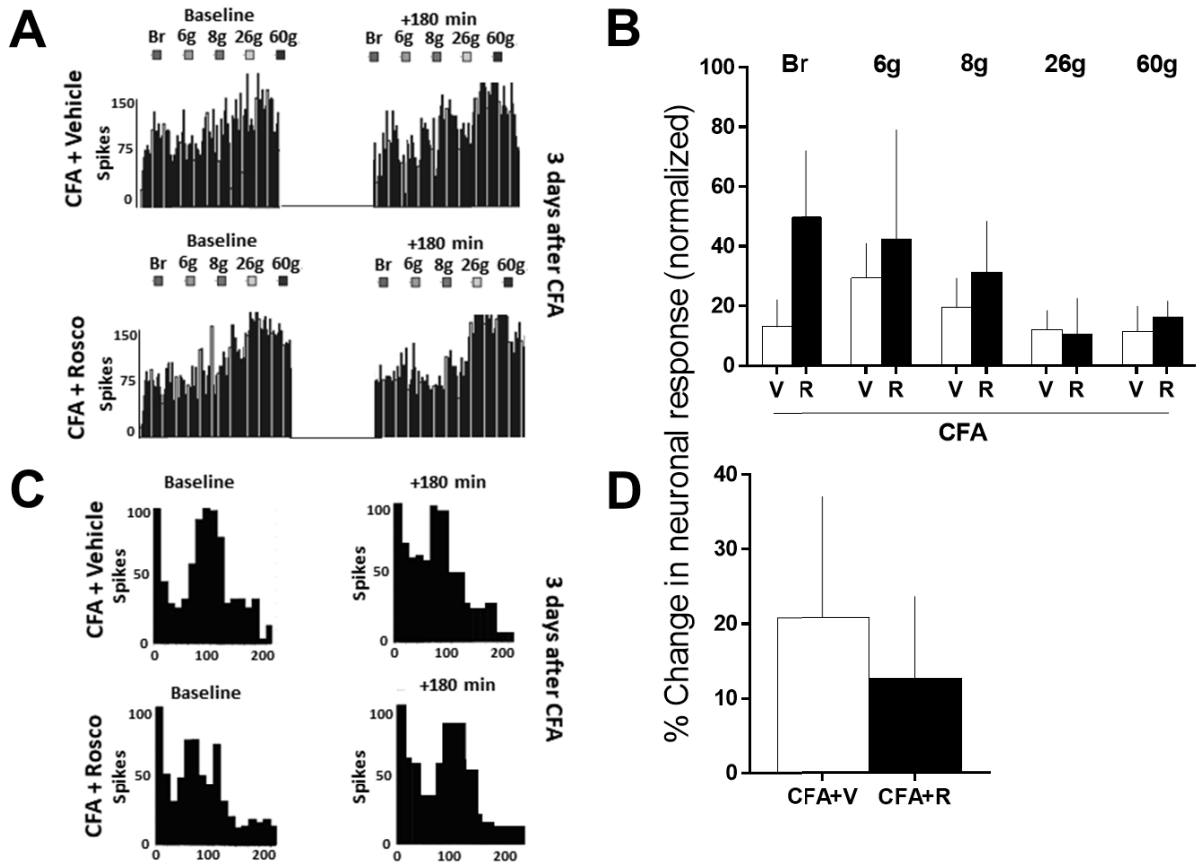


Figure 12

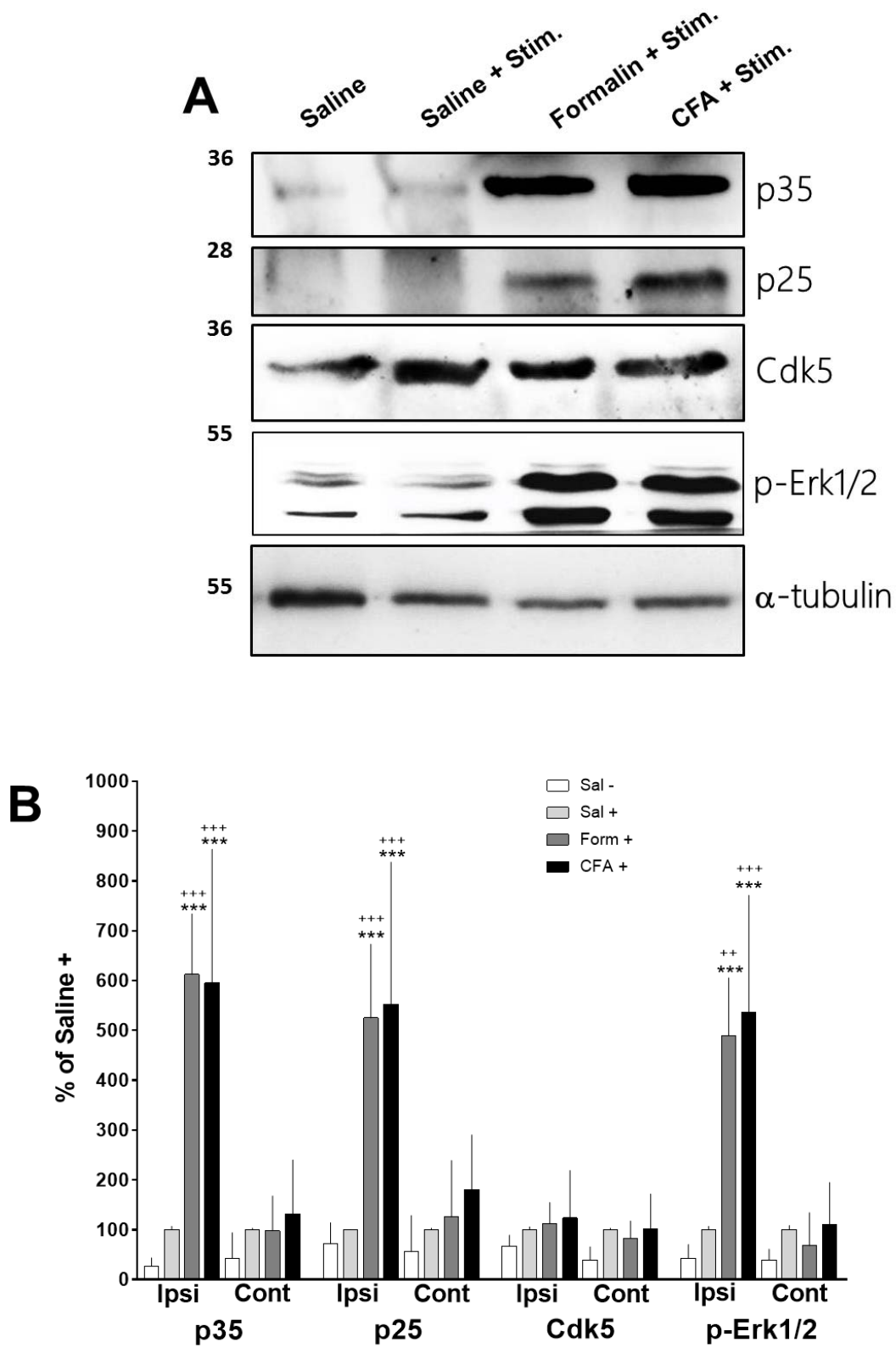




Figure 13

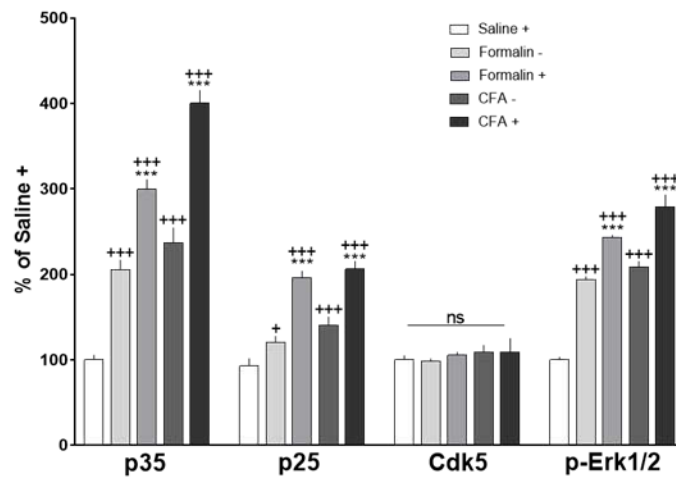
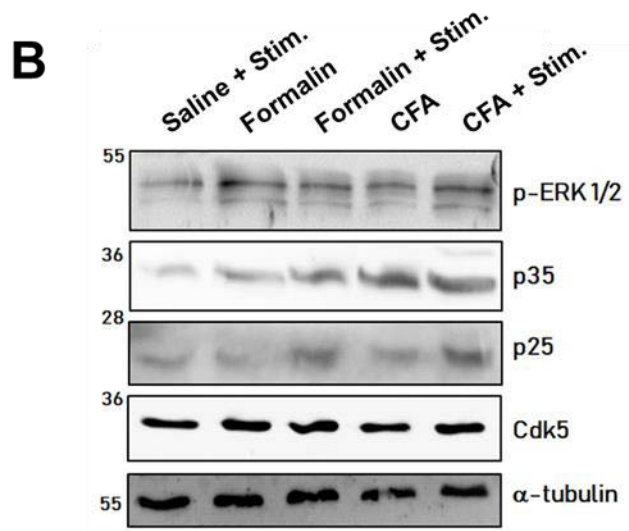
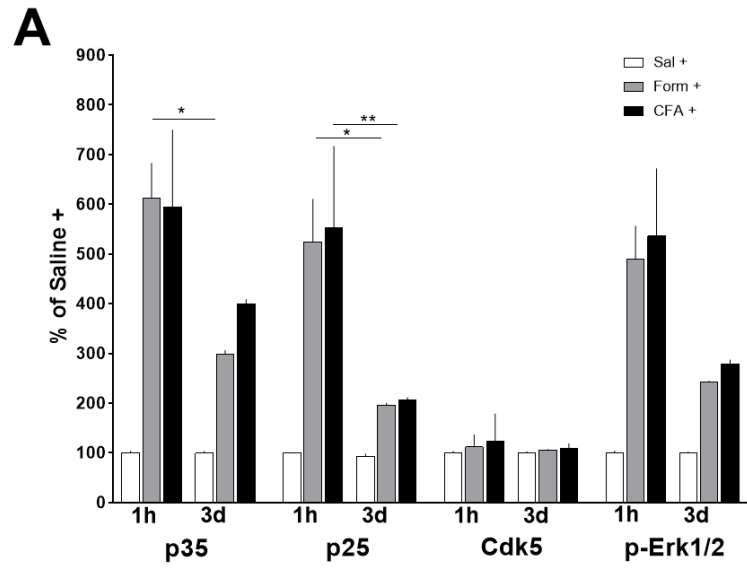


Figure 14

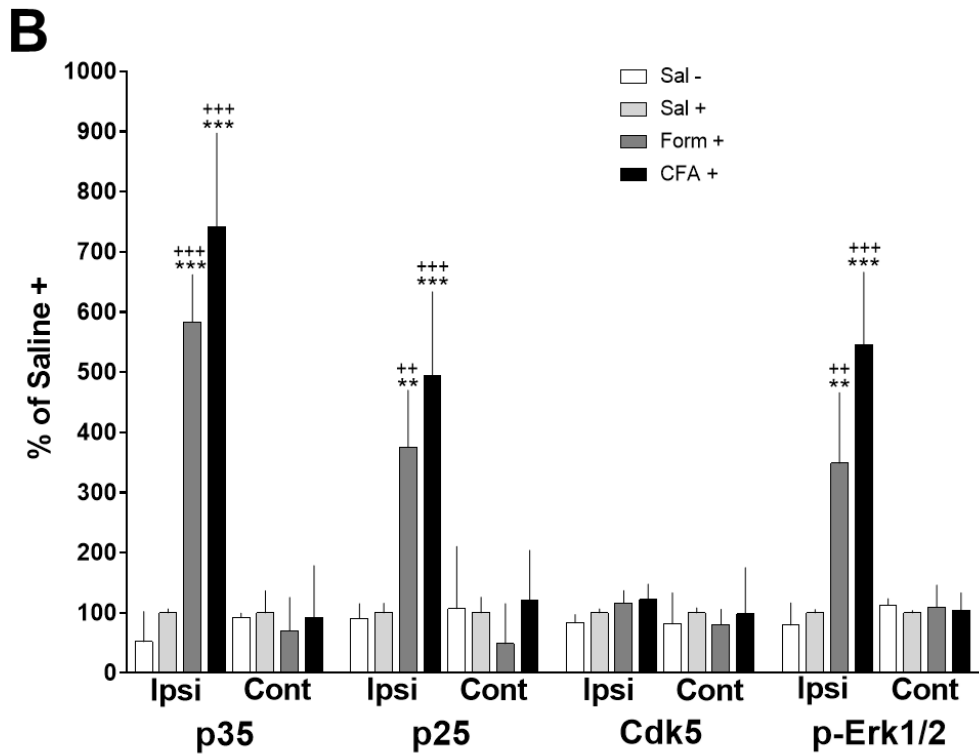
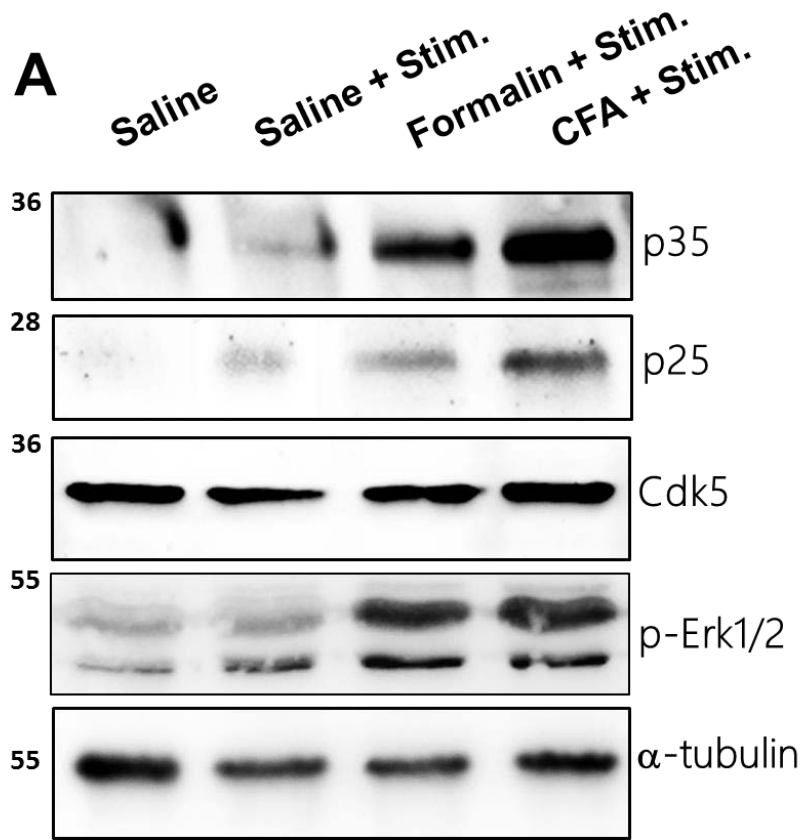


Figure 15

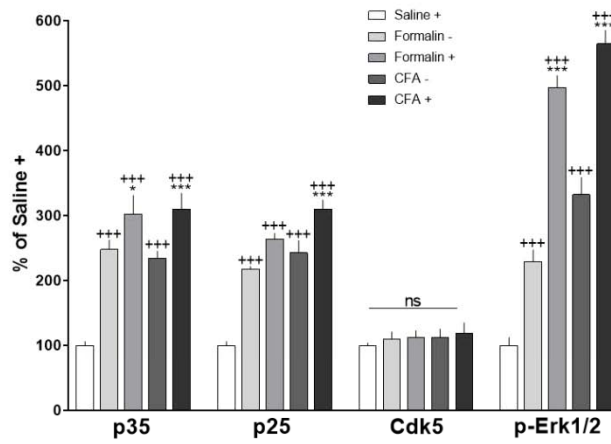
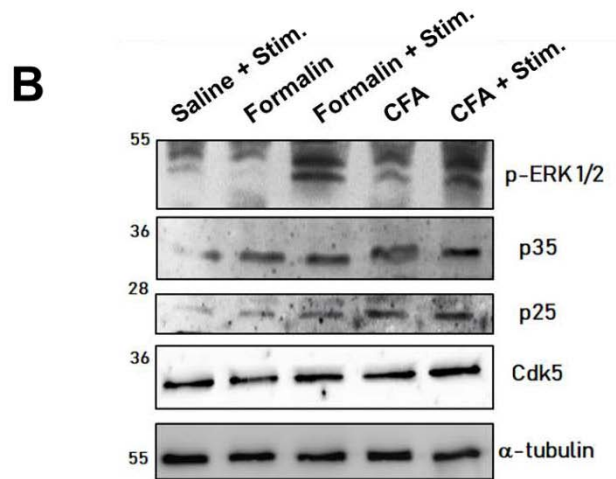
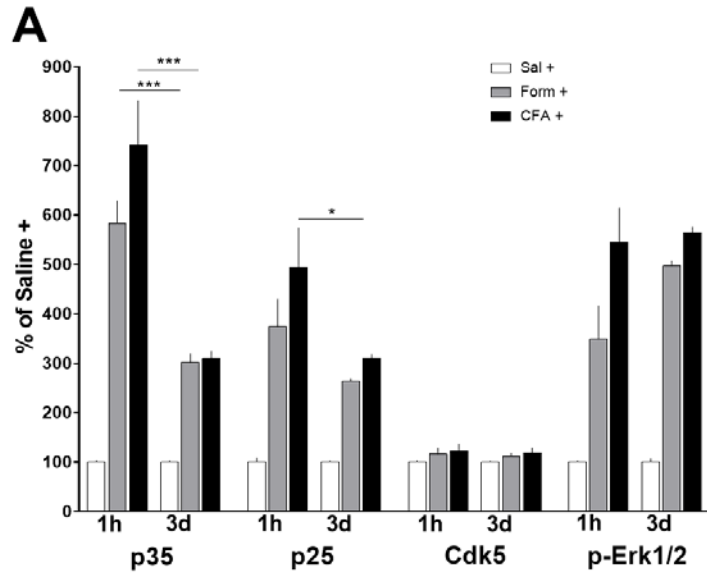


Figure 16

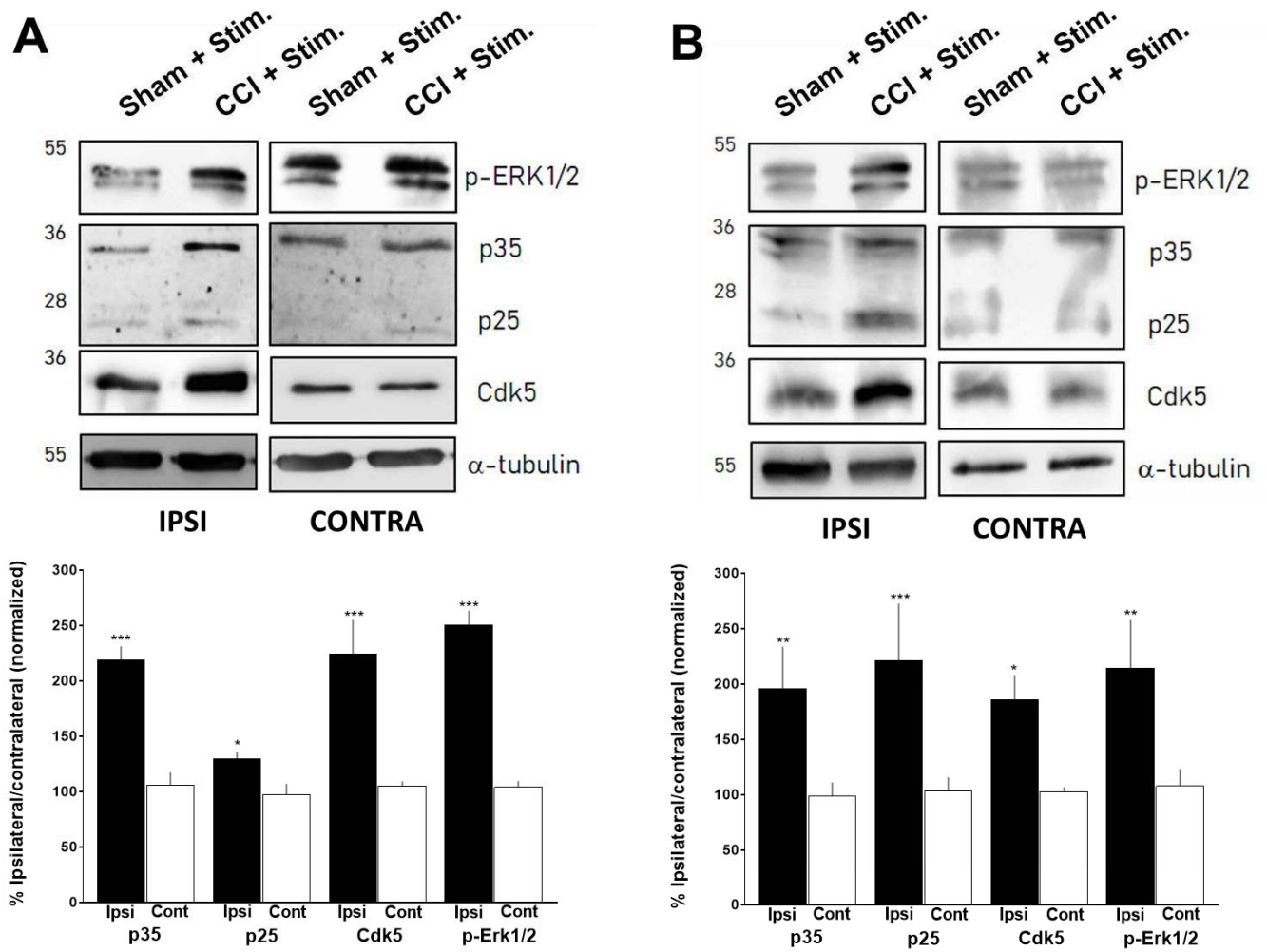


Figure 17

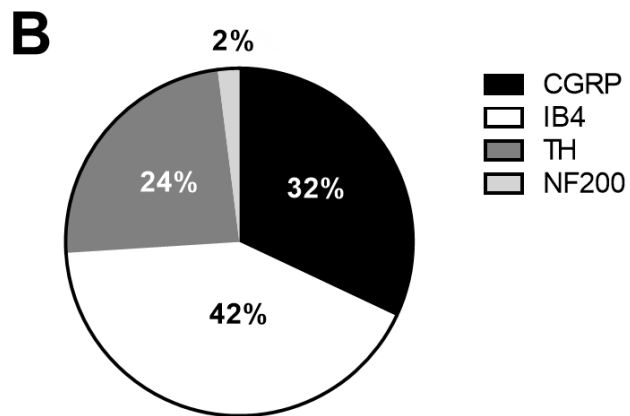
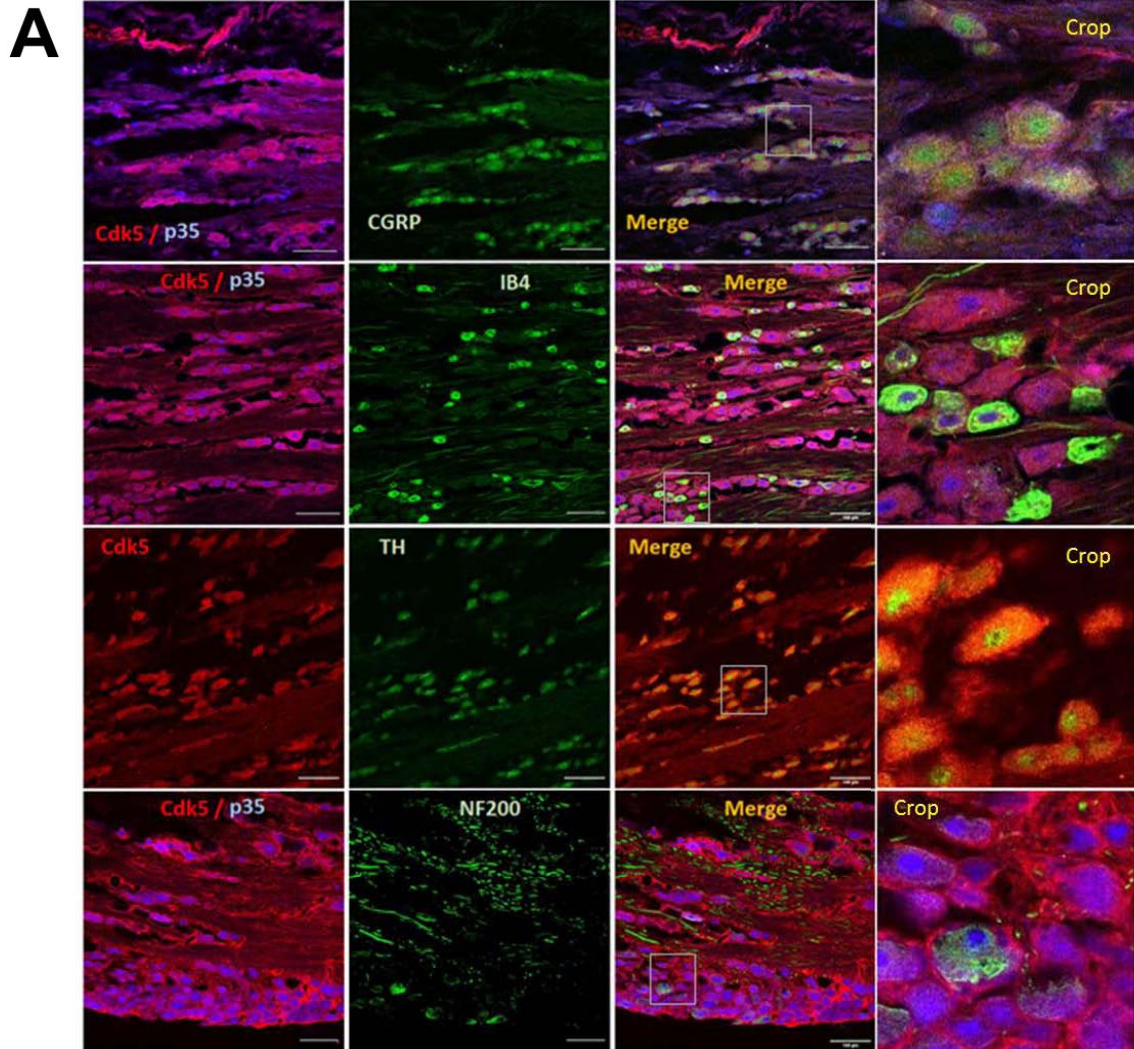
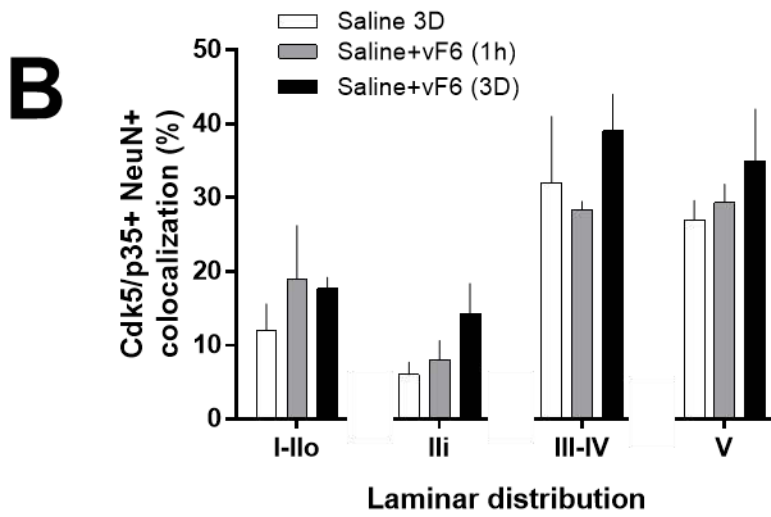
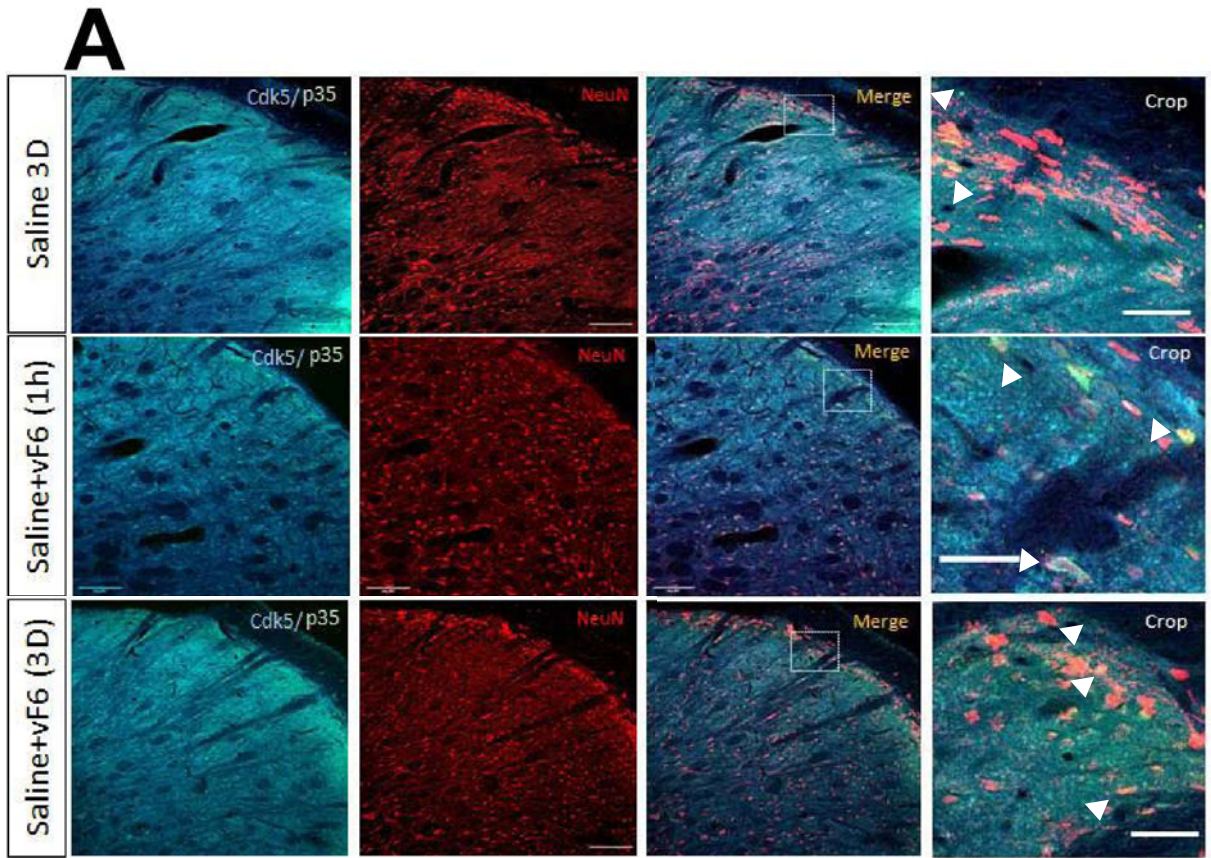


Figure 18



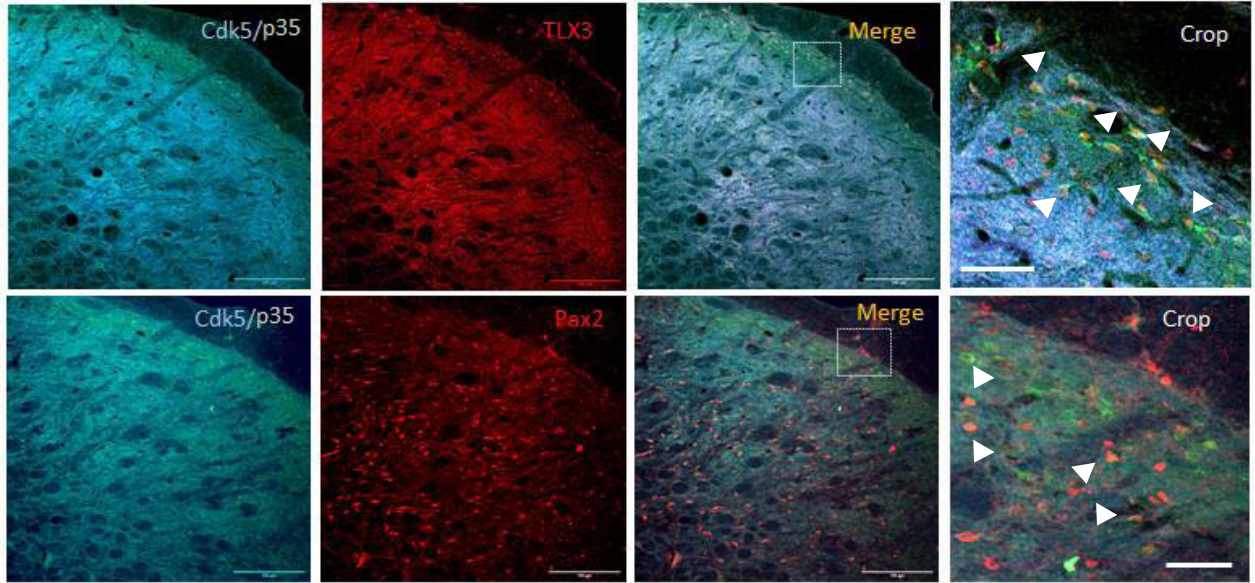
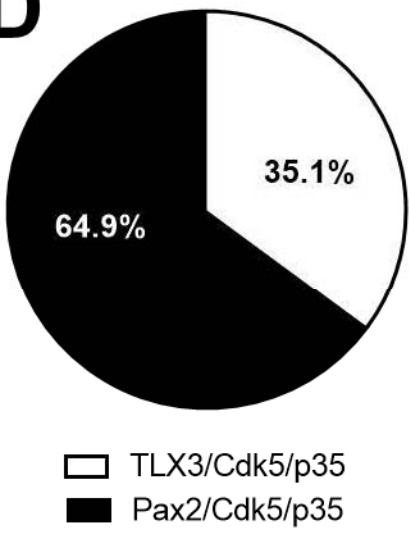
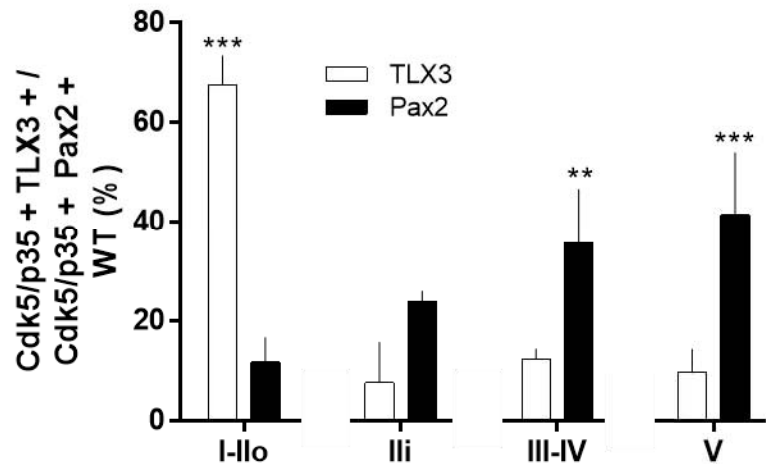
**C****D****E**

Figure 19

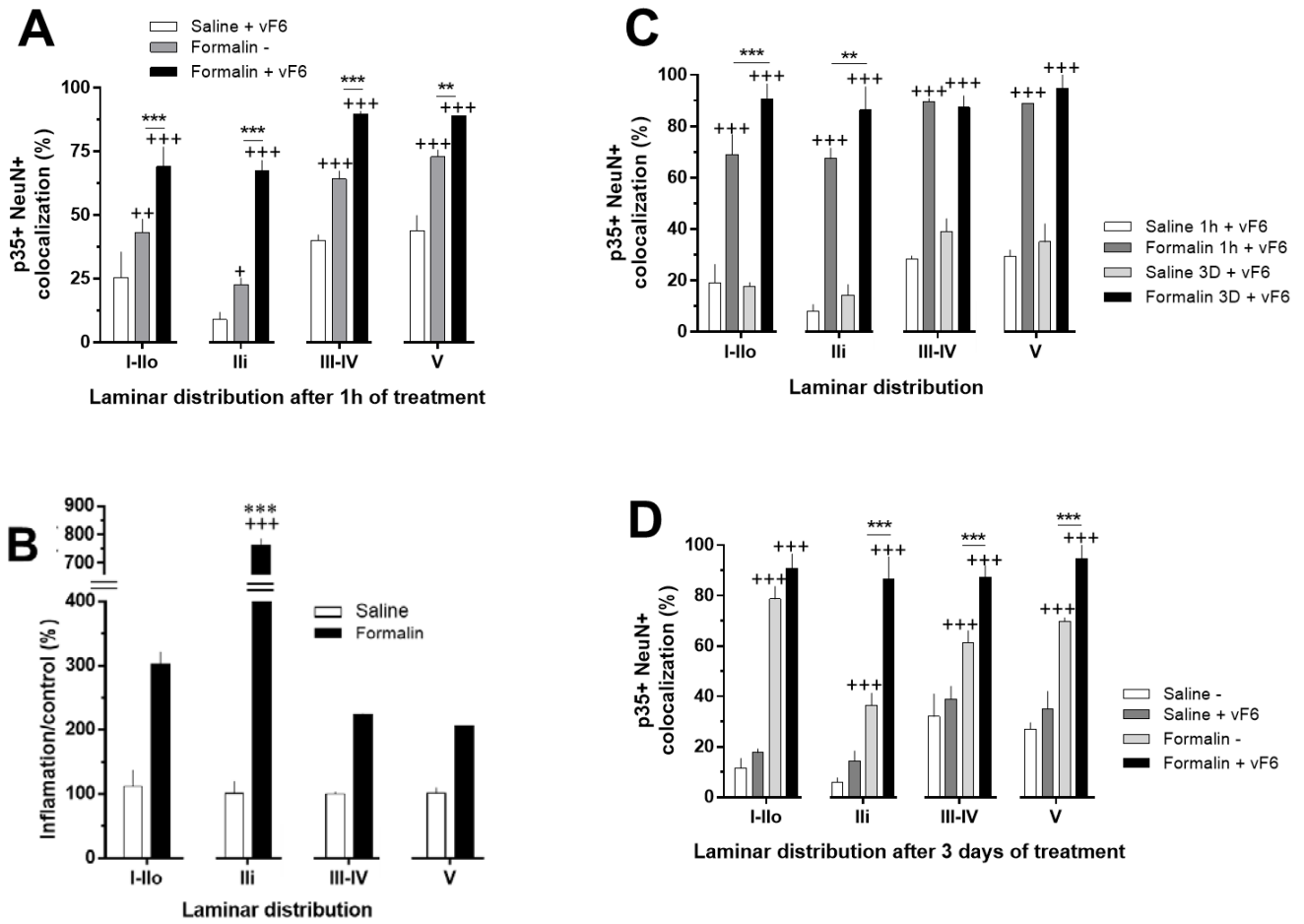
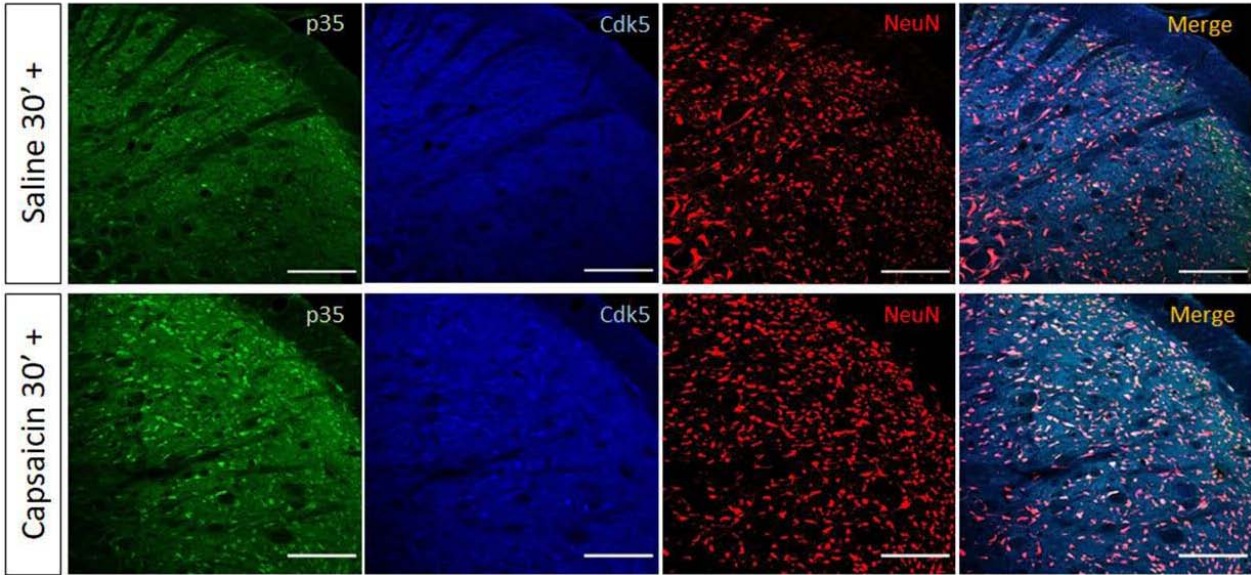


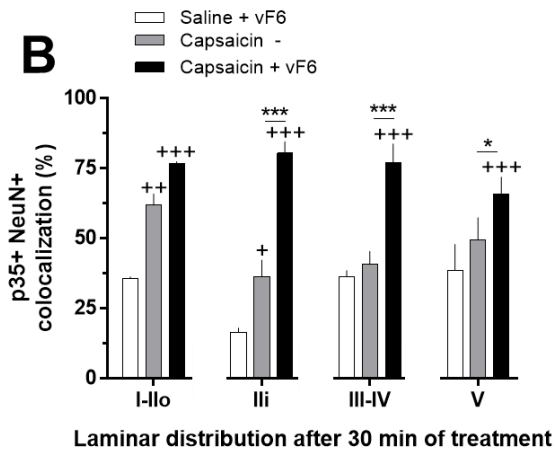


Figure 20

**A**



**B**



**C**

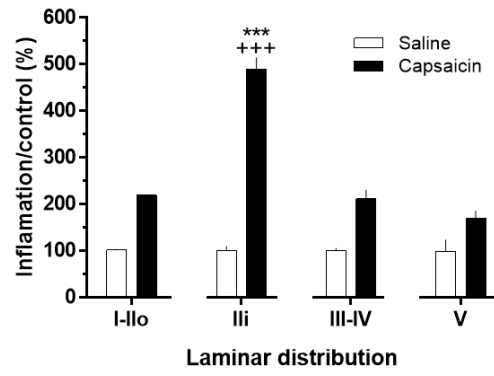
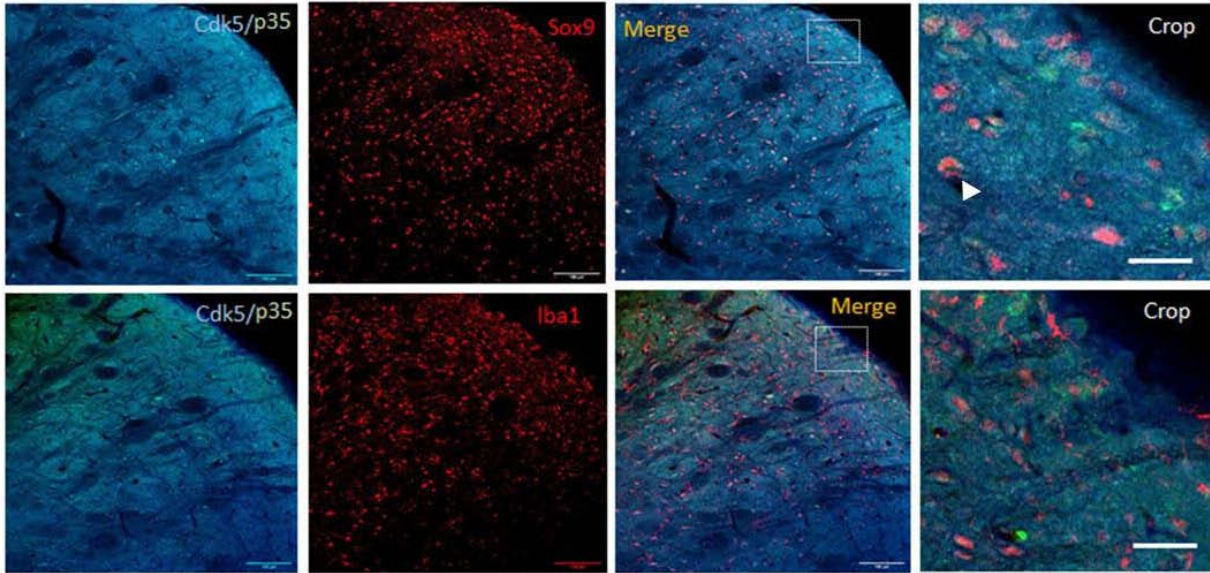
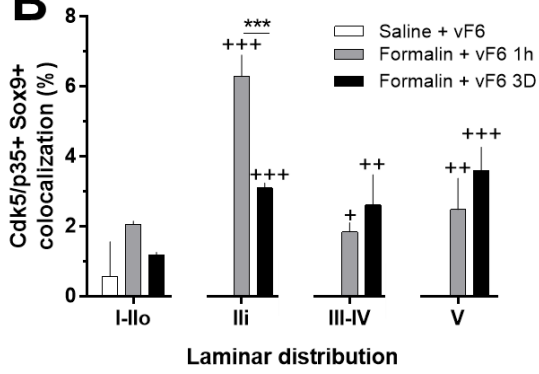


Figure 21

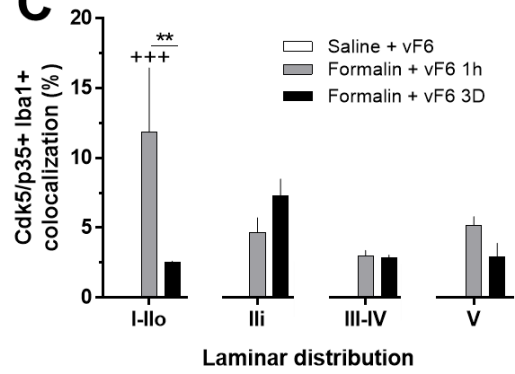
A



B



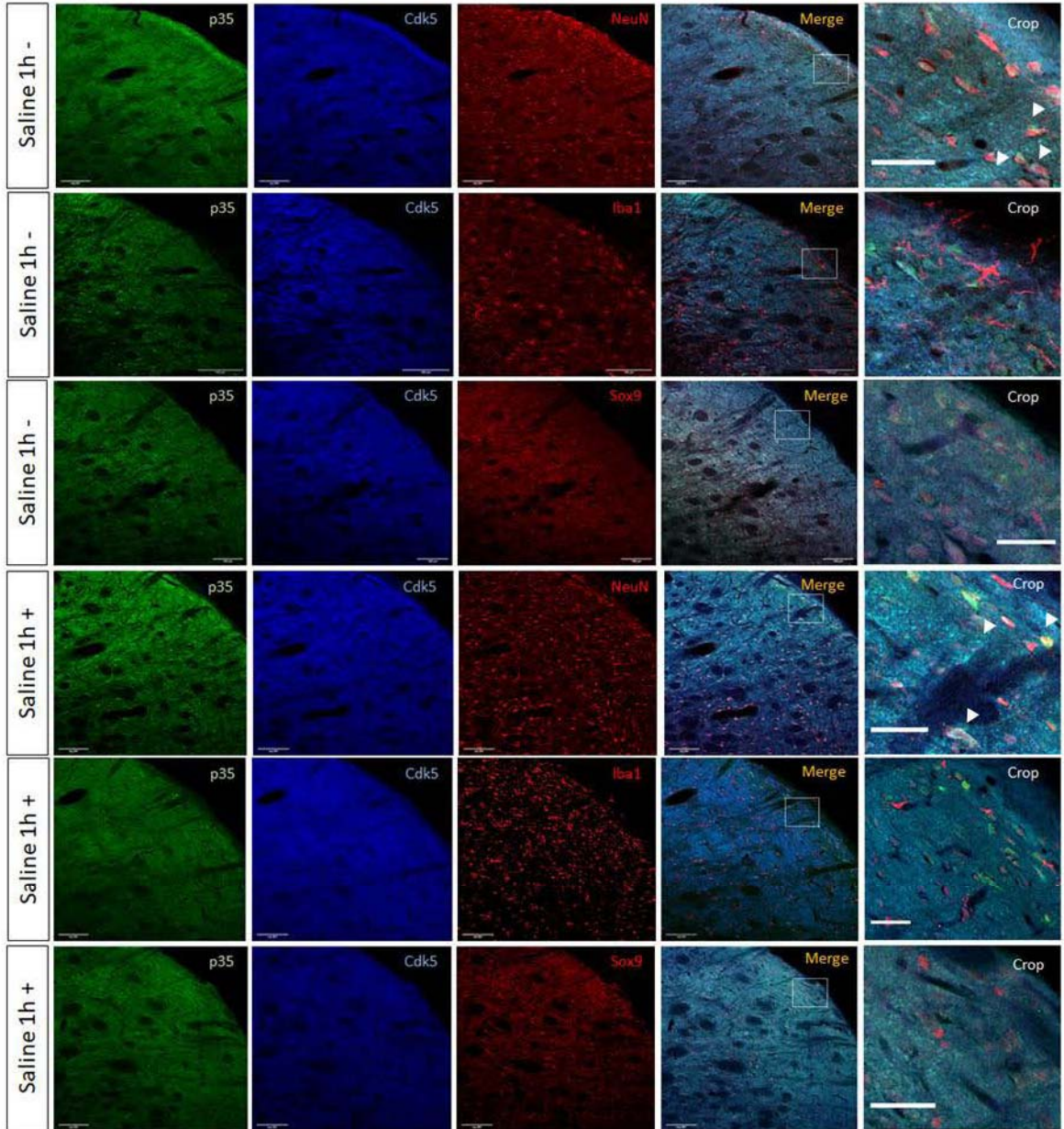
C

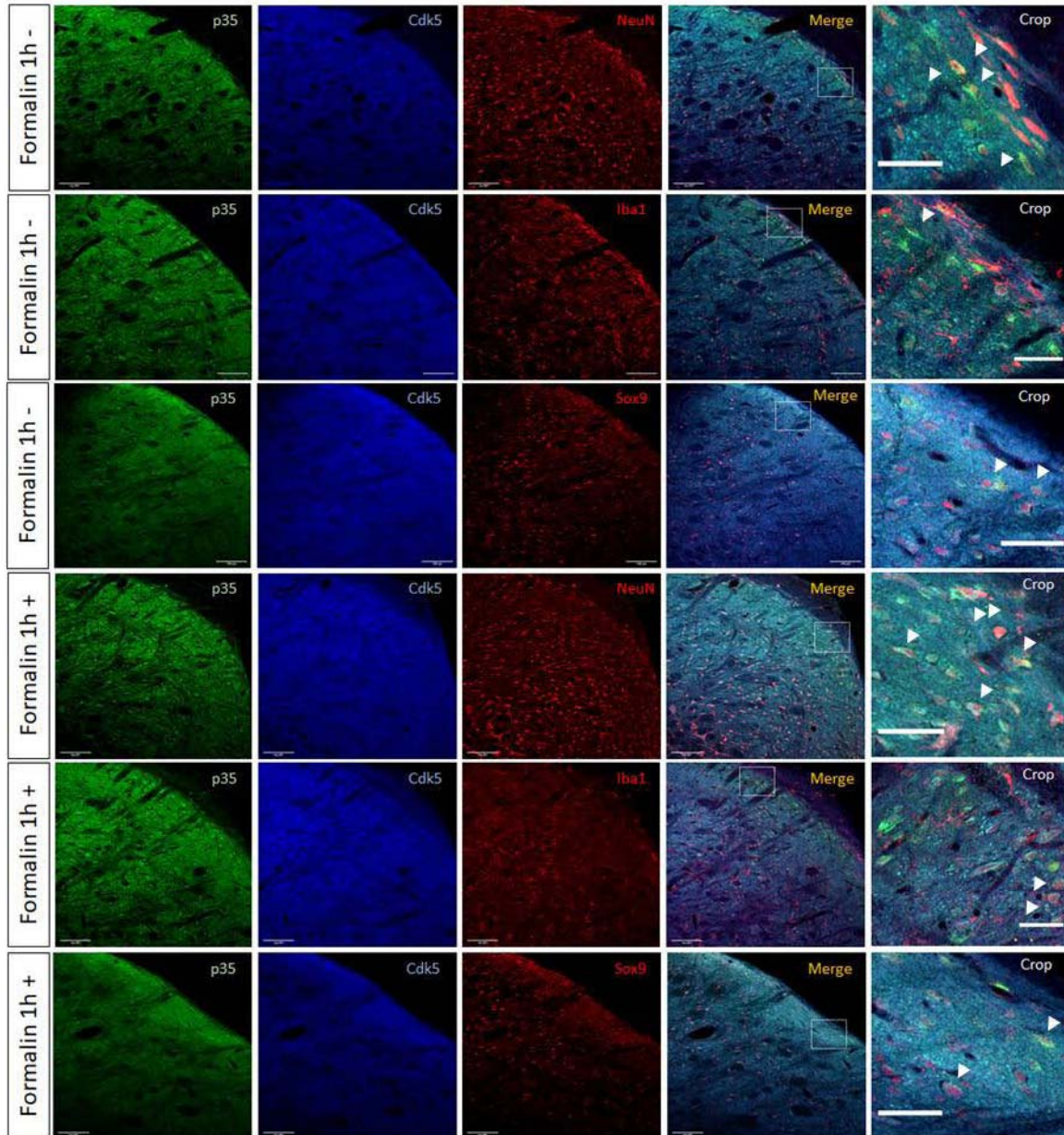


# Supplementary Figure 1

## A

### Saline (1h)

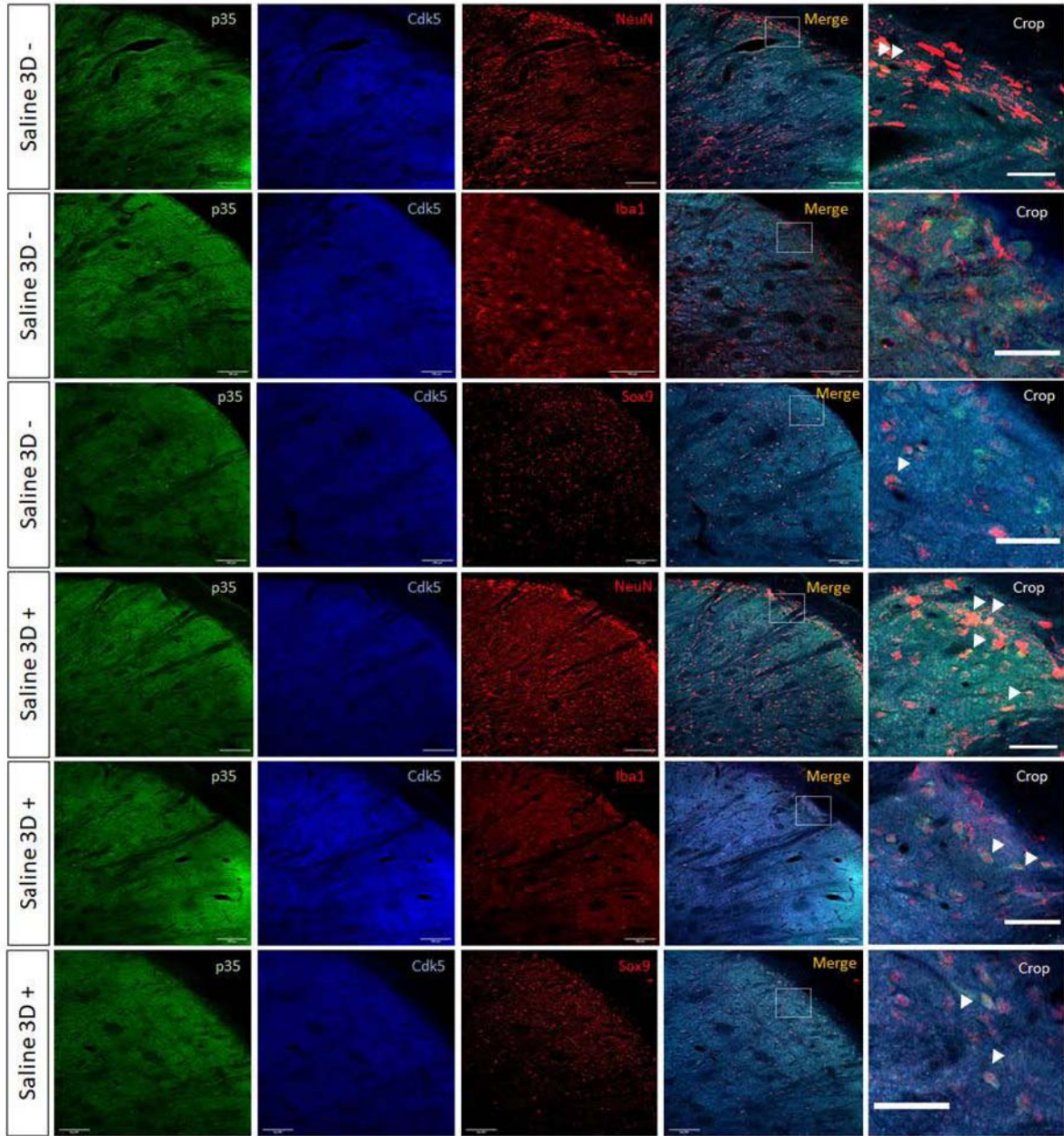


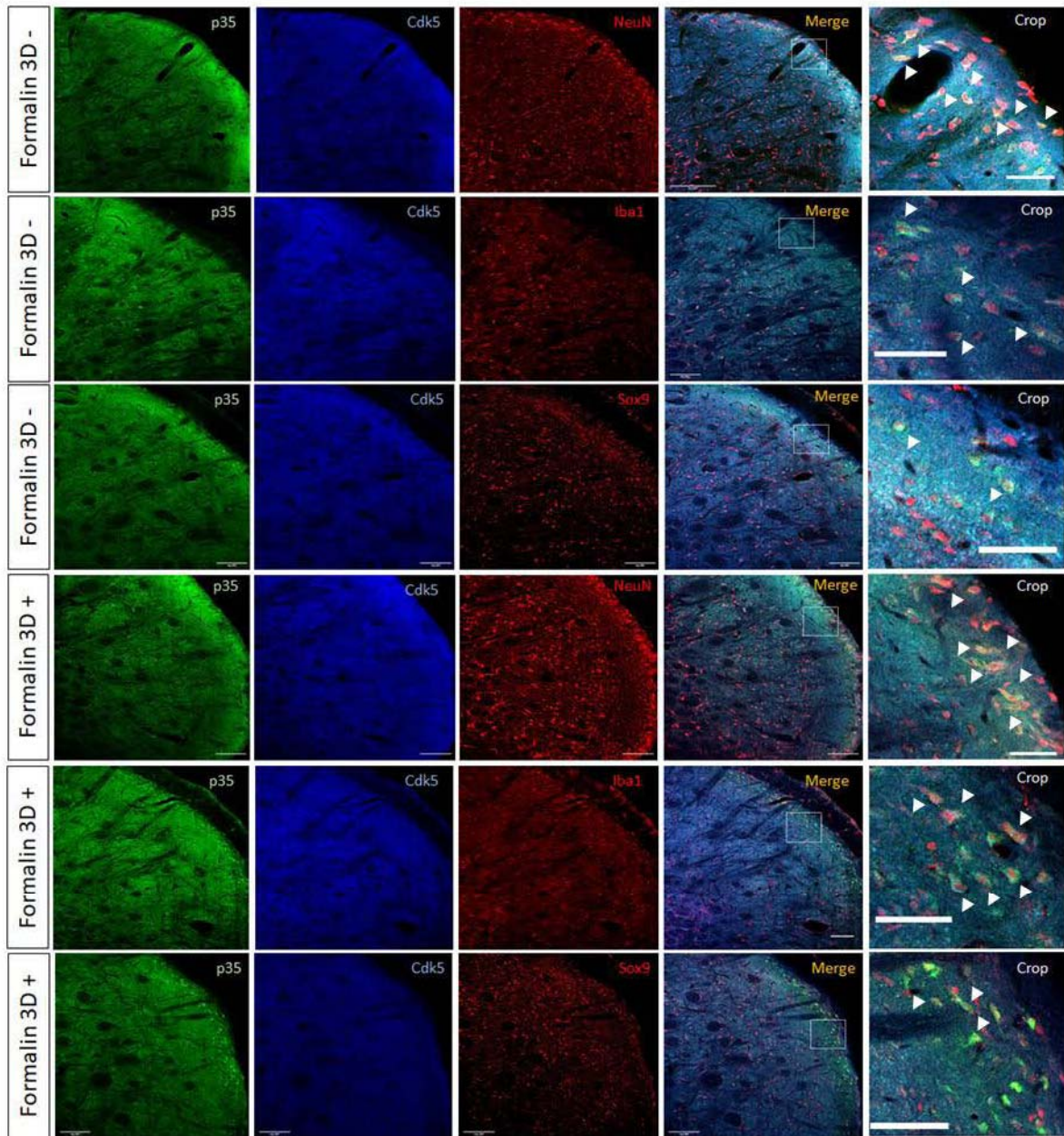
**B****Formalin (1h)**

Supplementary Figure 2

**A**

**Saline (3 days)**



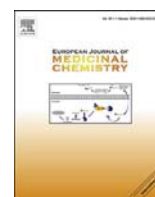
**B****Formalin (3 days)**



## **ARTICLE 2**







## Research paper

## Pyridin-2(1H)one derivatives: A possible new class of therapeutics for mechanical allodynia



Alexia Visseq<sup>a</sup>, Amélie Descheemaeker<sup>b</sup>, Nicolas Pinto-Pardo<sup>b</sup>, Lionel Nauton<sup>a</sup>, Vincent Théry<sup>a</sup>, Francis Giraud<sup>a</sup>, Isabelle Abrunhosa-Thomas<sup>a, \*\*</sup>, Alain Artola<sup>b</sup>, Fabrice Anizon<sup>a, \*</sup>, Radhouane Dallel<sup>b, c, \*\*\*</sup>, Pascale Moreau<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Université Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clermont, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, F-63000, Clermont-Ferrand, France

<sup>b</sup> Université Clermont Auvergne, Inserm, Neuro-Dol, F-63000, Clermont-Ferrand, France

<sup>c</sup> Centre Hospitalier Universitaire Clermont-Ferrand, Service D'Odontologie, F-63000, Clermont-Ferrand, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 24 October 2019

Received in revised form

20 November 2019

Accepted 25 November 2019

Available online 26 November 2019

## Keywords:

Mechanical allodynia

Pyridin-2(1H)-ones

p38 MAPK

## ABSTRACT

Mechanical Allodynia (MA), a frequent chronic pain symptom caused by innocuous stimuli, constitutes an unmet medical need, as treatments using analgesics available today are not always effective and can be associated with important side-effects. A series of 3,5-disubstituted pyridin-2(1H)-ones was designed, synthesized and evaluated *in vivo* toward a rat model of inflammatory MA. We found that the series rapidly and strongly prevented the development of MA. 3-(2-Bromophenyl)-5-(phenylamino)pyridin-2(1H)-one **69**, the most active compound of the series, was also able to quickly reverse neuropathic MA in rats. Next, when **69** was evaluated toward a panel of 50 protein kinases (PK) in order to identify its potential biological target(s), we found that **69** is a p38 $\alpha$  MAPK inhibitor, a PK known to contribute to pain hypersensitivity in animal models. 3,5-Disubstituted pyridin-2(1H)-ones thus could represent a novel class of analgesic for the treatment of MA.

© 2019 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

Chronic pain is a worldwide major health, social and economic problem. It has an important impact on quality of life across all ages, and is the most common reason for seeking medical care [1–5]. Global economic impact of pain is tremendous. Estimates show that chronic pain affects more than 20% of Europeans and costs several hundred billion each year in medical treatment and loss of productivity, with an expected increase due to population ageing.

Despite significant investments in research and development to study pain mechanisms and discover new treatments, most of the analgesics available today are still based on old drug classes: nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), acetaminophen,

opioids, anticonvulsants or antidepressants [6,7]. Moreover, these therapies have strong side-effects or abuse potentials, and are not always effective. Whereas most currently available treatments can alleviate inflammatory pain (initiated by tissue damage/inflammation), they are only partially effective for neuropathic pain (caused by nervous system lesion) [7]. Thus, chronic pain still constitutes an unmet medical need with a strong demand of the market for new efficient treatments.

Chronic pain syndromes, whether inflammatory or neuropathic, are characterized by persistent pain hypersensitivity such as spontaneous pain, hyperalgesia and allodynia. It is now well established that each of these pain symptoms relies on different cellular and molecular mechanisms. Thus a drug against spontaneous pain will not necessarily have an effect on allodynia and *vice versa*. Therefore, it is pivotal to discover drugs that specifically target the fundamental mechanisms causing the various pain symptoms.

Mechanical allodynia (MA), or touch-evoked pain, is one of the most prevalent pain symptoms, being present in almost half of neuropathic patients [8,9]. It was recently shown that it is associated with the activation, in the spinal dorsal horn (SDH) or medullary dorsal horn (MDH) (SDH trigeminal homologue in the

\* Corresponding author. Université Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clermont, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, F-63000, Clermont-Ferrand, France.

\*\* Corresponding author. Université Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clermont, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, F-63000, Clermont-Ferrand, France.

\*\*\* Corresponding author. Université Clermont Auvergne, Inserm, Neuro-Dol, F-63000, Clermont-Ferrand, France.

E-mail addresses: [isabelle.thomas@sigma-clermont.fr](mailto:isabelle.thomas@sigma-clermont.fr) (I. Abrunhosa-Thomas), [fabrice.anizon@uca.fr](mailto:fabrice.anizon@uca.fr) (F. Anizon), [radhouane.dallel@uca.fr](mailto:radhouane.dallel@uca.fr) (R. Dallel).

brainstem), of a polysynaptic pathway whereby tactile inputs can gain access to the pain circuitry in superficial SDH/MDH. MA thus results from a miscoding, with cells that normally transmit and respond to noxious stimuli being activated by tactile inputs.

Activation of several neuronal protein kinases (PK) within the superficial SDH/MDH, such as extracellular signal-regulated protein kinases (ERK), the  $\gamma$  isoform of protein kinase C (PKC $\gamma$ ) or p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK), was shown to contribute to pain hypersensitivity in animal models of chronic inflammatory and neuropathic pain. Thus, inhibitors of ERK phosphorylation reduce mechanical allodynia and hyperalgesia [10]. Genetic [11] or pharmacological inactivation of PKC $\gamma$  [12–15] prevents inflammatory MA whereas its activation is sufficient to produce MA [14]. Finally, inhibition of SDH/MDH p38 MAPK attenuates inflammatory [16–18] as well as neuropathic pain [18–20]. Therefore, PKs are possible cellular targets to alleviate MA.

Consequently, our goal was to design new ATP-competitive inhibitors of the catalytic domain of PKC $\gamma$  for the treatment of MA. Based on the structures of two potent PKC inhibitors, bisindolylmaleimides BIM-1 and (2-methyl-indolyl)BIM-1 [21], we envisaged the preparation of 3,5-disubstituted pyridin-2(1H)-one derivatives: the central core pyridinone nucleus features H-bond donor/acceptor atoms that could mimic maleimide (or ATP adenine) H-bond interactions with the hinge region of the targeted kinase. For the substitution of 3- and 5-positions, we considered aryl/heteroaryl(amino) groups. In order to assess the ability of this scaffold to interact the ATP-binding pocket of PKC $\gamma$ , we performed a molecular modeling study using a PKC $\gamma$  model generated by sequence homology from an X-ray crystal structure of highly homologous PKC $\beta$  available in the Protein Data Bank (PDB ID: 2IOE; no crystal structure of PKC $\gamma$  available in the PDB). Then, we used an automated docking protocol of a virtual library of 255 pyridin-2(1H)-ones. This work led us to foresee the general structure **A** depicted in Fig. 1, of a pyridin-2(1H)-one core substituted at the 3- and 5-positions by aryl/heteroaryl and phenylamino groups, respectively. This article reports the synthesis of a series of pyridin-2(1H)-one derivatives and their identification as potent anti-allodynic agents in rodent models of MA.

## 2. Results and discussion

### 2.1. Synthesis of 3,5-disubstituted pyridin-2(1H)-one derivatives

A series of 7 compounds of general structure **A** was initially prepared to work out the synthetic pathway as well as evaluate the potency of these compounds toward MA and PKC $\gamma$ . The general synthetic pathway is indicated in Scheme 1. The synthesis started from commercially available 3-bromo-5-nitropyridin-2(1H)-one **1**,

functionalized in such way that desired substituents could be easily introduced at the 3- and 5-positions. First, compound **1** was regioselectively *O*-benzylated in the presence of benzyl bromide and silver carbonate leading to pyridine **2** [22]. After reduction of the nitro group, Buchwald-Hartwig amination with iodobenzene afforded compound **4** in good yield.

From intermediate **4**, aryl and heteroaryl substituents were then introduced at the 3-position using a Suzuki cross-coupling with the boronic acids **5–11** (Scheme 1, Table 1) leading to intermediates **12–18**. Finally, cleavage of the benzyl group using BBr<sub>3</sub> yielded final compounds **19–25** (Table 1). Compounds **19–25** were substituted by different aryl/heteroaryl groups leading to a preliminary library of pyridinone derivatives showing structural diversity at the 3-position.

### 2.2. Preliminary evaluation of compounds 19–25

We first assessed the *in vivo* efficacy of compounds **19–24** on the face Complete Freund's Adjuvant (CFA) model (Fig. 2) [26]. Compound **25** was not tested due to its insufficient solubility. After receiving a subcutaneous injection of 25  $\mu$ L of CFA (2.5 mg/kg) into the right vibrissa pad, rats develop a MA that lasts days. We found that intracisternally applied compounds prevented the development of inflammatory MA, particularly **19–21**, **23** and **24**. The most active compound was **21**, bearing a pyridin-4-yl moiety, with a rapid, strong and persistent anti-allodynic effect for the duration of the assay (90% inhibition at 120 min after CFA injection). The evaluation of this first series showed that the substituent at the 3-position of the pyridinone nucleus had an important impact on the anti-allodynic effect, and that changing its nature could lead to higher or lower activity.

Compound series (**19–25**) was also tested toward PKC $\gamma$  at 10  $\mu$ M concentration at the International Center for Kinase Profiling (ICKP, Dundee, Scotland) according to previously reported procedure [27]. Unfortunately, these compounds were not active toward this PK ( $\geq 85\%$  mean residual kinase activity at 10  $\mu$ M in duplicate assays). This indicated that the *in vivo* activity was due to an effect toward at least one other molecular target than PKC $\gamma$ , possibly another PK. However, due to the promising anti-allodynic effect of compounds **19–24**, we aimed to prepare more efficient anti-allodynic drugs in this series, before identification of the potential molecular target. Thus, new products were synthesized and then evaluated on the rat model of inflammatory MA.

### 2.3. Identification of compound 69 as a potent anti-allodynic drug

According to the results presented above, we decided to synthesize other analogues of compounds **19–24**, bearing at the 3-position diversely substituted phenyl rings or heteroaromatic moieties. Thus, using the same synthetic pathway presented in Scheme 1, intermediates **46–65** were prepared from compound **4** and debenzoylation afforded final products **66–82** in modest to good yields (Table 2). Deprotection of compounds **63–65** led to products that could not be purified (**83–85**).

The *in vivo* efficacy of all new compounds, except **73** which was not soluble enough for *in vivo* assays, was evaluated on the rat model of inflammatory MA (Fig. 2). We found that all the new compounds had an anti-allodynic activity. Interestingly, four 3,5-disubstituted pyridin-2(1H)-ones (**67**, **69**, **70** and **77**) were either as potent or even more effective than compound **21**. The most active pyridinones were **67** and **69** (Fig. 2), bearing at the 3-position an indol-4-yl or a 2-bromophenyl substituent, respectively. In this model of inflammatory MA, static MA was suppressed in compound **69** treated rats, in comparison to animals treated with vehicle (Fig. 3A). The results showed that the 3-position of the pyridinone

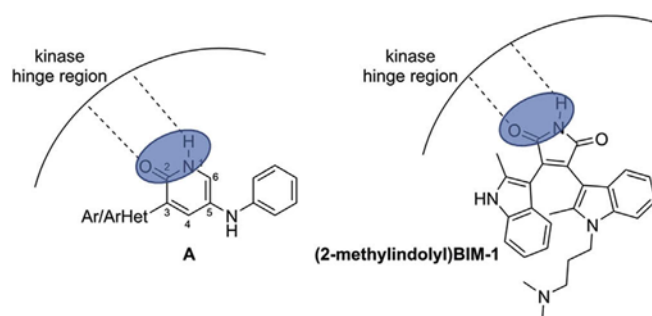
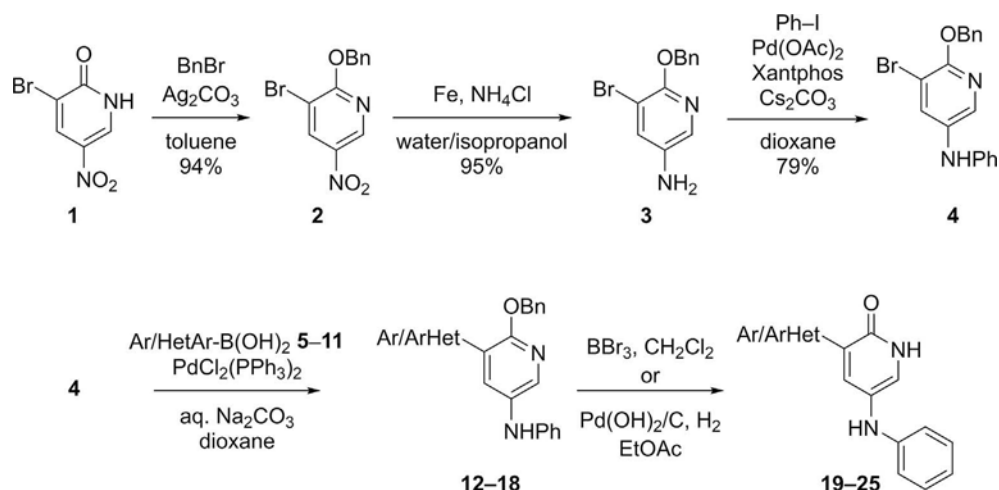


Fig. 1. Comparison between the general structure **A** of 3,5-disubstituted pyridin-2(1H)-one derivatives and structure of (2-methylindolyl)BIM-1. Hydrogen bonds with the protein kinase hinge region are represented by dashed lines.



Scheme 1. Synthesis of compounds 2–4 and 12–25.

Table 1

Isolated yields for compounds 12–25.

Boronic acids <sup>a</sup>		Products 12–18			Products 19–25		
Cpd	Ar/HetAr	Cpd	Ar/HetAr	% yield	Cpd	Ar/HetAr	% yield
5	Phenyl	12	Phenyl	94	19	Phenyl	90
6	4-Fluorophenyl	13	4-Fluorophenyl	95	20	4-Fluorophenyl	97
7	Pyridin-4-yl	14	Pyridin-4-yl	93	21	Pyridin-4-yl	80
8	1-TIPS-1 <i>H</i> -indol-3-yl	15	1 <i>H</i> -Indolyl-3-yl	88	22	1 <i>H</i> -Indolyl-3-yl	73
9	Quinolin-8-yl	16	Quinolin-8-yl	83	23	Quinolin-8-yl	19
10	Pyrimidin-5-yl	17	Pyrimidin-5-yl	94	24	Pyrimidin-5-yl	80
11	Isoquinolin-5-yl	18	Isoquinolin-5-yl	95	25	Isoquinolin-5-yl	44

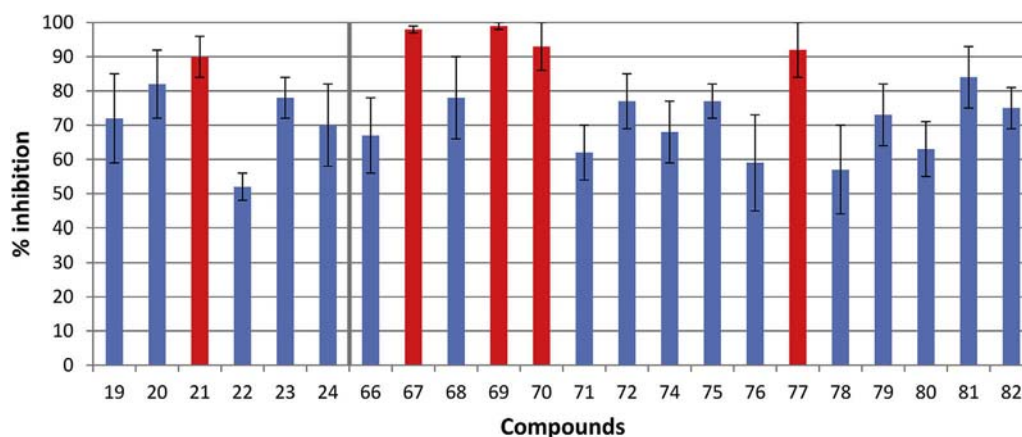
<sup>a</sup> Boronic acids were either commercially available or prepared according to literature procedures (8 [23], 9 [24], 11 [25]).

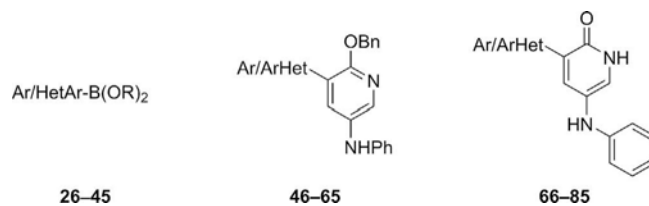
Fig. 2. Intracisternal application of compounds 19–24, 66–72 and 74–82 prevents face MA in a rat model of inflammatory pain (Complete Freund's Adjuvant (CFA),  $n = 4$ –6 rats for each compound). For this assay, compounds (5  $\mu$ L at 100  $\mu$ M) or control vehicle were intra-cisternally administered 30 min before CFA injection. Compounds 67 and 69 (0.15  $\mu$ g and 0.17  $\mu$ g, respectively) induced 98% and 99% inhibition of inflammatory MA, respectively.

moiety tolerated aryl/heteroaryl groups, including more sterically demanding groups such as indolyl group. However, the manner in which these groups are connected to the pyridinone moiety influenced the anti-allodynic activity (compare 22 and 67). In addition, compared to phenyl substituted 19, introduction of a nitrogen atom (21, bearing a pyridine-4-yl moiety) or a methyl group (77) at the 4-position led to comparable gains of activity. Similarly, substitution at the 2-position by a bromine atom (69) or an ethoxycarbonyl group (70) was favorable, with high activities similar to the one of

compound 67 bearing an 1*H*-indol-4-yl substituent.

The most effective compound (69) was also evaluated in a rat model of facial neuropathic MA produced by the constriction injury of the rat infraorbital nerve (Fig. 3B) [29]. Rats develop MA within 2 weeks after constriction which then lasts for several weeks thereafter. Intracisternal administration of compounds 69 on day 14 reversed MA. The effect was fast (Fig. 3B), confirming the potential of this compound series in neuropathic pain management.

**Table 2**  
Structure and isolated yields of compounds 46–85.



Boronic acids/boronate <sup>a,b</sup>		Products 46–65			Products 66–85		
Cpd	Ar/HetAr	Cpd	Ar/HetAr	% yield	Cpd	Ar/HetAr	% yield
26	Quinolin-4-yl	46	Quinolin-4-yl	90	66	Quinolin-4-yl	69
27	1 <i>H</i> -Indol-4-yl <sup>b</sup>	47	1 <i>H</i> -Indol-4-yl	quant.	67	1 <i>H</i> -Indol-4-yl	67
28	2-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	48	2-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	85	68	2-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	50
29	2-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	49	2-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	— <sup>c</sup>	69	2-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	18 <sup>d</sup>
30	2-(CO <sub>2</sub> Et)C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	50	2-(CO <sub>2</sub> Et)C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	75	70	2-(CO <sub>2</sub> Et)C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	78
31	2-CNC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	51	2-CNC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	— <sup>c</sup>	71	2-(CONH <sub>2</sub> )C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	32 <sup>d</sup>
32	2-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	52	2-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	37	72	2-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	89
33	(1,1'-biphenyl)-4-yl	53	(1,1'-biphenyl)-4-yl	91	73	(1,1'-biphenyl)-4-yl	80
34	3-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	54	3-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	95	74	3-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	92
35	3-AcetylC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	55	3-AcetylC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	quant.	75	3-AcetylC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	70 <sup>e</sup>
36	4-HOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	56	4-HOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	75	76	4-HOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	91
37	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	57	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	86	77	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	96
38	4-CF <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	58	4-CF <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	83	78	4-CF <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	95
39	4-CF <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	59	4-CF <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	91	79	4-CF <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	91
40	4-(CO <sub>2</sub> Me)C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	60	4-(CO <sub>2</sub> Me)C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	60	80	4-(CO <sub>2</sub> Me)C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	90
41	4-(CONH <sub>2</sub> )C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	61	4-(CONH <sub>2</sub> )C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	— <sup>c</sup>	81	4-(CONH <sub>2</sub> )C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	74 <sup>d</sup>
42	2,4-diF-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	62	2,4-diF-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	— <sup>c</sup>	82	2,4-diF-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	62 <sup>d</sup>
43	1 <i>H</i> -Indol-7-yl	63	1 <i>H</i> -Indol-7-yl	49	83	1 <i>H</i> -Indol-7-yl	— <sup>f</sup>
44	3-NH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	64	3-NH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	96	84	3-NH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	— <sup>f</sup>
45	3-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	65	3-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	86	85	3-HOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	— <sup>f</sup>

<sup>a</sup> Boronic acids/boronates were commercially available except 43 which was prepared according to literature procedures [28].

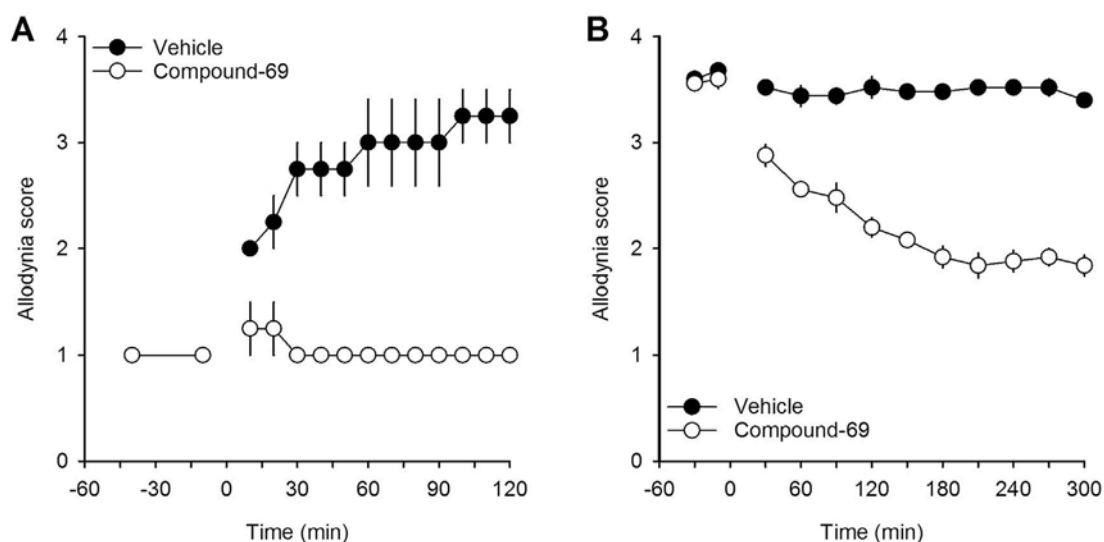
<sup>b</sup> Compound 27 was a pinacol boronate.

<sup>c</sup> Compounds could not be fully purified by column chromatography and were engaged in the next step without further purification.

<sup>d</sup> Yield over 2 steps from 4.

<sup>e</sup> Compound 55 was debenzylated using TMSI.

<sup>f</sup> Compounds could not be purified.



**Fig. 3.** Intracisternal application of compound 69 both prevents inflammatory (A) and reverses neuropathic static MA (B). Time courses of changes in behavioral responses (allodynia score) evoked by static mechanical stimuli (6-g von Frey filament) applied on the face of rats intracisternally treated with 0.17  $\mu$ g of compound 69 (5  $\mu$ L at 100  $\mu$ M) or vehicle. In A, compound 69 or vehicle was preemptively applied 30 min before subcutaneous injection of Complete Freund's Adjuvant (at time 0). In B, compound 69 or vehicle was applied (at time 0) 14 days after IoN-CCI; that is, once a stable MA was established. Static MA was completely suppressed (A) or quickly reversed (B) in compound 69-treated rats. Results are presented as mean  $\pm$  s.e.m.; n = 4 (A) and n = 5 (B) in each group. Allodynia score (from 0 to 4) according to Vos et al. [29].

#### 2.4. Compounds **69** is a selective p38 $\alpha$ MAPK inhibitor

Next, we undertook studies to identify the possible biological target(s) of the most active compound **69**. As previously indicated, the activation in neurons of PK such as PKC $\gamma$ , ERK or p38 MAPK can contribute to pain hypersensitivity. Therefore, we decided to screen compound **69** toward a panel of 50 PKs that provide a representative sampling of the human kinome (Fig. 4, Table S1) [27]. In this panel, we identified p38 $\alpha$  MAPK as the privileged target, with 19% of kinase residual activity at 10  $\mu$ M compound concentration. Compound **69** was highly selective over the other protein kinases, as none of them showed a mean residual activity <65% at the same concentration. IC<sub>50</sub> toward p38 $\alpha$  MAPK was determined and found to be in the micromolar range, with a value of  $1.5 \pm 0.7 \mu$ M (mean  $\pm$  SD).

Next, we evaluated the selectivity of compound **69** toward another panel containing all four p38 MAPK isoforms, ERK1, ERK2 as well as other protein kinases close to p38 $\alpha$  MAPK in the kinome phylogenetic tree (Fig. 5, Table S2). In addition, compound **67** that also exhibited strong anti-allodynic activity was also evaluated in this screening. The results showed that **69** was selective of p38 $\alpha$  MAPK over the other protein kinases tested in this panel, including p38 MAPK isoforms. Compound **67** exhibited the same selectivity profile. Its IC<sub>50</sub> toward p38 $\alpha$  MAPK was determined and found to be in the micromolar range with a value of  $3.0 \pm 0.1 \mu$ M (mean  $\pm$  SD).

Hence, compound **69** appears as a highly selective inhibitor of p38 $\alpha$  MAPK when considering the panel of 62 protein kinases evaluated. According to these results, besides not yet identified other biological targets, p38 $\alpha$  MAPK could be reasonably considered as a target for this series of pyridin-2(1H)-one derivatives, leading to the observed analgesia in the inflammatory and neuropathic rat models of MA.

### 3. Conclusion

In summary, we synthesized a series of pyridin-2(1H)-one derivatives in 5 steps from 3-bromo-5-nitropyridin-2(1H)-one **1**. The heterocyclic core was substituted at the 5-position by a phenyl-amino group whereas the 3-position was substituted by various aryl/heteroaryl moieties. These compounds were evaluated *in vivo* toward a rat model of inflammatory MA. We found that the series rapidly and strongly prevented the development of MA. Compound **69**, the most active of the series, was also able to quickly reverse facial neuropathic MA in rats. Next, when **69** was evaluated toward a panel of 50 protein kinases in order to identify its potential biological target(s), we found that **69** is a p38 $\alpha$  MAPK inhibitor, a PK known to contribute to pain hypersensitivity in animal models. In conclusion, 3,5-disubstituted pyridin-2(1H)-ones thus could represent a novel class of analgesic for the treatment of MA.

### 4. Experimental section

#### 4.1. Chemistry

##### 4.1.1. General

Starting materials were obtained from commercial suppliers and used without further purification. IR spectra were recorded on a PerkinElmer Spectrum 65 FT-IR spectrometer ( $\bar{\nu}$  in  $\text{cm}^{-1}$ ). NMR spectra, performed on a Bruker AVANCE 400 III HD (<sup>1</sup>H: 400 MHz, <sup>13</sup>C: 101 MHz) are reported in ppm using the solvent residual peak as an internal standard; the following abbreviations are used: singlet (s), doublet (d), triplet (t), quadruplet (q), doublet of doublets (dd), doublet of doublet of doublets (ddd), doublet of triplets (dt), triplet of doublets (td), triplet of triplets (tt), multiplet (m), broad signal (br s). Coupling constants are expressed in Hertz.

Experiments under microwave irradiation were performed using a CEM Discover Benchmate apparatus. High resolution mass spectra were determined on a high-resolution Waters Micro Q-ToF or Thermo Scientific Q Exactive Q-Orbitrap apparatus (UCA PARTNER, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France). Chromatographic purifications were performed by column chromatography using 40–63  $\mu$ m silica gel. Reactions were monitored by TLC using fluorescent silica gel plates (60 F254 from Macherey Nagel). Melting points were measured on a Stuart SMP3 apparatus and are uncorrected.

The purity of compounds **19–25** and **66–82** was established by HPLC analysis using a Agilent infinity 1260 chromatograph with DAD detector and an Agilent Zorbax SB-Phenyl column (4.6 mm  $\times$  150 mm, 3.5  $\mu$ m). Flow rate was 0.8 mL/min and the analysis was performed at 25 °C. Detection wavelength is indicated for each compound. Solvents were (A) water/0.1% formic acid, (B) Acetonitrile. Gradient was 100:0 A/B to 30:70 A/B in 8 min and then 30:70 A/B for 3 min.

##### 4.1.2. 2-(Benzyloxy)-3-bromo-5-nitropyridine (**2**)

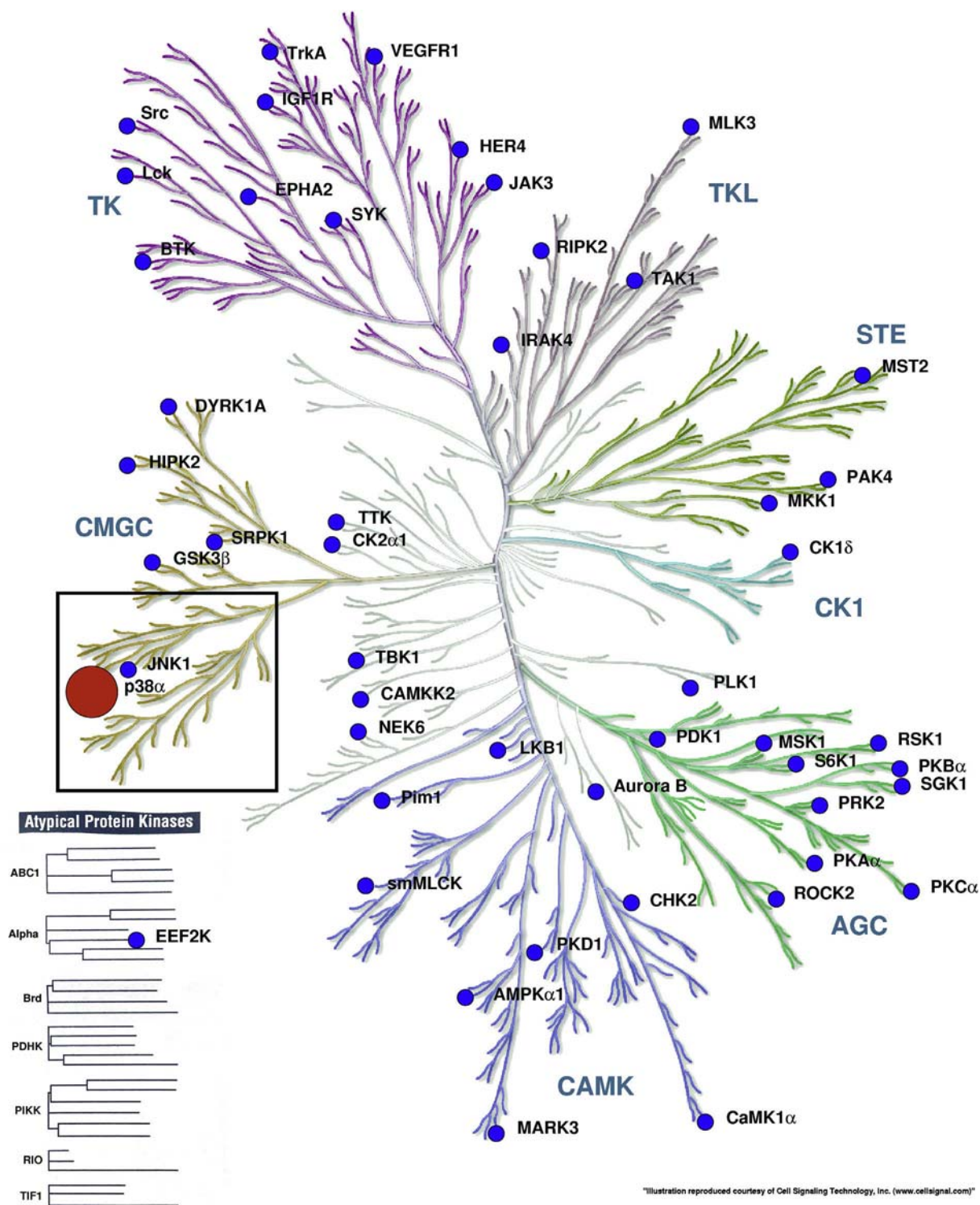
To a solution under argon of crushed 3-bromo-5-nitropyridin-2(1H)-one **1** (1.90 g, 8.68 mmol, 1 eq.) in anhydrous toluene (26 mL), benzyl bromide (2.2 mL, 18.5 mmol, 2.1 eq.) was added. The mixture was stirred at room temperature for 5 min. Then, the mixture was stirred at 70 °C and crushed Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was added in three portions of 0.35 eq. every hour (3  $\times$  840 mg, 3  $\times$  3.05 mmol, 3  $\times$  0.35 eq.). After 3 h 30 min at 70 °C, the mixture was filtered through a pad of Celite and washed with ethyl acetate. The obtained yellow solid was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, cyclohexane to EtOAc/cyclohexane 95:5) to give the desired product **2** with a residual impurity which was eliminated by washing with cyclohexane, to give **2** (2.51 g, 8.12 mmol, 94%) as a white solid. *R*<sub>f</sub> = 0.40 (EtOAc/cyclohexane 2:98); Mp 128 °C; IR (ATR) 3075, 1593, 1571, 1518, 1435, 1337, 1318, 1050, 1008, 725  $\text{cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  9.10 (d, *J* = 2.5, 1H), 8.85 (d, *J* = 2.5, 1H), 7.50 (d, *J* = 7.3, 2H), 7.45–7.34 (m, 3H), 5.57 (s, 2H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  162.3 (C), 142.8 (CH), 139.6 (C), 137.1 (CH), 135.7 (C), 128.50 (2CH), 128.22 (CH), 127.9 (2CH), 106.3 (C), 69.7 (CH<sub>2</sub>); HRMS (ESI+) calcd for C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (M + H)<sup>+</sup> 308.9869, found 308.9869.

##### 4.1.3. 6-(Benzyloxy)-5-bromopyridin-3-amine (**3**)

To a solution of compound **2** (5.4 g, 17.5 mmol, 1 eq.) in a 10:1 propan-2-ol/water mixture (375 mL) were added Fe powder (5.89 g, 105 mmol, 6 eq.) and NH<sub>4</sub>Cl (380 mg, 7.10 mmol, 0.4 eq.). The mixture was refluxed for 4 h. Then, the mixture was filtered through a pad of Celite which was then washed with ethyl acetate. The filtrate was washed with water, and the aqueous phase was extracted with ethyl acetate. The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and then evaporated. The obtained orange oil was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/cyclohexane 3:7 + 0.5% NEt<sub>3</sub>) to give the desired product **3** (4.64 g, 16.6 mmol, 95%) as a brown oil which crystallized in beige solid. *R*<sub>f</sub> = 0.38 (EtOAc/cyclohexane 3:7); Mp 81 °C; IR (ATR) 3390, 3305, 3208, 1625, 1452, 1356, 1216, 1046, 982  $\text{cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  7.50 (d, *J* = 2.5, 1H), 7.42 (d, *J* = 7.4, 2H), 7.37 (t, *J* = 7.4, 2H), 7.32 (d, *J* = 2.5, 1H), 7.32–7.27 (m, 1H), 5.26 (s, 2H), 5.04 (s, 2H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  150.4 (C), 141.2 (C), 137.6 (C), 130.1 (CH), 128.3 (2CH), 128.2 (CH), 127.6 (CH), 127.4 (2CH), 105.8 (C), 67.3 (CH<sub>2</sub>); HRMS (ESI+) calcd for C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>BrN<sub>2</sub>O (M + H)<sup>+</sup> 279.0128, found 279.0124.

##### 4.1.4. 6-(Benzyloxy)-5-bromo-N-phenylpyridin-3-amine (**4**)

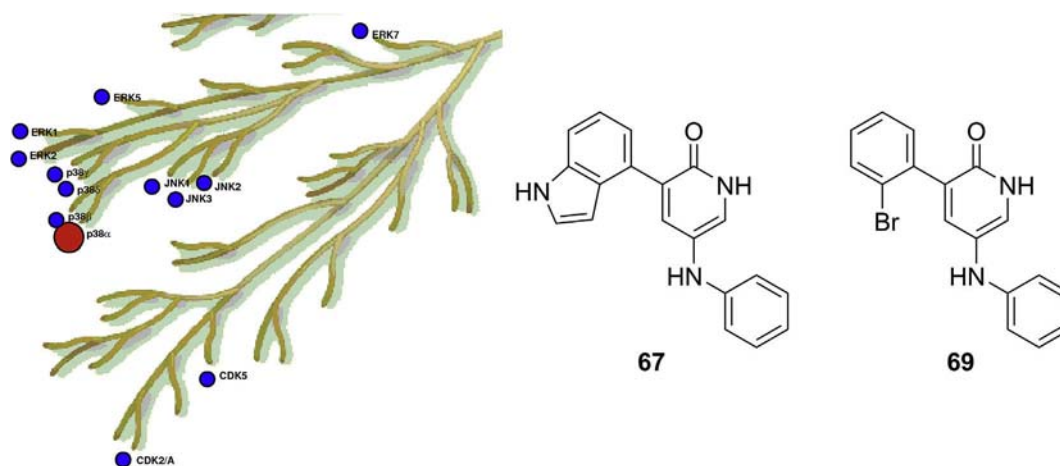
A 5 mL screw-cap tube under argon was charged with compound **3** (444 mg, 1.59 mmol, 1 eq.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (17.8 mg, 0.08 mmol, 0.05 eq.), Xantphos (46.2 mg, 0.08 mmol, 0.05 eq.) and Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>



**Fig. 4.** Compound **69** was evaluated at the International Center For Kinase Profiling (ICKP, Dundee, Scotland) toward a panel of 50 protein kinases that provide a representative sampling of the human kinome. The results were expressed as the mean percentage of residual activity at 10  $\mu$ M concentration (duplicate assays). Blue disks:  $\geq$  65%, red disk: 19%. See Table S1 for screening values. The black square indicates the kinome region containing protein kinases evaluated in a second screening (Fig. 5, Table S2). The tree was generated using the Kinome Render software, and the illustration reproduced courtesy of Cell Signaling Technology, Inc. (www.cellsignal.com) [30]. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

(1.04 g, 3.19 mmol, 2 eq.). Then, anhydrous 1,4-dioxane degassed with argon (8 mL) and iodobenzene (180  $\mu$ L, 1.61 mmol, 1 eq.) were added. The tube was sealed and the mixture was stirred at 100  $^{\circ}$ C for 4 h. The resulting suspension was filtered through a pad of Celite

which was then washed with ethyl acetate. After evaporation of the filtrate, the brown residue was purified by column chromatography ( $\text{SiO}_2$ , cyclohexane to EtOAc/cyclohexane 1:9) to give a yellow-orange oil **4** (444 mg, 1.25 mmol, 79%) which solidify into a light



**Fig. 5.** Compounds **67** and **69** were evaluated at the International Center For Kinase Profiling (ICKP, Dundee, Scotland) toward a panel of 13 protein kinases. The results were expressed as the mean percentage of residual activity at 1  $\mu\text{M}$  concentration (duplicate assays). Blue disks:  $\geq 90\%$ , red disk: 59%, for both compounds. See Table S2 for screening values. The tree was generated using the Kinome Render software, and the illustration reproduced courtesy of Cell Signaling Technology, Inc. ([www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com)) [30]. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

brown solid after some days in freezer.  $R_f = 0.31$  (EtOAc/cyclohexane 1:9); Mp 49 °C; IR (ATR) 3394, 1602, 1502, 1462, 1444, 1356, 1292, 1230, 1050, 738, 694  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.14 (s, 1H, NH), 7.97 (d,  $J = 2.5$ , 1H), 7.78 (d,  $J = 2.5$ , 1H), 7.48–7.44 (m, 2H), 7.42–7.37 (m, 2H), 7.35–7.30 (m, 1H), 7.22 (dd,  $J = 8.6$ , 7.4, 2H), 6.96 (dd,  $J = 8.6$ , 1.1, 2H), 6.82 (tt,  $J = 7.4$ , 1.1, 1H), 5.37 (s, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  153.3 (C), 143.7 (C), 137.2 (C), 135.4 (C), 135.2 (CH), 132.7 (CH), 129.4 (2CH), 128.4 (2CH), 127.8 (CH), 127.5 (2CH), 119.8 (CH), 115.7 (2CH), 106.0 (C), 67.7 (CH $_2$ ); HRMS (ESI+) calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{BrN}_2\text{O}$  (M + H) $^+$  355.0441, found 355.0440.

#### 4.1.5. General procedures for the preparation of compounds 12–18, 46–51 and 53–65

**Procedure A (conventional heating):** To a solution under argon of brominated derivative in 1,4-dioxane (0.1–0.6 mmol, 1 eq., 0.1 M) were added the boronic acid or boronic ester (1.5 eq.) and a 2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  aqueous solution (5 eq.). The mixture was degassed with argon for 10 min before the addition of  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  (0.05 eq.). The solution was refluxed overnight. Ethyl acetate was added and the resulting mixture was washed with water. The organic phase was dried over  $\text{MgSO}_4$  and filtered. After evaporation under reduced pressure, the crude was purified by column chromatography.

**Procedure B (microwave irradiation):** A 10 mL microwave tube under argon was charged with brominated derivative (0.2–0.4 mmol, 1 eq.), 1,4-dioxane (0.1 M), boronic acid or boronic ester (1.5 eq.) and a 2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  aqueous solution (5 eq.) were added. The solution was degassed with argon for 10 min before the addition of  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  (0.05 eq.). The tube was sealed and the mixture was irradiated for 1 h (Discover mode, Dynamic control type,  $P_{\text{max}} = 75$  W,  $T = 100$  °C). The mixture was then filtered through a pad of Celite which was then washed with ethyl acetate. The organic phase was washed with water and then dried over  $\text{MgSO}_4$  and filtered. After evaporation under reduced pressure, the crude was purified by column chromatography.

#### 4.1.6. General procedure for the preparation of compounds 19–21, 23–25, 66–74 and 76–82

**Procedure C:** To a solution under argon and cooled to 0 °C of benzylated compound in anhydrous dichloromethane (0.1–0.5 mmol, 1 eq., 0.02 M) was added dropwise a 1 M  $\text{BBr}_3$  solution in dichloromethane (4 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was then quenched by

addition of methanol, or by addition of  $\text{NEt}_3$  and methanol when indicated. After evaporation under reduced pressure, EtOAc was added. The mixture was washed with water, dried over  $\text{MgSO}_4$ , and filtered. After evaporation under reduced pressure, the crude was purified by column chromatography.

#### 4.1.7. 6-(Benzyloxy)-N,5-diphenylpyridin-3-amine (12)

Compound **12** was prepared according to general procedure B, starting from **4** (95 mg, 0.267 mmol). The crude oil was purified by column chromatography ( $\text{SiO}_2$ , cyclohexane to EtOAc/cyclohexane 1:9) to give **12** (89 mg, 0.253 mmol, 94%).  $R_f = 0.70$  (EtOAc/cyclohexane 3:7); Mp 118 °C; IR (ATR) 3380, 1601, 1514, 1497, 1466, 1424, 1359, 1298, 1255, 1218, 1022, 753, 728, 657, 695  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.07 (s, 1H), 7.99 (d,  $J = 2.7$ , 1H), 7.62–7.59 (m, 2H), 7.53 (d,  $J = 2.8$ , 1H), 7.46–7.32 (m, 7H), 7.31–7.26 (m, 1H), 7.20 (t,  $J = 7.8$ , 2H), 6.98 (d,  $J = 8.0$ , 2H), 6.77 (t,  $J = 7.3$ , 1H), 5.37 (s, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  154.3 (C), 144.4 (C), 137.7 (C), 136.1 (C), 135.7 (CH), 134.6 (C), 130.5 (CH), 129.3 (2CH), 129.0 (2CH), 128.32 (2CH), 128.27 (2CH), 127.6 (CH), 127.5 (CH), 127.4 (2CH), 123.8 (C), 119.1 (CH), 115.2 (2CH), 67.1 (CH $_2$ ); HRMS (ESI+) calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}$  (M + H) $^+$  353.1648, found 353.1641.

#### 4.1.8. 6-(Benzyloxy)-5-(4-fluorophenyl)-N-phenylpyridin-3-amine (13)

Compound **13** was prepared according to general procedure A, starting from **4** (154 mg, 0.434 mmol) and the corresponding boronic acid. The mixture was refluxed for 18 h. The crude oil was purified by column chromatography ( $\text{SiO}_2$ , cyclohexane + 0.5%  $\text{NEt}_3$  to EtOAc/cyclohexane 1:9 + 0.5%  $\text{NEt}_3$ ) to give **13** (152 mg, 0.410 mmol, 95%) as a beige solid.  $R_f = 0.70$  (EtOAc/cyclohexane 3:7); Mp 104 °C; IR (ATR) 3383, 1599, 1500, 1438, 1223, 843, 757, 734, 697  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.07 (s, 1H), 7.99 (d,  $J = 2.7$ , 1H), 7.68–7.62 (m, 2H), 7.53 (d,  $J = 2.7$ , 1H), 7.42–7.17 (m, 9H), 6.98 (d,  $J = 7.9$ , 2H), 6.77 (t,  $J = 7.3$ , 1H), 5.37 (s, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  161.6 (d,  $J_{\text{CF}} = 245$ , C), 154.2 (C), 144.3 (C), 137.6 (C), 135.7 (CH), 134.6 (C), 132.4 (d,  $J_{\text{CF}} = 3$ , C), 131.0 (d,  $J_{\text{CF}} = 8$ , 2CH), 130.4 (CH), 129.3 (2CH), 128.3 (2CH), 127.5 (CH), 127.4 (2CH), 122.8 (C), 119.1 (CH), 115.2 (2CH), 115.1 (d,  $J_{\text{CF}} = 21.5$ , 2CH), 67.1 (CH $_2$ ); HRMS (ESI+) calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{FN}_2\text{O}$  (M + H) $^+$  371.1554, found 371.1562.



#### 4.1.9. 2-(Benzyloxy)-N-phenyl-[3,4'-bipyridin]-5-amine (**14**)

Compound **14** was prepared according to general [procedure B](#), starting from **4** (103 mg, 0.290 mmol) and the corresponding boronic acid. The mixture was irradiated for 45 min at 100 °C. The crude product was purified as above to give **14** (95.7 mg, 0.271 mmol, 93%).  $R_f = 0.30$  (EtOAc/cyclohexane 5:5); Mp 129 °C; IR (ATR) 3261, 3189, 1594, 1443, 1262, 1229, 996, 829, 748, 698  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.63–8.60 (m, 2H), 8.14 (s, 1H), 8.06 (d,  $J = 2.8$ , 1H), 7.66–7.63 (m, 3H), 7.43–7.40 (m, 2H), 7.39–7.34 (m, 2H), 7.32–7.27 (m, 1H), 7.21 (dd,  $J = 8.5$ , 7.4, 2H), 6.99 (dd,  $J = 8.6$ , 1.0, 2H), 6.79 (t,  $J = 7.3$ , 1H), 5.40 (s, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  154.2 (C), 149.6 (2CH), 144.2 (C), 143.7 (C), 137.4 (C) 137.1 (CH), 134.7 (C), 130.3 (CH), 129.4 (2CH), 128.4 (2CH), 127.6 (CH), 127.5 (2CH), 123.7 (2CH), 121.0 (C), 119.3 (CH), 115.3 (2CH), 67.3 ( $\text{CH}_2$ ); HRMS (ESI+) calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}$  ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$  354.1601, found 354.1602.

#### 4.1.10. 6-(Benzyloxy)-5-(1H-indol-3-yl)-N-phenylpyridin-3-amine (**15**)

1-(Triisopropylsilyl)-1H-indol-3-ylboronic acid was prepared from 3-bromo-1-(triisopropylsilyl)-1H-indole according to literature procedure [23]. A solution under argon of 3-bromo-1-(triisopropylsilyl)-1H-indole (500 mg, 1.42 mmol, 1 eq.) in anhydrous THF (5 mL) was cooled to –60 °C. A 2.42 M *n*-butyllithium solution in hexane (0.73 mL, 1.77 mmol, 1.25 eq.) was added dropwise. The mixture was stirred at –60 °C for 1 h. Triisopropyl borate (0.4 mL, 1.73 mmol, 1.22 eq.) was added dropwise and the mixture was stirred at –60 °C for 1 h and at room temperature for 20 h. A saturated aqueous  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution (1.5 mL) and toluene (1.5 mL) were added and the mixture was washed with water. The organic phase was dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and evaporated giving 1:1 mixture of 1-(triisopropylsilyl)-1H-indol-3-ylboronic acid and 1-(triisopropylsilyl)-1H-indole (427 mg, ratio evaluated by  $^1\text{H}$  NMR). The crude was used without purification.

Compound **15** was prepared according to general [procedure A](#), starting from **4** (47.8 mg, 0.135 mmol) and the mixture of 1-(triisopropylsilyl)-1H-indol-3-ylboronic acid and 1-(triisopropylsilyl)-1H-indole (128 mg). The reaction mixture was refluxed for 18 h. The obtained crude (170 mg) was directly engaged in the next step due to partial deprotection of the indolic part. To a solution of the crude product in THF (1 mL) was added a tetra-*n*-butylammonium fluoride solution in THF (1 M, 0.36 mL, 0.36 mmol, 2.7 eq.). The mixture was stirred for 1 h 30 min. EtOAc was added and the solution was washed with water and brine. The organic phase was dried over  $\text{MgSO}_4$  and filtered. After evaporation, the solid was purified by column chromatography ( $\text{SiO}_2$ , cyclohexane + 0.5%  $\text{NEt}_3$  to EtOAc/cyclohexane 25:75 + 0.5%  $\text{NEt}_3$ ) to give **15** (46.4 mg, 0.119 mmol, 88%) as a mauve solid.  $R_f = 0.31$  (EtOAc/cyclohexane 2:8); Mp 85 °C; IR (ATR) 3388, 3308, 1593, 1441, 1234, 1019, 740, 733, 693  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.42 (br s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.90 (d,  $J = 2.7$ , 1H), 7.84 (d,  $J = 2.7$ , 1H), 7.78–7.74 (m, 2H), 7.47 (d,  $J = 7.4$ , 2H), 7.44 (d,  $J = 8.4$ , 1H), 7.39–7.34 (m, 2H), 7.33–7.28 (m, 1H), 7.22 (t,  $J = 7.8$ , 2H), 7.14 (t,  $J = 7.4$ , 1H), 7.06 (t,  $J = 7.5$ , 1H), 7.01 (d,  $J = 7.9$ , 2H), 6.77 (t,  $J = 7.3$ , 1H), 5.42 (s, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  154.3 (C), 144.7 (C), 137.8 (C), 136.2 (C), 134.1 (C), 132.8 (CH), 129.3 (2CH), 128.8 (CH), 128.4 (2CH), 127.8 (2CH), 127.6 (CH), 126.4 (CH), 125.5 (C), 121.5 (CH), 119.6 (CH), 119.2 (CH), 118.91 (C), 118.89 (CH), 115.1 (2CH), 112.0 (CH), 109.1 (C), 67.2 ( $\text{CH}_2$ ); HRMS (ESI+) calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}$  ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$  392.1757, found 392.1765.

#### 4.1.11. 6-(Benzyloxy)-N-phenyl-5-(quinolin-8-yl)pyridin-3-amine (**16**)

Quinolin-8-ylboronic acid was prepared from 8-iodoquinoline according to literature procedure [24]. To a solution under argon of 8-iodoquinoline (434 mg, 1.70 mmol, 1 eq.) in anhydrous THF

(1.35 mL) was added *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (0.26 mL, 1.73 mmol, 1 eq.). The mixture was cooled to –78 °C a 2.5 M *n*-butyllithium solution in hexane (0.68 mL, 1.70 mmol, 1 eq.) was added dropwise. The mixture was stirred at –78 °C for 4 h. Trimethyl borate (0.57 mL, 5.11 mmol, 3 eq.) was added dropwise and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. A 3 M aqueous HCl solution (4 mL) was added and the aqueous layer was washed with diethyl ether and neutralized by solid  $\text{NaHCO}_3$ . The resulting precipitate was filtered and washed with acetone to give quinolin-8-ylboronic acid (112 mg) which was used without further purification.

Compound **16** was prepared according to general [procedure A](#), starting from **4** (145 mg, 0.408 mmol) and the quinolin-8-ylboronic acid (114 mg). The mixture was refluxed for 21 h. The crude solid was purified by column chromatography ( $\text{SiO}_2$ , cyclohexane + 0.5%  $\text{NEt}_3$  to EtOAc/cyclohexane 3:7 + 0.5%  $\text{NEt}_3$ ) to give **16** (137 mg, 0.340 mmol, 83%) as a yellow solid.  $R_f = 0.41$  (EtOAc/cyclohexane 3:7); Mp 162 °C; IR (ATR) 3252, 3180, 1592, 1497, 1461, 1228, 1003, 796, 736, 694  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.90 (dd,  $J = 4.1$ , 1.8, 1H), 8.42 (dd,  $J = 8.3$ , 1.8, 1H), 8.05 (s, 1H), 8.03–8.00 (m, 2H), 7.81 (dd,  $J = 7.1$ , 1.5, 1H), 7.67 (dd,  $J = 8.1$ , 7.2, 1H), 7.56 (dd,  $J = 8.3$ , 4.1, 1H), 7.56 (d,  $J = 2.7$ , 1H), 7.24–7.12 (m, 7H), 7.01 (dd,  $J = 8.6$ , 1.0, 2H), 6.74 (tt,  $J = 7.3$ , 1.1, 1H), 5.27 (s, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  155.3 (C), 150.2 (CH), 145.7 (C), 144.6 (C), 137.8 (C), 136.3 (CH), 135.8 (CH), 135.4 (C), 133.6 (C), 132.6 (CH), 130.6 (CH), 129.2 (2CH), 128.3 (CH), 128.0 (2CH + C), 127.1 (CH), 126.9 (2CH), 126.1 (CH), 122.7 (C), 121.4 (CH), 118.8 (CH), 114.9 (2CH), 66.59 ( $\text{CH}_2$ ); HRMS (ESI+) calcd for  $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}$  ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$  404.1757, found 404.1755.

#### 4.1.12. 6-(Benzyloxy)-N-phenyl-5-(pyrimidin-5-yl)pyridin-3-amine (**17**)

Compound **17** was prepared according to general [procedure A](#), starting from **4** (122 mg, 0.343 mmol) and the corresponding boronic acid. The mixture was refluxed for 18 h. The crude oil was purified by column chromatography ( $\text{SiO}_2$ , EtOAc/cyclohexane 1:9 to 65:35) to give **17** (115 mg, 0.324 mmol, 94%) as a yellow solid.  $R_f = 0.20$  (EtOAc/cyclohexane 3:7); Mp 115 °C; IR (ATR) 3299, 1595, 1536, 1408, 1261, 1228, 1015, 747, 722, 692  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.15 (s, 1H), 9.05 (s, 2H), 8.17 (s, 1H), 8.07 (d,  $J = 2.7$ , 1H), 7.75 (d,  $J = 2.8$ , 1H), 7.43–7.40 (m, 2H), 7.39–7.34 (m, 2H), 7.33–7.28 (m, 1H), 7.21 (t,  $J = 7.8$ , 2H), 7.01 (d,  $J = 7.9$ , 2H), 6.79 (t,  $J = 7.3$ , 1H), 5.38 (s, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  157.2 (CH), 156.5 (2CH), 154.3 (C), 144.2 (C), 137.3 (CH), 137.2 (C), 134.8 (C), 130.3 (CH), 130.0 (C), 129.3 (2CH), 128.4 (2CH), 127.68 (CH), 127.65 (2CH), 119.2 (CH), 117.2 (C), 115.3 (2CH), 67.5 ( $\text{CH}_2$ ); HRMS (ESI+) calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}$  ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$  355.1553, found 355.1560.

#### 4.1.13. 6-(Benzyloxy)-5-(isoquinolin-5-yl)-N-phenylpyridin-3-amine (**18**)

Isoquinolin-5-ylboronic acid was prepared from 5-bromoisoquinoline according to literature procedure [25]. Anhydrous THF (19 mL) was cooled to –78 °C then a 2.5 M *n*-butyllithium solution in hexane (1.2 mL, 3.0 mmol, 1.25 eq.) was added under argon. A solution of 5-bromoisoquinoline (502 mg, 2.41 mmol, 1 eq.) in anhydrous THF (5 mL) was added. The mixture was stirred at –78 °C for 1 h. Triisopropyl borate (0.70 mL, 3.0 mmol, 1.25 eq.) was added dropwise and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. A 5% aqueous NaOH solution (1 mL) was slowly added to quench the reaction. Aqueous phase was acidified to pH 5 at 0 °C with a 10% aqueous HCl solution, then was extracted with EtOAc. The organic phase was dried over  $\text{MgSO}_4$  and filtered. After evaporation, the obtained solid was washed with diethyl ether to give isoquinolin-5-ylboronic acid (135.5 mg, 0.783 mmol, 32%).

Compound **18** was prepared according to general procedure A, starting from **4** (161 mg, 0.453 mmol) and isoquinolin-5-ylboronic acid. The mixture was refluxed for 18 h. The crude solid was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/cyclohexane 1:9 to 65:35) to give **18** (173 mg, 0.429 mmol, 95%) as a white solid.  $R_f = 0.22$  (EtOAc/cyclohexane 3:7); Mp 162 °C; IR (ATR) 3279, 1603, 1441, 1361, 1227, 995, 746 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.37 (s, 1H), 8.46 (d, *J* = 5.9, 1H), 8.16 (dd, *J* = 7.5, 1.9, 1H), 8.14 (d, *J* = 2.7, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.79–7.72 (m, 2H), 7.51 (d, *J* = 2.8, 1H), 7.43 (d, *J* = 5.9, 1H), 7.24–7.17 (m, 5H), 7.15–7.11 (m, 2H), 7.02 (d, *J* = 7.9, 2H), 6.77 (t, *J* = 7.3, 1H), 5.38–5.22 (br s, 2H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 154.7 (C), 152.7 (CH), 144.2 (C), 143.1 (CH), 137.3 (C), 136.4 (CH), 134.5 (C), 133.42 (C), 133.41 (C), 131.7 (CH), 131.6 (CH), 129.3 (2CH), 128.2 (C), 128.1 (2CH), 127.8 (CH), 127.39 (CH), 127.35 (2CH), 127.1 (CH), 121.4 (C), 119.3 (CH), 118.5 (CH), 115.4 (2CH), 66.90 (CH<sub>2</sub>); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for C<sub>27</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O (M + H)<sup>+</sup> 404.1757, found 404.1763.

#### 4.1.14. 3-Phenyl-5-(phenylamino)pyridin-2(1H)-one (**19**)

Compound **19** was prepared according to general procedure C, starting from **12** (46.3 mg, 0.131 mmol). The mixture was stirred for 4 h and was quenched with NEt<sub>3</sub> (12 eq.) and MeOH (4 eq.). The crude was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/MeOH 99.9:0.1 to 99.2:0.8) to give **19** (31.0 mg, 0.118 mmol, 90%) as a yellow solid.  $R_f = 0.20$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 97:3); Mp > 153 °C (decomposition); IR (ATR) 3294, 1592, 1549, 1495, 1456, 1441, 863, 796, 784, 738 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.64 (br s, 1H), 7.73–7.69 (m, 2H), 7.52 (d, *J* = 2.9, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.41–7.36 (m, 2H), 7.34–7.28 (m, 1H), 7.19 (d, *J* = 2.8, 1H), 7.14 (dd, *J* = 8.4, 7.4, 2H), 6.75 (d, *J* = 8.0, 2H), 6.68 (t, *J* = 7.3, 1H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 159.5 (C), 146.5 (C), 137.5 (CH), 136.5 (C), 129.9 (C), 129.2 (2CH), 128.2 (2CH), 127.9 (2CH), 127.5 (CH), 127.1 (CH), 122.8 (C), 117.9 (CH), 113.81 (2CH); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O (M + H)<sup>+</sup> 263.1179, found 263.1173; HPLC purity ≥ 99%,  $t_R = 8.18$  min, λ = 284 nm.

#### 4.1.15. 3-(4-Fluorophenyl)-5-(phenylamino)pyridin-2(1H)-one (**20**)

Compound **20** was prepared according to general procedure C, starting from **13** (80.5 mg, 0.217 mmol). The mixture was stirred for 1 h. The crude was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99.5:0.5 to 97:3) to give **20** (58.9 mg, 0.210 mmol, 97%) as a yellow solid.  $R_f = 0.35$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 94:6); Mp > 198 °C (decomposition); IR (ATR) 3276, 1593, 1549, 1451, 1226, 830 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.69 (br s, 1H), 7.81–7.75 (m, 2H), 7.53 (d, *J* = 2.9, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24–7.11 (m, 5H), 6.74 (d, *J* = 7.9, 2H), 6.68 (t, *J* = 7.3, 1H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 161.6 (d, *J*<sub>CF</sub> = 245, C), 159.5 (C), 146.5 (C), 137.5 (CH), 132.8 (d, *J*<sub>CF</sub> = 3, C), 130.2 (d, *J*<sub>CF</sub> = 8, 2CH), 129.2 (2CH), 128.8 (C), 127.1 (CH), 122.8 (C), 117.9 (CH), 114.8 (d, *J*<sub>CF</sub> = 21, 2CH), 113.8 (2CH); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>FN<sub>2</sub>O (M + H)<sup>+</sup> 281.1085, found 281.1087; HPLC purity ≥ 99%,  $t_R = 8.30$  min, λ = 282 nm.

#### 4.1.16. 5-(Phenylamino)-[3,4'-bipyridin]-2(1H)-one (**21**)

Compound **21** was prepared according to general procedure C, starting from **14** (59.2 mg, 0.168 mmol). The mixture was stirred for 2 h 30 min. The crude was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99:1 to 95:5) to give **21** (35.5 mg, 0.135 mmol, 80%) as a yellow solid.  $R_f = 0.37$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 94:6); Mp > 230 °C (decomposition); IR (ATR) 3220, 1661, 1631, 1596, 1460, 1325, 1258, 830 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.85 (br s, 1H), 8.56 (d, *J* = 5.4, 2H), 7.82–7.79 (m, 2H), 7.76 (d, *J* = 2.8, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.30 (d, *J* = 2.8, 1H), 7.15 (t, *J* = 7.8, 2H), 6.75 (d, *J* = 7.9, 2H), 6.69 (t, *J* = 7.3, 1H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 159.2 (C), 149.4 (2CH), 146.4 (C), 143.6 (C), 138.9 (CH), 129.3 (2CH), 129.2 (CH), 126.6 (C), 122.8 (C), 122.4 (2CH), 118.0 (CH), 113.8 (2CH); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for

C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O (M + H)<sup>+</sup> 264.1131, found 264.1134; HPLC purity ≥ 97%,  $t_R = 6.04$  min, λ = 270 nm.

#### 4.1.17. 3-(1H-Indol-3-yl)-5-(phenylamino)pyridin-2(1H)-one (**22**)

To a mixture under argon of 20% Pd(OH)<sub>2</sub>/C (13.61 mg, 0.019 mmol, 0.25 eq.) and ethyl acetate (1 mL), previously degassed with argon, was added a solution of compound **15** (30.9 mg, 0.079 mmol, 1 eq.) in ethyl acetate (4.5 mL) previously degassed with argon. The mixture was then hydrogenated at room temperature for 15 h. The mixture was filtered through a pad of Celite which was then washed with ethyl acetate. The filtrate was evaporated under reduced pressure and the obtained red solid was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, EtOAc + 0.5% NEt<sub>3</sub> to EtOAc/MeOH 95:5 + 0.5% NEt<sub>3</sub>) to give **22** (17.4 mg, 0.058 mmol, 73%) a red powder.  $R_f = 0.37$  (EtOAc/MeOH 95:5 + 0.5% NEt<sub>3</sub>); Mp > 181 °C (decomposition); IR (ATR) 3450–3150, 1597, 1497, 1431, 734, 693 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.51 (br s, 1H), 11.39 (br s, 1H), 8.32 (d, *J* = 2.6, 1H), 7.82–7.79 (m, 2H), 7.58 (s, 1H), 7.46 (d, *J* = 8.0, 1H), 7.21–7.11 (m, 3H), 7.10–7.04 (m, 2H), 6.82 (d, *J* = 8.0, 2H), 6.69 (t, *J* = 7.3, 1H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 159.5 (C), 146.5 (C), 136.2 (C), 132.6 (CH), 129.3 (2CH), 127.5 (CH), 126.3 (C), 125.1 (C), 122.7 (C), 122.2 (CH), 121.4 (CH), 119.7 (CH), 119.2 (CH), 117.9 (CH), 113.9 (2CH), 112.1 (CH), 109.6 (C); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O (M + H)<sup>+</sup> 302.1288, found 302.1292; HPLC purity ≥ 97%,  $t_R = 8.19$  min, λ = 280 nm.

#### 4.1.18. 5-(Phenylamino)-3-(quinolin-8-yl)pyridin-2(1H)-one (**23**)

Compound **23** was prepared according to general procedure C, starting from **16** (80.3 mg, 0.199 mmol). The mixture was stirred for 2 h 40 min and was quenched with NEt<sub>3</sub> (12 eq.) and MeOH (4 eq.). After evaporation, EtOAc was added. The mixture was washed once with water and twice with a saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution, dried over MgSO<sub>4</sub> and filtered. After evaporation, the crude was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99:1 + 0.5% NEt<sub>3</sub> to 96:4 + 0.5% NEt<sub>3</sub>). The residue was dissolved in EtOAc and washed with water to eliminate the remaining triethylamine salts. After drying over MgSO<sub>4</sub>, filtration and evaporation, **23** (11.9 mg, 0.0380 mmol, 19%) was obtained as a kaki powder. The poor yield could be explained by the poor solubility of the final product.

Compound **23** was again prepared according to general procedure C, starting from **16** (133.8 mg, 0.332 mmol). The mixture was stirred for 3 h, quenched with NEt<sub>3</sub> (12 eq.) and MeOH (4 eq.) and then concentrated. The crude was filtered and washed with water, acetone and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The compound **23** with important traces of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was obtained (70 mg, containing about 10.5% wt CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

$R_f = 0.27$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5); Mp > 255 °C (decomposition); IR (ATR) 3245, 1649, 1578, 1557, 1494, 1335, 1258, 795, 750, 705 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.52 (br s, 1H), 8.88 (dd, *J* = 4.1, 1.8, 1H), 8.39 (dd, *J* = 8.3, 1.8, 1H), 7.97 (dd, *J* = 8.2, 1.5, 1H), 7.85 (dd, *J* = 7.1, 1.5, 1H), 7.63 (dd, *J* = 8.1, 7.2, 1H), 7.56–7.51 (m, 3H), 7.23 (br s, 1H), 7.15 (dd, *J* = 8.5, 7.3, 2H), 6.83 (dd, *J* = 8.6, 1.0, 2H), 6.66 (tt, *J* = 7.3, 1.0, 1H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 159.8 (C), 150.0 (CH), 146.4 (C), 145.8 (C), 140.2 (CH), 136.3 (CH), 135.5 (C), 130.6 (CH), 129.3 (C), 129.2 (2CH), 128.1 (C), 127.9 (CH), 126.6 (CH), 125.9 (CH), 122.3 (C), 121.3 (CH), 117.8 (CH), 113.8 (2CH); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O (M + H)<sup>+</sup> 314.1288, found 314.1291; HPLC purity ≥ 96%,  $t_R = 6.77$  min, λ = 282 nm.

#### 4.1.19. 5-(Phenylamino)-3-(pyrimidin-5-yl)pyridin-2(1H)-one (**24**)

Compound **24** was prepared according to general procedure C, starting from **17** (80.5 mg, 0.227 mmol). The mixture was stirred for 3 h 20 min and was quenched with NEt<sub>3</sub> (12 eq.) and MeOH (4 eq.). After evaporation, EtOAc was added. The mixture was washed with a saturated NaHCO<sub>3</sub> solution, dried over MgSO<sub>4</sub>, and filtered. After

evaporation, the crude was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 98:2 to 95:5) to give **24** (47.8 mg, 0.181 mmol, 80%) as a yellow solid. *R*<sub>f</sub> = 0.12 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5); Mp > 160 °C (decomposition); IR (ATR) 3408, 3287, 1597, 1548, 1475, 742, 717, 694 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.90 (br s, 1H), 9.15 (s, 2H), 9.10 (s, 1H), 7.82 (d, *J* = 2.9, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.30 (d, *J* = 2.8, 1H), 7.14 (t, *J* = 7.8, 2H), 6.76 (d, *J* = 8.0, 2H), 6.68 (t, *J* = 7.3, 1H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 159.2 (C), 156.9 (CH), 155.7 (2CH), 146.4 (C), 138.8 (CH), 130.2 (C), 129.2 (2CH), 128.9 (CH), 123.8 (C), 123.0 (C), 118.0 (CH), 113.8 (2CH); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>O (M + H)<sup>+</sup> 265.1084, found 265.1090; HPLC purity ≥ 96%, t<sub>R</sub> = 7.61 min, λ = 284 nm.

#### 4.1.20. 3-(Isoquinolin-5-yl)-5-(phenylamino)pyridin-2(1H)-one (**25**)

Compound **25** was prepared according to general procedure C, starting from **18** (172 mg, 0.426 mmol). The mixture was stirred for 2 h 30 min and was quenched with NEt<sub>3</sub> (16 eq.) and MeOH (6 eq.). After evaporation, EtOAc was added. The mixture was washed with a saturated NaHCO<sub>3</sub> solution, dried over MgSO<sub>4</sub>, and filtered. After evaporation, the crude was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 98:2 to 90:10) to give **25** (58.6 mg, 0.187 mmol, 44%) as a yellow solid. *R*<sub>f</sub> = 0.16 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 94:6); Mp > 209 °C (decomposition); IR (ATR) 3274, 1646, 1583, 1554, 1496, 1462, 745 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.73 (br s, 1H), 9.34 (s, 1H), 8.47 (d, *J* = 5.9, 1H), 8.15–8.11 (m, 1H), 7.74–7.70 (m, 2H), 7.56–7.53 (m, 2H), 7.44 (d, *J* = 2.9, 1H), 7.35 (d, *J* = 2.9, 1H), 7.15 (dd, *J* = 8.5, 7.4, 2H), 6.80 (dd, *J* = 8.6, 1.0, 2H), 6.68 (tt, *J* = 7.3, 1.0, 1H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 159.4 (C), 152.6 (CH), 146.3 (C), 142.8 (CH), 139.9 (CH), 134.3 (C), 133.6 (C), 131.5 (CH), 129.3 (C), 129.2 (2CH), 128.3 (C), 128.0 (CH), 127.6 (CH), 127.0 (CH), 122.8 (C), 118.7 (CH), 118.0 (CH), 114.0 (2CH); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O (M + H)<sup>+</sup> 314.1288, found 314.1292; HPLC purity ≥ 96%, t<sub>R</sub> = 6.47 min, λ = 278 nm.

#### 4.1.21. 6-(Benzyloxy)-5-(quinolin-4-yl)-N-phenylpyridin-3-amine (**46**)

Compound **46** was prepared according to general procedure A, starting from **4** (201 mg, 0.566 mmol) and the corresponding boronic acid. The mixture was refluxed for 16 h. The crude oil was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/cyclohexane 1:9 to 3:7) to give **46** (205 mg, 0.508 mmol, 90%) as a yellow powder. *R*<sub>f</sub> = 0.16 (EtOAc/cyclohexane 2:8); Mp 156 °C; IR (ATR) 3232, 3179, 1597, 1438, 1229, 1022, 730, 694 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.95 (d, *J* = 4.4, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.16 (d, *J* = 2.8, 1H), 8.09 (d, *J* = 8.4, 1H), 7.79 (ddd, *J* = 8.4, 6.8, 1.6, 1H), 7.66 (dd, *J* = 8.4, 1.4, 1H), 7.58 (ddd, *J* = 8.3, 6.8, 1.4, 1H), 7.54 (d, *J* = 2.8, 1H), 7.52 (d, *J* = 4.4, 1H), 7.24–7.17 (m, 5H), 7.14–7.10 (m, 2H), 7.02 (dd, *J* = 8.7, 1.1, 2H), 6.78 (tt, *J* = 7.3, 1.0, 1H), 5.39–5.21 (br s, 2H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 154.3 (C), 150.1 (CH), 147.7 (C), 144.0 (C), 142.9 (C), 137.3 (C), 136.9 (CH), 134.5 (C), 131.0 (CH), 129.5 (CH), 129.4 (CH), 129.3 (2CH), 128.1 (2CH), 127.4 (CH), 127.3 (2CH), 126.8 (CH), 126.2 (C), 125.9 (CH), 122.2 (CH), 120.3 (C), 119.4 (CH), 115.5 (2CH), 67.0 (CH<sub>2</sub>); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for C<sub>27</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O (M + H)<sup>+</sup> 404.1757, found 404.1763.

#### 4.1.22. 6-(Benzyloxy)-5-(1H-indol-4-yl)-N-phenylpyridin-3-amine (**47**)

Compound **47** was prepared according to general procedure A, starting from **4** (189 mg, 0.53 mmol) and the corresponding pinacol boronic ester. The mixture was refluxed for 16 h. The crude oil was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/cyclohexane 5:95 to EtOAc/cyclohexane 15:85) to give **47** (207 mg, 0.53 mmol, quant.) as a grey powder. *R*<sub>f</sub> = 0.30 (EtOAc/cyclohexane 2:8); Mp 66 °C; IR (ATR) 3394, 1595, 1496, 1441, 1350, 1228, 748, 694 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR

(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.19 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 8.02 (d, *J* = 2.7, 1H), 7.58 (d, *J* = 2.7, 1H), 7.43–7.10 (m, 11H), 6.99 (d, *J* = 7.9, 2H), 6.76 (t, *J* = 7.3, 1H), 6.32–6.30 (m, 1H), 5.35 (s, 2H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 154.7 (C), 144.5 (C), 137.7 (C), 136.0 (C), 135.3 (CH), 134.1 (C), 131.3 (CH), 129.3 (2CH), 128.1 (2CH), 127.9 (C), 127.4 (2CH), 127.3 (CH), 126.5 (C), 125.5 (CH), 123.7 (C), 120.7 (CH), 120.0 (CH), 119.0 (CH), 115.2 (2CH), 111.1 (CH), 100.5 (CH), 66.9 (CH<sub>2</sub>); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for C<sub>26</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O (M + H)<sup>+</sup> 392.1757, found 392.1751.

#### 4.1.23. 6-(Benzyloxy)-5-(2-chlorophenyl)-N-phenylpyridin-3-amine (**48**)

Compound **48** was prepared according to general procedure A, starting from **4** (125.2 mg, 0.352 mmol) and the corresponding boronic acid. The mixture was refluxed for 15 h 30 min. The crude oil was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, pentane to EtOAc/pentane 1:9) to give **48** (116 mg, 0.300 mmol, 85%) a red oil. *R*<sub>f</sub> = 0.34 (EtOAc/cyclohexane 1:9); IR (ATR) 3390, 1599, 1497, 1425, 1231, 736, 693 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.10 (s, 1H), 8.03 (d, *J* = 2.8, 1H), 7.58–7.53 (m, 1H), 7.47–7.38 (m, 4H), 7.33–7.23 (m, 5H), 7.20 (dd, *J* = 8.5, 7.3, 2H), 6.97 (d, *J* = 8.7, 1.1, 2H), 6.77 (tt, *J* = 7.3, 1.0, 1H), 5.30 (s, 2H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 154.4 (C), 144.2 (C), 137.6 (C), 136.4 (CH), 135.2 (C), 134.0 (C), 132.6 (C), 131.8 (CH), 131.2 (CH), 129.6 (CH), 129.32 (2CH), 129.28 (CH), 128.2 (2CH), 127.4 (CH), 127.3 (2CH), 127.1 (CH), 121.9 (C), 119.2 (CH), 115.2 (2CH), 67.0 (CH<sub>2</sub>); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for C<sub>24</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>2</sub>O (M + H)<sup>+</sup> 387.1259, found 387.1248.

#### 4.1.24. 6-(Benzyloxy)-5-(2-bromophenyl)-N-phenylpyridin-3-amine (**49**)

Compound **49** was prepared according to general procedure A, starting from **4** (114.7 mg, 0.323 mmol) and the corresponding boronic acid. The mixture was refluxed for 16 h. The crude was chromatographed (SiO<sub>2</sub>, cyclohexane to EtOAc/cyclohexane 1:9) but some impurity remained in the obtained orange oil (71 mg). Compound **49** was used for the next step without further purification. *R*<sub>f</sub> = 0.29 (EtOAc/cyclohexane 1:9).

#### 4.1.25. Ethyl 2-(2-(benzyloxy)-5-(phenylamino)pyridin-3-yl)benzoate (**50**)

Compound **50** was prepared according to general procedure A, starting from **4** (123.5 mg, 0.348 mmol) and the corresponding boronic acid. The mixture was refluxed for 15 h. The crude oil was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, cyclohexane to EtOAc/cyclohexane 1:9) to give **50** (110 mg, 0.259 mmol, 75%) an orange-brown oil. *R*<sub>f</sub> = 0.40 (EtOAc/cyclohexane 2:8); IR (ATR) 3372, 1708, 1598, 1430, 1253, 746, 693 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.05 (s, 1H), 7.98 (d, *J* = 2.7, 1H), 7.85 (dd, *J* = 7.7, 1.4, 1H), 7.65 (td, *J* = 7.6, 1.5, 1H), 7.50 (td, *J* = 7.6, 1.3, 1H), 7.41 (dd, *J* = 7.6, 1.3, 1H), 7.39 (d, *J* = 2.7, 1H), 7.33–7.22 (m, 5H), 7.20 (dd, *J* = 8.6, 7.3, 2H), 6.96 (dd, *J* = 8.6, 1.1, 2H), 6.76 (tt, *J* = 7.3, 1.1, 1H), 5.24 (s, 2H), 3.98 (q, *J* = 7.1, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.1, 3H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 166.8 (C), 154.3 (C), 144.6 (C), 137.4 (C), 136.6 (C), 135.5 (CH), 134.1 (C), 132.1 (CH), 131.1 (CH), 131.0 (C), 130.4 (CH), 129.5 (CH), 129.3 (2CH), 128.1 (2CH), 128.0 (CH), 127.4 (CH), 127.3 (2CH), 124.9 (C), 118.9 (CH), 115.0 (2CH), 66.8 (CH<sub>2</sub>), 60.4 (CH<sub>2</sub>), 13.6 (CH<sub>3</sub>); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for C<sub>27</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (M + H)<sup>+</sup> 425.1860, found 425.1857.

#### 4.1.26. 2-(2-(Benzyloxy)-5-(phenylamino)pyridin-3-yl)benzoinitrile (**51**)

Compound **51** was prepared according to general procedure A, starting from **4** (152 mg, 0.428 mmol) and the corresponding boronic acid. The mixture was refluxed for 15 h. The crude was chromatographed (SiO<sub>2</sub>, pentane to EtOAc/pentane) but some impurities remained in the obtained white solid (131.6 mg). Compound **51** was used for the next step without further purification.

$R_f = 0.35$  (EtOAc/pentane 5:5).

#### 4.1.27. 6-(Benzyloxy)-5-(2-nitrophenyl)-N-phenylpyridin-3-amine (52)

To a solution under argon of **4** (201.4 mg, 0.567 mmol, 1 eq.) in 1,4-dioxane (0.5 mL) were added the 2-nitrophenylboronic acid (95.1 mg, 0.57, 1 eq.) and a 2 M aqueous  $K_2CO_3$  solution (4 eq.). The mixture was degassed with argon for 10 min before the addition of  $Pd(dppf)Cl_2$  (24.4 mg, 0.033 mmol, 0.06 eq.). The solution was stirred at 100 °C. Additional portions of boronic acid were added after 2 h 30 min (47.3 mg, 0.283 mmol, 0.5 eq.), 17 h 30 min (31.6 mg, 0.189 mmol, 0.33 eq.) and 24 h (47.4 mg, 0.284 mmol, 0.5 eq.). The mixture was then stirred at 100 °C overnight. Ethyl acetate was added and the resulting mixture was washed with water. The organic phase was dried over  $MgSO_4$  and filtered. After evaporation under reduced pressure, the crude was purified by column chromatography ( $SiO_2$ , cyclohexane to EtOAc/cyclohexane 1:9) to give the desired product **52** (83.1 mg, 0.209 mmol, 37%) as an orange powder.  $R_f = 0.41$  (EtOAc/cyclohexane 2:8); Mp 141 °C; IR (ATR) 3370, 1453, 1351, 1295, 1250, 1219, 990, 730, 693  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  8.14 (s, 1H), 8.05 (dd,  $J = 8.1, 1.2, 1H$ ), 8.01 (d,  $J = 2.7, 1H$ ), 7.80 (td,  $J = 7.6, 1.3, 1H$ ), 7.64 (ddd,  $J = 8.1, 7.5, 1.5, 1H$ ), 7.60 (dd,  $J = 7.6, 1.3, 1H$ ), 7.55 (d,  $J = 2.7, 1H$ ), 7.33–7.19 (m, 7H), 7.00 (dd,  $J = 8.6, 1.1, 2H$ ), 6.79 (tt,  $J = 7.3, 1.1, 1H$ ), 5.21 (br s, 2H);  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  153.5 (C), 148.6 (C), 144.2 (C), 137.0 (C), 136.1 (CH), 134.7 (C), 133.8 (CH), 132.6 (CH), 130.6 (C), 129.9 (CH), 129.4 (CH), 129.3 (2CH), 128.2 (2CH), 127.5 (CH), 127.4 (2CH), 124.3 (CH), 121.3 (C), 119.3 (CH), 115.3 (2CH), 67.2 (CH<sub>2</sub>); HRMS (ESI+) calcd for  $C_{24}H_{20}N_3O_3$  (M + H)<sup>+</sup> 398.1499, found 398.1487.

#### 4.1.28. 5-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-6-(benzyloxy)-N-phenylpyridin-3-amine (53)

Compound **53** was prepared according to general procedure A, starting from **4** (119 mg, 0.335 mmol) and the corresponding boronic acid. The mixture was refluxed for 16 h. The crude oil was purified by column chromatography ( $SiO_2$ , cyclohexane to EtOAc/cyclohexane 1:9) to give **53** (30.8 mg) and a second fraction containing trace of 4-phenylphenol.  $CH_2Cl_2$  was added to the second fraction which was washed with a 0.5 M aqueous NaOH solution, and then with water. The organic phase was dried over  $MgSO_4$ , filtered and evaporated to give pure **53** (99.8 mg). Compound **53** (130.6 mg, 0.305 mmol, 91%) was obtained as a light brown solid.  $R_f = 0.27$  (EtOAc/cyclohexane 1:9); Mp 109 °C; IR (ATR) 3304, 1595, 1437, 1232, 1006, 841, 721, 690  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  8.09 (s, 1H), 8.00 (d,  $J = 2.7, 1H$ ), 7.76–7.69 (m, 6H), 7.60 (d,  $J = 2.8, 1H$ ), 7.51–7.41 (m, 4H), 7.40–7.34 (m, 3H), 7.32–7.26 (m, 1H), 7.21 (dd,  $J = 8.6, 7.3, 2H$ ), 7.00 (dd,  $J = 8.7, 1.1, 2H$ ), 6.78 (tt,  $J = 7.3, 1.1, 1H$ ), 5.41 (s, 2H);  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  154.3 (C), 144.4 (C), 139.6 (C), 139.3 (C), 137.7 (C), 135.7 (CH), 135.2 (C), 134.6 (C), 130.3 (CH), 129.5 (2CH), 129.3 (2CH), 129.0 (2CH), 128.3 (2CH), 127.6 (CH), 127.5 (CH), 127.4 (2CH), 126.6 (2CH), 126.5 (2CH), 123.3 (C), 119.1 (CH), 115.2 (2CH), 67.1 (CH<sub>2</sub>); HRMS (ESI+) calcd for  $C_{30}H_{25}N_2O$  (M + H)<sup>+</sup> 429.1961, found 429.1972.

#### 4.1.29. 6-(Benzyloxy)-5-(3-chlorophenyl)-N-phenylpyridin-3-amine (54)

Compound **54** was prepared according to general procedure A, starting from **4** (117 mg, 0.329 mmol). The mixture was refluxed for 16 h. The crude oil was purified by column chromatography ( $SiO_2$ , cyclohexane to EtOAc/cyclohexane 1:9) to give **54** (121.3 mg, 0.314 mmol, 95%) as a red oil.  $R_f = 0.40$  (EtOAc/cyclohexane 1:9); IR (ATR) 3378, 1602, 1589, 1439, 1409, 1359, 1298, 1256, 1217, 1013, 894, 754, 728, 692  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  8.09 (s, 1H), 8.02 (d,  $J = 2.7, 1H$ ), 7.71 (t,  $J = 1.7, 1H$ ), 7.58 (d,  $J = 2.7, 1H$ ), 7.56 (dt,  $J = 7.5, 1.5, 1H$ ), 7.46 (t,  $J = 7.7, 1H$ ), 7.44–7.40 (m, 3H), 7.39–7.33

(m, 2H), 7.32–7.27 (m, 1H), 7.21 (dd,  $J = 8.5, 7.4, 2H$ ), 6.99 (dd,  $J = 8.6, 1.0, 2H$ ), 6.78 (tt,  $J = 7.3, 1.1, 1H$ ), 5.38 (s, 2H);  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  154.1 (C), 144.3 (C), 138.2 (C), 137.5 (C), 136.3 (CH), 134.6 (C), 132.9 (C), 130.4 (CH), 130.2 (CH), 129.4 (2CH), 128.9 (CH), 128.3 (2CH), 127.7 (CH), 127.6 (CH), 127.5 (CH), 127.4 (2CH), 122.2 (C), 119.2 (CH), 115.2 (2CH), 67.2 (CH<sub>2</sub>); HRMS (ESI+) calcd for  $C_{24}H_{20}ClN_2O$  (M + H)<sup>+</sup> 387.1259, found 387.1268.

#### 4.1.30. 1-(3-(2-(Benzyloxy)-5-(phenylamino)pyridin-3-yl)phenyl)ethan-1-one (55)

Compound **55** was prepared according to general procedure A, starting from **4** (117.5 mg, 0.331 mmol) and the corresponding boronic acid. The mixture was refluxed for 15 h. The crude oil was purified by column chromatography ( $SiO_2$ , cyclohexane to EtOAc/cyclohexane 15:85) to give **55** (130.6 mg, 0.331 mmol, quant.) a brown oil.  $R_f = 0.41$  (EtOAc/cyclohexane 2:8); IR (ATR) 3367, 1669, 1596, 1535, 1497, 1490, 1442, 1417, 1246, 1218, 1009, 734, 693  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  8.21 (td,  $J = 1.8, 0.5, 1H$ ), 8.10 (s, 1H), 8.04 (d,  $J = 2.7, 1H$ ), 7.93 (ddd,  $J = 7.8, 1.8, 1.1, 1H$ ), 7.86 (ddd,  $J = 7.7, 1.9, 1.1, 1H$ ), 7.62 (d,  $J = 2.8, 1H$ ), 7.59 (td,  $J = 7.8, 0.5, 1H$ ), 7.45–7.41 (m, 2H), 7.38–7.32 (m, 2H), 7.32–7.26 (m, 1H), 7.21 (dd,  $J = 8.6, 7.3, 2H$ ), 6.99 (dd,  $J = 8.7, 1.1, 2H$ ), 6.78 (tt,  $J = 7.3, 1.1, 1H$ ), 5.38 (s, 2H), 2.56 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  197.7 (C), 154.3 (C), 144.4 (C), 137.5 (C), 136.8 (C), 136.4 (C), 136.2 (CH), 134.6 (C), 133.6 (CH), 130.6 (CH), 129.3 (2CH), 129.0 (CH), 128.7 (CH), 128.3 (2CH), 127.58 (2CH), 127.57 (CH), 127.2 (CH), 122.8 (C), 119.1 (CH), 115.2 (2CH), 67.2 (CH<sub>2</sub>), 26.7 (CH<sub>3</sub>); HRMS (ESI+) calcd for  $C_{26}H_{23}N_2O_2$  (M + H)<sup>+</sup> 395.1754, found 395.1748.

#### 4.1.31. 4-(2-(Benzyloxy)-5-(phenylamino)pyridin-3-yl)phenol (56)

Compound **56** was prepared according to general procedure A, starting from **4** (147 mg, 0.414 mmol) and the corresponding boronic acid. The mixture was refluxed for 15 h. The crude oil was purified by column chromatography ( $SiO_2$ , EtOAc/cyclohexane 5:95 to 2:8). The obtained yellow solid was then dissolved in ethyl acetate and washed with water. The organic phase was dried over  $MgSO_4$ , filtered and evaporated to give **56** (115 mg, 0.312 mmol, 75%) as a pale yellow solid.  $R_f = 0.24$  (EtOAc/cyclohexane 8:2); Mp 172 °C; IR (ATR) 3389, 1597, 1528, 1249, 1211, 1023, 725, 689  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  9.55 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.92 (d,  $J = 2.7, 1H$ ), 7.47 (d,  $J = 2.7, 1H$ ), 7.43 (d,  $J = 8.7, 2H$ ), 7.43–7.39 (m, 2H), 7.38–7.33 (m, 2H), 7.31–7.26 (m, 1H), 7.20 (dd,  $J = 8.4, 7.4, 2H$ ), 6.96 (dd,  $J = 8.6, 1.0, 2H$ ), 6.80 (d,  $J = 8.7, 2H$ ), 6.76 (tt,  $J = 7.3, 1.0, 1H$ ), 5.36 (s, 2H);  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  157.0 (C), 154.3 (C), 144.5 (C), 137.8 (C), 134.8 (CH), 134.4 (C), 130.2 (2CH), 130.0 (CH), 129.3 (2CH), 128.3 (2CH), 127.4 (CH), 127.3 (2CH), 126.6 (C), 123.9 (C), 118.9 (CH), 115.10 (2CH), 115.06 (2CH), 67.0 (CH<sub>2</sub>); HRMS (ESI+) calcd for  $C_{24}H_{21}N_2O_2$  (M + H)<sup>+</sup> 369.1598, found 369.1587.

#### 4.1.32. 6-(Benzyloxy)-N-phenyl-5-(p-tolyl)pyridin-3-amine (57)

Compound **57** was prepared according to general procedure A, starting from **4** (120 mg, 0.338 mmol) and the corresponding boronic acid. The mixture was refluxed for 15 h. The crude oil was purified by column chromatography ( $SiO_2$ , cyclohexane to EtOAc/cyclohexane 1:9) to give **57** containing trace of 4-methylphenol. EtOAc was added and the organic phase washed with a 0.5 M aqueous NaOH solution, and then with water. The organic phase was dried over  $MgSO_4$ , filtered and evaporated to give **57** (106 mg, 0.289 mmol, 86%) as an orange solid.  $R_f = 0.37$  (EtOAc/cyclohexane 1:9); Mp 72 °C; IR (ATR) 3313, 1594, 1440, 1231, 1025, 868, 822, 730, 692  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  8.05 (s, 1H), 7.97 (d,  $J = 2.7, 1H$ ), 7.51 (d,  $J = 2.8, 1H$ ), 7.50 (d,  $J = 8.2, 2H$ ), 7.42–7.39 (m, 2H), 7.38–7.33 (m, 2H), 7.31–7.26 (m, 1H), 7.23 (d,  $J = 7.8, 2H$ ), 7.20 (dd,  $J = 8.6, 7.3, 2H$ ), 6.97 (dd,  $J = 8.7, 1.1, 2H$ ), 6.76 (tt,  $J = 7.3, 1.1, 1H$ ), 5.36 (s, 2H), 2.32 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  154.3 (C),

144.5 (C), 137.7 (C), 137.0 (C), 135.4 (CH), 134.5 (C), 133.2 (C), 130.4 (CH), 129.3 (2CH), 128.85 (2 × 2CH), 128.3 (2CH), 127.49 (CH), 127.46 (2CH), 123.8 (C), 119.0 (CH), 115.1 (2CH), 67.1 (CH<sub>2</sub>), 20.8 (CH<sub>3</sub>); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for C<sub>25</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O (M + H)<sup>+</sup> 367.1805, found 367.1797.

#### 4.1.33. 6-(Benzyloxy)-N-phenyl-5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)pyridin-3-amine (58)

Compound **58** was prepared according to general procedure A, starting from **4** (152 mg, 0.43 mmol) and the corresponding boronic acid. The mixture was refluxed for 18 h. The crude green oil was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/cyclohexane 5:95 to 2:8) to give **58** (149 mg, 0.35 mmol, 83%) as a pale yellow oil which solidified to a yellow solid.

R<sub>f</sub> = 0.51 (EtOAc/cyclohexane 2:8); Mp 109 °C; IR (ATR) 3383, 3336, 1598, 1442, 1322, 1123, 1111, 1068, 845, 738, 693 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.10 (s, 1H), 8.05 (d, *J* = 2.8, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.2, 2H), 7.78 (d, *J* = 8.4, 2H), 7.61 (d, *J* = 2.8, 1H), 7.42–7.39 (m, 2H), 7.38–7.33 (m, 2H), 7.31–7.26 (m, 1H), 7.21 (dd, *J* = 8.5, 7.3, 2H), 7.00 (dd, *J* = 8.6, 1.1, 2H), 6.78 (tt, *J* = 7.3, 1.1, 1H), 5.40 (s, 2H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 154.1 (C), 144.2 (C), 140.3 (C), 137.5 (C), 136.5 (CH), 134.7 (C), 130.5 (CH), 129.8 (2CH), 129.3 (2CH), 128.3 (2CH), 127.9 (q, *J*<sub>CF</sub> = 32, C), 127.52 (CH), 127.46 (2CH), 125.1 (q, *J*<sub>CF</sub> = 4, 2CH), 124.2 (q, *J*<sub>CF</sub> = 272, C), 122.2 (C), 119.2 (CH), 115.3 (2CH), 67.2 (CH<sub>2</sub>); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for C<sub>25</sub>H<sub>20</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O (M + H)<sup>+</sup> 421.1522, found 421.1539.

#### 4.1.34. 6-(Benzyloxy)-N-phenyl-5-(4-(trifluoromethoxy)phenyl)pyridin-3-amine (59)

Compound **59** was prepared according to general procedure A, starting from **4** (115.1 mg, 0.324 mmol) and the corresponding boronic acid. The mixture was refluxed for 16 h. The crude was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, cyclohexane to EtOAc/cyclohexane 1:9) to give **59** (128.1 mg, 0.293 mmol, 91%) as a grey solid. R<sub>f</sub> = 0.36 (EtOAc/cyclohexane 1:9); Mp 83 °C; IR (ATR) 3394, 1598, 1443, 1258, 1206, 1163, 1047, 1017, 734, 695 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.09 (s, 1H), 8.01 (d, *J* = 2.7, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.9, 2H), 7.57 (d, *J* = 2.8, 1H), 7.45–7.33 (m, 6H), 7.31–7.26 (m, 1H), 7.20 (dd, *J* = 8.5, 7.4, 2H), 6.99 (dd, *J* = 8.6, 1.0, 2H), 6.78 (tt, *J* = 7.4, 1.0, 1H), 5.38 (s, 2H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 154.1 (C), 147.7 (q, *J* = 2, C), 144.3 (C), 137.6 (C), 136.1 (CH), 135.4 (C), 134.6 (C), 131.0 (2CH), 130.4 (CH), 129.3 (2CH), 128.3 (2CH), 127.5 (CH), 127.4 (2CH), 122.3 (C), 120.8 (2CH), 120.1 (q, *J* = 256, C), 119.2 (CH), 115.3 (2CH), 67.1 (CH<sub>2</sub>); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for C<sub>25</sub>H<sub>20</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M + H)<sup>+</sup> 437.1463, found 437.1471.

#### 4.1.35. Methyl 4-(2-(benzyloxy)-5-(phenylamino)pyridin-3-yl)benzoate (60)

Compound **60** was prepared according to general procedure A, starting from **4** (98.9 mg, 0.278 mmol) and the corresponding boronic acid. The mixture was refluxed for 16 h. The crude was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, cyclohexane to EtOAc/cyclohexane 15:85) to give **60** (68.8 mg, 0.168 mmol, 60%) as a yellow powder. R<sub>f</sub> = 0.46 (EtOAc/cyclohexane 2:8); Mp 139 °C; IR (ATR) 3374, 1707, 1695, 1598, 1280, 1261, 861, 729, 695 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.11 (s, 1H), 8.04 (d, *J* = 2.7, 1H), 8.00 (d, *J* = 8.6, 2H), 7.77 (d, *J* = 8.6, 2H), 7.60 (d, *J* = 2.7, 1H), 7.43–7.39 (m, 2H), 7.39–7.33 (m, 2H), 7.32–7.26 (m, 1H), 7.21 (dd, *J* = 8.5, 7.3, 2H), 6.99 (dd, *J* = 8.6, 1.1, 2H), 6.78 (tt, *J* = 7.3, 1.1, 1H), 5.38 (s, 2H), 3.86 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 166.0 (C), 154.2 (C), 144.3 (C), 141.0 (C), 137.5 (C), 136.5 (CH), 134.7 (C), 130.5 (CH), 129.39 (2CH), 129.35 (2CH), 129.1 (2CH), 128.6 (C), 128.4 (2CH), 127.6 (CH), 127.5 (2CH), 122.6 (C), 119.2 (CH), 115.3 (2CH), 67.3 (CH<sub>2</sub>), 52.2 (CH<sub>3</sub>); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for C<sub>26</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (M + H)<sup>+</sup> 411.1703, found 411.1702.

#### 4.1.36. 4-(2-(Benzyloxy)-5-(phenylamino)pyridin-3-yl)benzamide (61)

Compound **61** was prepared according to general procedure A, starting from **4** (115 mg, 0.324 mmol) and the corresponding boronic acid. The mixture was refluxed for 16 h. The crude was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/cyclohexane 3:7 to 6:4) but some impurities remained in the obtained white powder (133 mg). Compound **61** was used for the next step without further purification. R<sub>f</sub> = 0.09 (EtOAc/cyclohexane 3:7).

#### 4.1.37. 6-(Benzyloxy)-5-(2,4-difluorophenyl)-N-phenylpyridin-3-amine (62)

Compound **62** was prepared according to general procedure A, starting from **4** (115 mg, 0.324 mmol) and the corresponding boronic acid. The mixture was refluxed for 22 h. Due to the presence of residual starting material **4**, catalyst PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> was added (5.1 mg, 0.0073 mmol, 0.02 eq.) and the mixture was refluxed for additional 17 h. The crude was chromatographed (SiO<sub>2</sub>, pentane to EtOAc/pentane 6:94) but some impurities remained in the obtained pink-brown oil (97.6 mg). Compound **62** was used for the next step without further purification. R<sub>f</sub> = 0.21 (EtOAc/pentane 5:95).

#### 4.1.38. 6-(Benzyloxy)-5-(1H-indol-7-yl)-N-phenylpyridin-3-amine (63)

Indole-7-boronic acid was prepared from 7-bromoindole according to literature procedure [28]. To a solution under argon cooled to 0 °C of 7-bromoindole (171 mg, 0.87 mmol, 1 eq.) in anhydrous THF (1.4 mL) was added a suspension of KH (30% dispersion in mineral oil, 121.6 mg, 0.91 mmol, 1 eq.) in anhydrous THF (0.33 mL) cooled to 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C for 20 min then was cooled to -78 °C and a 1.08 M *t*-butyllithium solution in pentane (1.65 mL, 1.78 mmol, 2 eq.) cooled to -78 °C was added dropwise. The mixture was then stirred at room temperature for 15 min in the dark. The mixture was cooled to -78 °C and trimethyl borate was added (0.19 mL, 1.7 mmol, 2 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 3 h. Water was added and the mixture was washed with EtOAc. Aqueous phase was acidified with a 10% HCl solution (pH 1) and was extracted with EtOAc. The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated giving a 46:54 mixture of indole-7-boronic acid and indole (213 mg, ratio evaluated by <sup>1</sup>H NMR). The obtained crude was used without purification.

Compound **63** was prepared according to general procedure A, starting from **4** (105.1 mg, 0.296 mmol) and the mixture of indole-7-boronic acid and indole obtained in the preceding step. The reaction mixture was refluxed for 15.5 h. The crude oil was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, cyclohexane to EtOAc/cyclohexane 2:8) to give **63** (57 mg, 0.146 mmol, 49%) as a beige powder. R<sub>f</sub> = 0.32 (EtOAc/cyclohexane 2:8); Mp 135 °C; IR (ATR) 3389, 3316, 1596, 1497, 1420, 1230, 1023, 798, 722, 692 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.91 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 8.08 (d, *J* = 2.8, 1H), 7.57–7.53 (m, 1H), 7.55 (d, *J* = 2.8, 1H), 7.30 (t, *J* = 2.9, 1H), 7.24–7.17 (m, 7H), 7.08–6.99 (m, 4H), 6.76 (tt, *J* = 7.3, 1.1, 1H), 6.47 (dd, *J* = 3.1, 1.9, 1H), 5.34 (s, 2H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 154.9 (C), 144.5 (C), 137.5 (C), 135.7 (CH), 134.3 (C), 133.6 (C), 131.2 (CH), 129.3 (2CH), 128.0 (2CH), 127.9 (C), 127.5 (2CH), 127.3 (CH), 125.5 (CH), 122.2 (CH), 122.0 (C), 120.6 (C), 119.9 (CH), 119.0 (CH), 118.8 (CH), 115.1 (2CH), 101.1 (CH), 67.1 (CH<sub>2</sub>); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for C<sub>26</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O (M + H)<sup>+</sup> 392.1757, found 392.1754.

#### 4.1.39. 5-(3-Aminophenyl)-6-(benzyloxy)-N-phenylpyridin-3-amine (64)

Compound **64** was prepared according to general procedure A, starting from **4** (121.6 mg, 0.342 mmol) and the corresponding

boronic acid. The mixture was refluxed for 15 h 30 min. The crude oil was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/cyclohexane 2:8 to 25:75) to give **64** (120.2 mg, 0.327 mmol, 96%) a light yellow oil. *R*<sub>f</sub> = 0.07 (EtOAc/cyclohexane 1:9); Mp 106 °C; IR (ATR) 3380, 1586, 1426, 1360, 1020, 754, 735, 693 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.02 (s, 1H), 7.93 (d, *J* = 2.8, 1H), 7.45 (d, *J* = 2.8, 1H), 7.43–7.39 (m, 2H), 7.37–7.32 (m, 2H), 7.30–7.25 (m, 1H), 7.20 (dd, *J* = 8.6, 7.4, 2H), 7.05 (t, *J* = 7.8, 1H), 6.96 (dd, *J* = 8.6, 1.1, 2H), 6.79–6.72 (m, 3H), 6.54 (ddd, *J* = 8.0, 2.3, 1.0, 1H), 5.36 (s, 2H), 5.11 (br s, 2H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 154.3 (C), 148.5 (C), 144.4 (C), 137.8 (C), 136.7 (C), 135.2 (CH), 134.3 (C), 130.2 (CH), 129.3 (2CH), 128.6 (CH), 128.3 (2CH), 127.4 (CH), 127.3 (2CH), 124.7 (C), 119.0 (CH), 116.6 (CH), 115.2 (2CH), 114.4 (CH), 113.2 (CH), 66.9 (CH<sub>2</sub>); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O (M + H)<sup>+</sup> 368.1757, found 368.1743.

#### 4.1.40. 6-(Benzyloxy)-5-(3-methoxyphenyl)-*N*-phenylpyridin-3-amine (**65**)

Compound **65** was prepared according to general procedure A, starting from **4** (114 mg, 0.321 mmol) and the corresponding boronic acid. The mixture was refluxed for 15 h 30 min. The crude oil was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, cyclohexane to EtOAc/cyclohexane 8:92) to give a mixture of **65** and 3-methoxyphenol. Ethyl acetate was added and the organic phase was washed with an 0.5 M NaOH aqueous solution of and then with water. The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and then evaporated to give **65** (106 mg, 0.277 mmol, 86%) a brown oil. *R*<sub>f</sub> = 0.57 (EtOAc/cyclohexane 2:8); IR (ATR) 3375, 1587, 1418, 1360, 1262, 1014, 864, 754, 693 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.06 (s, 1H), 8.00 (d, *J* = 2.7, 1H), 7.55 (d, *J* = 2.7, 1H), 7.44–7.41 (m, 2H), 7.38–7.27 (m, 4H), 7.23–7.18 (m, 3H), 7.14 (ddd, *J* = 7.7, 1.5, 1.0, 1H), 6.98 (dd, *J* = 8.6, 1.0, 2H), 6.91 (ddd, *J* = 8.3, 2.6, 0.9, 1H), 6.77 (tt, *J* = 7.3, 1.1, 1H), 5.36 (s, 2H), 3.72 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 158.9 (C), 154.3 (C), 144.4 (C), 137.6 (C), 137.4 (C), 135.7 (CH), 134.5 (C), 130.5 (CH), 129.31 (2CH), 129.30 (CH), 128.3 (2CH), 127.61 (2CH), 127.56 (CH), 123.6 (C), 121.2 (CH), 119.1 (CH), 115.1 (2CH), 114.3 (CH), 113.6 (CH), 67.1 (CH<sub>2</sub>), 55.0 (CH<sub>3</sub>); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for C<sub>25</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M + H)<sup>+</sup> 383.1751, found 383.1754.

#### 4.1.41. 5-(Phenylamino)-3-(quinolin-4-yl)pyridin-2(1H)-one (**66**)

Compound **66** was prepared according to general procedure C, starting from **46** (100 mg, 0.248 mmol). The mixture was stirred for 3 h and was quenched with NEt<sub>3</sub> (12 eq.) and MeOH (4 eq.). After evaporation, EtOAc was added. The mixture was washed with brine, then the organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, and filtered. After evaporation, the crude was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 98:2). EtOAc was added to the obtained product which was then washed with water to remove residual NEt<sub>3</sub> salts. The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated to give **66** (54 mg, 0.172 mmol, 69%) as a light brown solid. *R*<sub>f</sub> = 0.17 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5); Mp > 275 °C (decomposition); IR (ATR) 1627, 1592, 1561, 1479, 1337, 1255, 836, 742, 689 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.84 (br s, 1H), 8.91 (d, *J* = 4.4, 1H), 8.06 (d, *J* = 8.3, 1H), 7.80–7.74 (m, 2H), 7.60–7.55 (m, 2H), 7.49 (d, *J* = 3.0, 1H), 7.46 (d, *J* = 4.4, 1H), 7.38 (br s, 1H), 7.15 (dd, *J* = 8.6, 7.3, 2H), 6.80 (dd, *J* = 8.6, 1.0, 2H), 6.68 (tt, *J* = 7.3, 1.1, 1H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 159.0 (C), 150.1 (CH), 147.8 (C), 146.2 (C), 143.5 (C), 139.9 (CH), 129.30 (CH), 129.27 (CH), 129.25 (2CH), 128.7 (CH), 128.1 (C), 126.4 (CH), 126.3 (C), 126.0 (CH), 122.9 (C), 122.1 (CH), 118.1 (CH), 114.0 (2CH); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O (M + H)<sup>+</sup> 314.1288, found 314.1291; HPLC purity ≥ 96%, *t*<sub>R</sub> = 6.83 min, λ = 280 nm.

#### 4.1.42. 3-(1H-Indol-4-yl)-5-(phenylamino)pyridin-2(1H)-one (**67**)

Compound **67** was prepared according to general procedure C,

starting from **47** (96.6 mg, 0.247 mmol). The mixture was stirred for 6 h and was quenched with NEt<sub>3</sub> (15 eq.) and MeOH (5 eq.). After evaporation, EtOAc was added. The mixture was washed with H<sub>2</sub>O, dried over MgSO<sub>4</sub>, and filtered. After evaporation, the crude was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/cyclohexane 6:4 to 9:1) to give **67** (49.9 mg, 0.166 mmol, 67%) as a yellow solid. *R*<sub>f</sub> = 0.13 (EtOAc/cyclohexane 6:4); Mp > 143 °C (decomposition); IR (ATR) 3500–3000, 1595, 1495, 1333, 1250, 746, 691 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.56 (br s, 1H), 11.14 (s, 1H), 7.52 (d, *J* = 3.0, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.37–7.33 (m, 2H), 7.27 (dd, *J* = 7.3, 0.9, 1H), 7.20 (br s, 1H), 7.15 (dd, *J* = 8.5, 7.3, 2H), 7.09 (t, *J* = 7.7, 1H), 6.77 (dd, *J* = 8.6, 1.0, 2H), 6.68 (tt, *J* = 7.3, 1.1, 1H), 6.37–6.35 (m, 1H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 159.6 (C), 146.6 (C), 138.3 (CH), 136.1 (C), 130.6 (C), 129.2 (2CH), 128.3 (C), 126.7 (CH), 126.1 (C), 125.4 (CH), 122.5 (C), 120.5 (CH), 119.9 (CH), 117.9 (CH), 113.9 (2CH), 110.9 (CH), 100.5 (CH); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O (M + H)<sup>+</sup> 302.1288, found 302.1282. HPLC purity ≥ 95%, *t*<sub>R</sub> = 7.82 min, λ = 278 nm.

#### 4.1.43. 3-(2-Chlorophenyl)-5-(phenylamino)pyridin-2(1H)-one (**68**)

Compound **68** was prepared according to general procedure C, starting from **48** (82.1 mg, 0.212 mmol). The mixture was stirred for 2 h 40 min and was quenched with NEt<sub>3</sub> (12 eq.) and MeOH (6 eq.). The crude was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/cyclohexane 6:4 to 75:25). The product was washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to give **68** (31.4 mg, 0.106 mmol, 50%) as a light yellow-green powder. *R*<sub>f</sub> = 0.12 (EtOAc/cyclohexane 7:3); Mp > 231 °C; IR (ATR) 3267, 1654, 1593, 1563, 745, 696 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.64 (br s, 1H), 7.53–7.48 (m, 2H), 7.41–7.34 (m, 3H), 7.32 (d, *J* = 2.9, 1H), 7.27–7.23 (br s, 1H), 7.14 (dd, *J* = 8.5, 7.4, 2H), 6.75 (dd, *J* = 8.6, 1.0, 2H), 6.68 (tt, *J* = 7.3, 1.0, 1H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 158.9 (C), 146.4 (C), 139.4 (CH), 135.8 (C), 132.6 (C), 131.9 (CH), 129.5 (C), 129.3 (CH), 129.23 (CH), 129.22 (2CH), 128.0 (CH), 126.9 (CH), 122.3 (C), 118.0 (CH), 113.9 (2CH); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>2</sub>O (M + H)<sup>+</sup> 297.0789, found 297.0781; HPLC purity ≥ 98%, *t*<sub>R</sub> = 8.19 min, λ = 280 nm.

#### 4.1.44. 3-(2-Bromophenyl)-5-(phenylamino)pyridin-2(1H)-one (**69**)

Compound **69** was prepared according to general procedure C, starting from impure compound **49** (65 mg). The mixture was stirred for 3 h and was quenched with NEt<sub>3</sub> (13 eq.) and MeOH (7 eq.). After work-up, the crude was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/cyclohexane 7:3 to EtOAc). The product was washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to give **69** (18.6 mg, 0.055 mmol, 18% over 2 steps from **29**) as a white solid. *R*<sub>f</sub> = 0.32 (EtOAc); Mp > 236 °C (decomposition); IR (ATR) 3272, 1596, 744 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.63 (br s, 1H), 7.67 (d, *J* = 7.9, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.44–7.34 (m, 2H), 7.32–7.22 (m, 3H), 7.14 (t, *J* = 7.6, 2H), 6.75 (d, *J* = 7.9, 2H), 6.67 (t, *J* = 7.1, 1H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 158.8 (C), 146.4 (C), 139.3 (CH), 137.8 (C), 132.4 (CH), 131.8 (CH), 131.3 (C), 129.5 (CH), 129.2 (2CH), 127.9 (CH), 127.4 (CH), 123.2 (C), 122.3 (C), 118.0 (CH), 113.9 (2CH); HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>BrN<sub>2</sub>O (M + H)<sup>+</sup> 341.0284, found 341.0281; HPLC purity ≥ 95%, *t*<sub>R</sub> = 8.24 min, λ = 280 nm.

#### 4.1.45. Ethyl 2-(2-oxo-5-(phenylamino)-1,2-dihydropyridin-3-yl)benzoate (**70**)

Compound **70** was prepared according to general procedure C, starting from **50** (83.2 mg, 0.196 mmol). The mixture was stirred for 3 h and was quenched with NEt<sub>3</sub> (15 eq.) and MeOH (6 eq.). The crude was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/cyclohexane 5:5 to AcOEt) to give **70** (51.4 mg, 0.154 mmol, 78%) as a brown powder. *R*<sub>f</sub> = 0.28 (EtOAc); Mp > 83 °C (decomposition); IR (ATR) 3450–3150, 1705, 1595, 1495, 1283, 1250, 748, 693 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H

NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.54 (br s, 1H), 7.75 (dd,  $J = 7.5, 1.5, 1H$ ), 7.59 (td,  $J = 7.5, 1.4, 1H$ ), 7.51 (s, 1H), 7.45 (td,  $J = 7.6, 1.3, 1H$ ), 7.35–7.32 (m, 2H), 7.19–7.5 (br s, 1H), 7.14 (dd,  $J = 8.6, 7.3, 2H$ ), 6.74 (dd,  $J = 8.6, 1.1, 2H$ ), 6.67 (tt,  $J = 7.3, 1.0, 1H$ ), 4.10 (q,  $J = 7.1, 2H$ ), 1.13 (t,  $J = 7.1, 3H$ );  $^{13}C$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  167.1 (C), 159.7 (C), 146.6 (C), 136.9 (CH), 136.8 (C), 133.0 (C), 131.8 (CH), 131.7 (C), 130.5 (CH), 129.2 (2CH), 128.9 (CH), 127.7 (CH), 126.7 (CH), 122.5 (C), 117.9 (CH), 113.7 (2CH), 60.3 (CH<sub>2</sub>), 13.8 (CH<sub>3</sub>); HRMS (ESI+) calcd for C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (M + H)<sup>+</sup> 335.1390, found 335.1397; HPLC purity  $\geq 95\%$ ,  $t_R = 8.13$  min,  $\lambda = 272$  nm.

#### 4.1.46. 2-(2-Oxo-5-(phenylamino)-1,2-dihydropyridin-3-yl)benzamide (**71**)

Compound **71** was prepared according to general procedure C, starting from impure compound **51** (76.6 mg). The mixture was stirred for 5 h 30 min and was quenched with NEt<sub>3</sub> (10 eq.) and MeOH (6 eq.). After work-up, the crude was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/MeOH 95:5 to 85:15) to give **71** (24.6 mg, 0.081 mmol, 32% over 2 steps from **31**) as a yellow powder.  $R_f = 0.29$  (EtOAc/MeOH 85:15); Mp > 226 °C (decomposition); IR (ATR) 3500–3000, 1657, 1596, 1494, 746, 691 cm<sup>-1</sup>;  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.41 (br s, 1H), 7.65 (br s, 1H), 7.50–7.47 (m, 2H), 7.43 (td,  $J = 7.5, 1.5, 1H$ ), 7.36 (td,  $J = 7.5, 1.4, 1H$ ), 7.36–7.33 (m, 1H), 7.26 (d,  $J = 2.9, 1H$ ), 7.15 (dd,  $J = 8.5, 7.3, 2H$ ), 7.11 (br s, 2H), 6.75 (dd,  $J = 8.6, 1.0, 2H$ ), 6.66 (tt,  $J = 7.3, 1.1, 1H$ );  $^{13}C$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  170.4 (C), 159.5 (C), 146.4 (C), 137.4 (CH), 137.2 (C), 135.3 (C), 132.0 (C), 130.6 (CH), 129.2 (2CH), 129.1 (CH), 127.4 (CH), 127.2 (CH), 126.2 (CH), 122.4 (C), 117.8 (CH), 113.8 (2CH); HRMS (ESI+) calcd for C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (M + H)<sup>+</sup> 306.1237, found 306.1233; HPLC purity  $\geq 94\%$ ,  $t_R = 6.88$  min,  $\lambda = 294$  nm.

#### 4.1.47. 3-(2-Nitrophenyl)-5-(phenylamino)pyridin-2(1H)-one (**72**)

Compound **72** was prepared according to general procedure C, starting from **52** (80.5 mg, 0.203 mmol). The mixture was stirred for 4 h and was quenched with NEt<sub>3</sub> (18 eq.) and MeOH (6 eq.). After work-up, the crude was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/cyclohexane 3:7 to 5:5) to give **72** (55.6 mg, 0.181 mmol, 89%) as a red powder.  $R_f = 0.58$  (Acetone/cyclohexane 5:5); Mp > 224 °C (decomposition); IR (ATR) 3375, 1658, 1597, 1519, 1488, 1465, 1336, 741, 695 cm<sup>-1</sup>;  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.63 (br s, 1H), 7.98 (dd,  $J = 8.1, 1.3, 1H$ ), 7.75 (td,  $J = 7.6, 1.3, 1H$ ), 7.60 (ddd,  $J = 8.1, 7.5, 1.4, 1H$ ), 7.56 (br s, 1H), 7.55 (d,  $J = 2.9, 1H$ ), 7.51 (dd,  $J = 7.6, 1.5, 1H$ ), 7.23 (br s, 1H), 7.16 (dd,  $J = 8.5, 7.3, 2H$ ), 6.77 (dd,  $J = 8.6, 1.0, 2H$ ), 6.69 (tt,  $J = 7.3, 1.1, 1H$ );  $^{13}C$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  158.6 (C), 148.9 (C), 146.3 (C), 137.7 (CH), 133.5 (CH), 132.1 (CH), 131.0 (C), 129.7 (C), 129.3 (2CH), 129.1 (CH), 127.4 (CH), 123.9 (CH), 122.6 (C), 118.0 (CH), 133.9 (2CH); HRMS (ESI+) calcd for C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (M + H)<sup>+</sup> 308.1030, found 308.1030; HPLC purity  $\geq 97\%$ ,  $t_R = 8.07$  min,  $\lambda = 276$  nm.

#### 4.1.48. 3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-5-(phenylamino)pyridin-2(1H)-one (**73**)

Compound **73** was prepared according to general procedure C, starting from **53** (77.6 mg, 0.181 mmol) and the corresponding boronic acid. The mixture was stirred for 3 h and was quenched with NEt<sub>3</sub> (14 eq.) and MeOH (7 eq.). After evaporation, EtOAc was added. A precipitate appeared in the organic phase and was filtered and washed with EtOAc and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to give **73** (48.8 mg, 0.144 mmol, 80%) was obtained as a beige solid.  $R_f = 0.09$  (EtOAc/cyclohexane 5:5); Mp > 245 °C (decomposition); IR (ATR) 3412, 1599, 749, 691 cm<sup>-1</sup>;  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.67 (br s, 1H), 7.85 (d,  $J = 7.8, 2H$ ), 7.73–7.66 (m, 4H), 7.60 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.48 (t,  $J = 7.3, 2H$ ), 7.37 (t,  $J = 6.8, 1H$ ), 7.21 (s, 1H), 7.15 (t,  $J = 7.5, 2H$ ), 6.76 (d,  $J = 7.8, 2H$ ), 6.68 (t,  $J = 7.2, 1H$ );  $^{13}C$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  159.5 (C), 146.5 (C), 139.8 (C), 139.1 (C), 137.4 (CH), 135.6

(C), 129.4 (C), 129.2 (2CH), 129.0 (2CH), 128.7 (2CH), 127.5 (CH), 127.1 (CH), 126.6 (2CH), 126.2 (2CH), 122.8 (C), 117.9 (CH), 113.8 (2CH); HRMS (ESI+) calcd for C<sub>23</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O (M + H)<sup>+</sup> 339.1492, found 339.1487; HPLC purity  $\geq 97\%$ ,  $t_R = 9.16$  min,  $\lambda = 284$  nm.

#### 4.1.49. 3-(3-Chlorophenyl)-5-(phenylamino)pyridin-2(1H)-one (**74**)

Compound **74** was prepared according to general procedure C, starting from **54** (78.8 mg, 0.204 mmol). The mixture was stirred for 2 h 40 min and was quenched with NEt<sub>3</sub> (10 eq.) and MeOH (6 eq.). The crude was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/cyclohexane 5:5 to 7:3) to give **74** (55.4 mg, 0.187 mmol, 92%) as a yellow-brown powder.  $R_f = 0.34$  (EtOAc/cyclohexane 7:3); Mp > 187 °C (decomposition); IR (ATR) 3275, 1596, 1547, 1449, 1350, 1286, 746, 703, 683 cm<sup>-1</sup>;  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.75 (br s, 1H), 7.89 (t,  $J = 1.7, 1H$ ), 7.66 (dt,  $J = 7.4, 1.6, 1H$ ), 7.62 (d,  $J = 2.9, 1H$ ), 7.51 (s, 1H), 7.41 (t,  $J = 7.7, 1H$ ), 7.37 (ddd,  $J = 8.0, 2.0, 1.5, 1H$ ), 7.23 (d,  $J = 2.9, 1H$ ), 7.15 (dd,  $J = 8.6, 7.3, 2H$ ), 6.75 (dd,  $J = 8.6, 1.1, 2H$ ), 6.68 (tt,  $J = 7.3, 1.1, 1H$ );  $^{13}C$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  159.3 (C), 146.4 (C), 138.5 (C), 138.2 (CH), 132.6 (C), 129.9 (CH), 129.2 (2CH), 128.1 (C), 127.9 (CH), 127.8 (CH), 127.3 (CH), 126.6 (CH), 122.8 (C), 118.0 (CH), 113.8 (2CH); HRMS (ESI+) calcd for C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>2</sub>O (M + H)<sup>+</sup> 297.0789, found 297.0796; HPLC purity  $\geq 99\%$ ,  $t_R = 8.59$  min,  $\lambda = 284$  nm.

#### 4.1.50. 3-(3-Acetylphenyl)-5-(phenylamino)pyridin-2(1H)-one (**75**)

To a solution under argon of **55** (46 mg, 0.117 mmol, 1 eq.) in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.75 mL) was added dropwise iodotrimethylsilane (20  $\mu$ L, 0.141 mmol, 1.2 eq.). The mixture was stirred at room temperature overnight. Due to the presence of residual starting material **55**, additional iodotrimethylsilane (10  $\mu$ L, 0.07 mmol, 0.6 eq.) was added and the mixture was stirred for 2 h. The reaction was quenched by addition of NEt<sub>3</sub> (0.05 mL) and MeOH (0.75 mL) and the mixture was concentrated. Ethyl acetate was added and the organic phase was washed with water, dried over MgSO<sub>4</sub> and filtered. After evaporation under reduced pressure, the crude was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, acetone/cyclohexane 4:6 to 45:55) to give **75** (25 mg, 0.082 mmol, 70%) as a yellow powder.  $R_f = 0.53$  (acetone/cyclohexane 6:4); Mp > 188 °C (decomposition); IR (ATR) 3310, 1673, 1621, 1599, 1243, 752, 697 cm<sup>-1</sup>;  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.74 (br s, 1H), 8.28 (t,  $J = 1.8, 1H$ ), 8.00 (ddd,  $J = 7.8, 1.8, 1.2, 1H$ ), 7.91 (ddd,  $J = 7.8, 1.8, 1.2, 1H$ ), 7.63 (d,  $J = 3.0, 1H$ ), 7.54 (t,  $J = 7.8, 1H$ ), 7.53 (s, 1H), 7.24 (d,  $J = 2.8, 1H$ ), 7.15 (dd,  $J = 8.6, 7.3, 2H$ ), 6.75 (dd,  $J = 8.7, 1.1, 2H$ ), 6.68 (tt,  $J = 7.3, 1.1, 1H$ ), 2.60 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  197.9 (C), 159.4 (C), 146.5 (C), 138.1 (CH), 136.8 (C), 136.6 (C), 132.9 (CH), 129.3 (2CH), 129.0 (C), 128.4 (CH), 127.9 (CH), 127.6 (CH), 127.3 (CH), 122.9 (C), 118.0 (CH), 113.8 (2CH), 26.9 (CH<sub>3</sub>); HRMS (ESI+) calcd for C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M + H)<sup>+</sup> 305.1285, found 305.1277; HPLC purity  $\geq 98\%$ ,  $t_R = 7.99$  min,  $\lambda = 282$  nm.

#### 4.1.51. 3-(4-Hydroxyphenyl)-5-(phenylamino)pyridin-2(1H)-one (**76**)

Compound **76** was prepared according to general procedure C, starting from **56** (90 mg, 0.24 mmol). The mixture was stirred for 2 h and was quenched with NEt<sub>3</sub> (27 eq.) and MeOH (9 eq.). After evaporation, EtOAc was added. The mixture was washed with water and brine. The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated. The crude was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, EtOAc) to give **76** (62 mg, 0.22 mmol, 91%) as a yellow solid.  $R_f = 0.29$  (EtOAc); Mp > 238 °C (decomposition); IR (ATR) 3415, 3374, 1598, 1513, 1495, 1173, 1163, 862, 834, 750 cm<sup>-1</sup>;  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.50 (br s, 1H), 9.51 (s, 1H), 7.57 (d,  $J = 8.8, 2H$ ), 7.46 (s, 1H), 7.42 (d,  $J = 2.9, 1H$ ), 7.14 (dd,  $J = 8.5, 7.3, 2H$ ), 7.11 (d,  $J = 2.9, 1H$ ), 6.76 (d,  $J = 8.8, 2H$ ), 6.73 (dd,  $J = 8.6, 1.0, 2H$ ), 6.67 (tt,

$J = 7.3, 1.0, 1\text{H}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  159.7 (C), 157.0 (C), 146.6 (C), 136.0 (CH), 130.0 (C), 129.4 (2CH), 129.2 (2CH), 127.2 (C), 125.8 (CH), 122.7 (C), 117.8 (CH), 114.7 (2CH), 113.8 (2CH); HRMS (ESI+) calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$  ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$  279.1128, found 279.1132; HPLC purity  $\geq 97\%$ ,  $t_{\text{R}} = 7.34$  min,  $\lambda = 284$  nm.

#### 4.1.52. 5-(Phenylamino)-3-(*p*-tolyl)pyridin-2(1H)-one (77)

Compound **77** was prepared according to general procedure C, starting from **57** (80.3 mg, 0.219 mmol). The mixture was stirred for 3 h and was quenched with  $\text{NEt}_3$  (13 eq.) and MeOH (6 eq.). After evaporation, EtOAc was added. The mixture was washed with water and brine. The organic phase was dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and evaporated. The crude was purified by column chromatography ( $\text{SiO}_2$ , EtOAc/cyclohexane 5:5 to EtOAc/cyclohexane 8:2) to give **77** (58.3 mg, 0.211 mmol, 96%) as a yellow powder.  $R_f = 0.17$  (EtOAc/cyclohexane 7:3); Mp > 195 °C (decomposition); IR (ATR) 3290, 1586, 1550, 818, 797, 744, 622  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.59 (br s, 1H), 7.62 (d,  $J = 8.2, 2\text{H}$ ), 7.49 (s, 1H), 7.48 (d,  $J = 2.8, 1\text{H}$ ), 7.21–7.11 (m, 5H), 6.74 (dd,  $J = 8.6, 1.0, 2\text{H}$ ), 6.67 (tt,  $J = 7.3, 1.1, 1\text{H}$ ), 2.31 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  159.6 (C), 146.5 (C), 137.0 (CH), 136.8 (C), 133.6 (C), 129.9 (C), 129.2 (2CH), 128.5 (2CH), 128.0 (2CH), 126.7 (CH), 122.8 (C), 117.9 (CH), 113.80 (2CH), 20.8 (CH $_3$ ); HRMS (ESI+) calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}$  ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$  277.1335, found 277.1338; HPLC purity  $\geq 97\%$ ,  $t_{\text{R}} = 8.46$  min,  $\lambda = 284$  nm.

#### 4.1.53. 5-(Phenylamino)-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)pyridin-2(1H)-one (78)

Compound **78** was prepared according to general procedure C, starting from **58** (110 mg, 0.26 mmol). The mixture was stirred for 2 h and was quenched with  $\text{NEt}_3$  (27 eq.) and MeOH (9 eq.). After work-up, the crude was purified by column chromatography ( $\text{SiO}_2$ , EtOAc/cyclohexane 8:2) to give **78** (82 mg, 0.25 mmol, 95%) as a yellow solid.  $R_f = 0.45$  (EtOAc/cyclohexane 8:2); Mp > 229 °C (decomposition); IR (ATR) 3292, 1595, 1550, 1455, 1318, 1167, 1123, 1111, 1068, 834, 750  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.77 (br s, 1H), 7.98 (d,  $J = 8.1, 2\text{H}$ ), 7.73 (d,  $J = 8.3, 2\text{H}$ ), 7.66 (d,  $J = 2.9, 1\text{H}$ ), 7.52 (br s, 1H), 7.27 (d,  $J = 2.9, 1\text{H}$ ), 7.15 (dd,  $J = 8.6, 7.3, 2\text{H}$ ), 6.76 (dd,  $J = 8.6, 1.0, 2\text{H}$ ), 6.69 (tt,  $J = 7.3, 1.0, 1\text{H}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  159.3 (C), 146.4 (C), 140.5 (C), 138.6 (CH), 129.2 (2CH), 128.8 (2CH), 128.3 (CH), 128.1 (C), 127.6 (q,  $J_{\text{CF}} = 32, \text{C}$ ), 124.8 (q,  $J_{\text{CF}} = 4, 2\text{CH}$ ), 124.3 (q,  $J_{\text{CF}} = 272, \text{C}$ ), 122.9 (C), 118.0 (CH), 113.8 (2CH); HRMS (ESI+) calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}$  ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$  331.1053, found 331.1042; HPLC purity  $\geq 97\%$ ,  $t_{\text{R}} = 8.73$  min,  $\lambda = 284$  nm.

#### 4.1.54. 5-(Phenylamino)-3-(4-(trifluoromethoxy)phenyl)pyridin-2(1H)-one (79)

Compound **79** was prepared according to general procedure C, starting from **59** (68 mg, 0.156 mmol). The mixture was stirred for 3 h 40 min and was quenched with  $\text{NEt}_3$  (14 eq.) and MeOH (8 eq.). After work-up, the crude was purified by column chromatography ( $\text{SiO}_2$ , EtOAc/cyclohexane 8:2) to give **79** (49.2 mg, 0.142 mmol, 91%) as a yellow solid.  $R_f = 0.55$  (EtOAc); Mp > 210 °C (decomposition); IR (ATR) 3282, 1595, 1549, 1454, 1208, 1152, 910, 806, 744  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.74 (br s, 1H), 7.87 (d,  $J = 8.9, 2\text{H}$ ), 7.59 (d,  $J = 2.9, 1\text{H}$ ), 7.51 (s, 1H), 7.37 (d,  $J = 8.4, 2\text{H}$ ), 7.22 (d,  $J = 2.8, 1\text{H}$ ), 7.14 (dd,  $J = 8.5, 7.4, 2\text{H}$ ), 6.75 (dd,  $J = 8.6, 1.0, 2\text{H}$ ), 6.68 (tt,  $J = 7.3, 1.0, 1\text{H}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  159.4 (C), 147.5 (q,  $J = 2, \text{C}$ ), 146.5 (C), 138.0 (CH), 135.7 (C), 130.1 (2CH), 129.2 (2CH), 128.4 (C), 127.7 (CH), 122.8 (C), 120.5 (2CH), 120.1 (q,  $J = 256, \text{C}$ ), 118.0 (CH), 113.8 (2CH); HRMS (ESI+) calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2$  ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$  347.1002, found 347.1002; HPLC purity  $\geq 97\%$ ,  $t_{\text{R}} = 8.80$  min,  $\lambda = 284$  nm.

#### 4.1.55. Methyl 4-(2-oxo-5-(phenylamino)-1,2-dihydropyridin-3-yl)benzoate (80)

Compound **80** was prepared according to general procedure C, starting from **60** (51.4 mg, 0.125 mmol). The mixture was stirred for 5 h 20 min and was quenched with  $\text{NEt}_3$  (29 eq.) and MeOH (10 eq.). After work-up, the crude was purified by column chromatography ( $\text{SiO}_2$ , EtOAc/cyclohexane 9:1 to AcOEt) to give **80** (36.3 mg, 0.113 mmol, 90%) as a yellow-brown solid.  $R_f = 0.31$  (EtOAc); Mp > 230 °C (decomposition); IR (ATR) 3375, 1694, 1593, 1274, 1106, 746, 706, 689  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.79 (br s, 1H), 7.96 (d,  $J = 8.5, 2\text{H}$ ), 7.91 (d,  $J = 8.5, 2\text{H}$ ), 7.65 (d,  $J = 2.9, 1\text{H}$ ), 7.53 (s, 1H), 7.26 (d,  $J = 2.9, 1\text{H}$ ), 7.15 (dd,  $J = 8.6, 7.3, 2\text{H}$ ), 6.75 (dd,  $J = 8.6, 1.1, 2\text{H}$ ), 6.68 (tt,  $J = 7.3, 1.1, 1\text{H}$ ), 3.86 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  166.1 (C), 159.3 (C), 146.5 (C), 141.2 (C), 138.6 (CH), 129.3 (2CH), 128.9 (2CH), 128.5 (C), 128.34 (3CH), 128.27 (C), 122.9 (C), 118.0 (CH), 113.8 (2CH), 52.2 (CH $_2$ ); HRMS (ESI+) calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3$  ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$  321.1234, found 321.1230; HPLC purity  $\geq 97\%$ ,  $t_{\text{R}} = 8.22$  min,  $\lambda = 284$  nm.

#### 4.1.56. 4-(2-Oxo-5-(phenylamino)-1,2-dihydropyridin-3-yl)benzamide (81)

Compound **81** was prepared according to general procedure C, starting from impure compound **61** (101 mg). The mixture was stirred for 23 h and was quenched with  $\text{NEt}_3$  (14 eq.) and MeOH (5 eq.). After work-up, the crude was purified by column chromatography ( $\text{SiO}_2$ , acetone/cyclohexane 5:5 to acetone) to give **81** (55.3 mg, 0.181 mmol, 74% over 2 steps from **41**) as a yellow-brown solid.  $R_f = 0.14$  (acetone/cyclohexane 5:5); Mp > 222 °C (decomposition); IR (ATR) 3421, 3272, 3252, 3162, 1664, 1596, 1393, 846, 758, 698  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.73 (br s, 1H), 7.98 (br s, 1H), 7.88 (d,  $J = 8.5, 2\text{H}$ ), 7.81 (d,  $J = 8.5, 2\text{H}$ ), 7.61 (d,  $J = 2.9, 1\text{H}$ ), 7.52 (s, 1H), 7.36 (br s, 1H), 7.23 (br s, 1H), 7.15 (dd,  $J = 8.5, 7.4, 2\text{H}$ ), 6.75 (d,  $J = 8.0, 2\text{H}$ ), 6.68 (t,  $J = 7.3, 1\text{H}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  167.6 (C), 159.4 (C), 146.5 (C), 139.2 (C), 138.1 (CH), 133.0 (C), 129.3 (2CH), 129.0 (C), 127.9 (2CH), 127.8 (CH), 127.2 (2CH), 122.9 (C), 118.0 (CH), 113.8 (2CH); HRMS (ESI+) calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_2$  ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$  306.1237, found 306.1232; HPLC purity  $\geq 96\%$ ,  $t_{\text{R}} = 6.97$  min,  $\lambda = 284$  nm.

#### 4.1.57. 3-(2,4-Difluorophenyl)-5-(phenylamino)pyridin-2(1H)-one (82)

Compound **82** was prepared according to general procedure C, starting from impure compound **62** (65 mg). The mixture was stirred for 2 h 30 min and was quenched with  $\text{NEt}_3$  (13 eq.) and MeOH (7 eq.). After work-up, the crude was purified by column chromatography ( $\text{SiO}_2$ , EtOAc/cyclohexane 5:5 to 7:3) to give **82** (39.7 mg, 0.133 mmol, 62% over 2 steps from **42**) as a green powder.  $R_f = 0.25$  (EtOAc/cyclohexane 7:3); Mp > 202 °C (decomposition); IR (ATR) 3290, 1593, 1544, 1496, 1454, 1444, 1424, 1362, 1265, 1100, 819, 750  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.71 (br s, 1H), 7.59 (dt,  $J = 8.6, 6.8, 1\text{H}$ ), 7.51 (br s, 1H), 7.43 (d,  $J = 2.9, 1\text{H}$ ), 7.28 (ddd,  $J = 10.6, 9.5, 2.6, 1\text{H}$ ), 7.27–7.23 (br s, 1H), 7.14 (t,  $J = 7.9, 2\text{H}$ ), 7.15–7.08 (m, 1H), 6.74 (d,  $J = 8.0, 2\text{H}$ ), 6.68 (t,  $J = 7.3, 1\text{H}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  161.8 (dd,  $J_{\text{CF}} = 247, 12.5, \text{C}$ ), 160.8 (dd,  $J_{\text{CF}} = 249, 12.5, \text{C}$ ), 158.9 (C), 146.4 (C), 139.7 (CH), 132.8 (dd,  $J_{\text{CF}} = 10, 5, \text{CH}$ ), 129.2 (2CH), 128.1 (CH), 124.8 (C), 122.4 (C), 120.8 (dd,  $J_{\text{CF}} = 14.5, 4, \text{C}$ ), 118.0 (CH), 113.8 (2CH), 111.1 (dd,  $J_{\text{CF}} = 21, 3.5, \text{CH}$ ), 104.0 (t,  $J_{\text{CF}} = 26, \text{CH}$ ); HRMS (ESI+) calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}$  ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$  299.0991, found 299.0992; HPLC purity  $\geq 97\%$ ,  $t_{\text{R}} = 8.19$  min,  $\lambda = 282$  nm.

## 4.2. Anti-allodynic activity

### 4.2.1. Study approval

The experiments followed the ethical guidelines of the



International Association for the Study of Pain [31] and ethical guidelines of the Directive 2010/63/UE of the European Parliament and of the Council and French Decree 2013–118 on the protection of animals used for scientific purposes. Protocols used in this study were approved by the local animal experimentation committee: CEMEA “Comité d’Ethique en Matière d’Expérimentation Animale Auvergne” (#CE 28–12) and the French Ministry for Research.

#### 4.2.2. Face Complete Freund’s adjuvant (CFA) model

CFA (Becton Dickinson) was dissolved in saline solution containing Tween 80 and paraffin oil and conserved at 4 °C. For the behavioral tests, animals were briefly (<2 min) anesthetized using a mask with 2% isoflurane and received a subcutaneous injection of 25 µL of CFA (2.5 mg/kg) solution into the right vibrissa pad using a 27 Ga needle coupled to a 25 µL Hamilton syringe, as described previously. After injection, animals were awakened from anesthesia and placed in the behavioral experimental room, followed by a 120 min mechanical testing period.

#### 4.2.3. Rat model of neuropathic MA: chronic constriction injury of the rat’s infraorbital nerve (IoN-CCI)

IoN-CCI was performed following a previously established surgical procedure [29]. Briefly, after animals were anesthetized using chloral hydrate (400 mg/kg i.p.), IoN was exposed just caudal to the vibrissal pad and two ligatures (4/0 chromic catgut) were loosely tied around the nerve just cranial to its exit from the infraorbital foramen. The ligatures were separated by a 1 mm interval. This procedure was performed under 16× surgical microscope magnification (Jenoptik, Germany) to allow for the control of the degree of nerve constriction. The nerve diameter was only slightly reduced and ligatures diminished, but did not occlude circulation through the superficial vasculature. Skin incision was closed with single suture points (4/0 nylon).

#### 4.2.4. Intracisternal injection

For investigating the effects of synthesized compounds upon mechanical allodynia, animals were briefly (<2 min) anesthetized using a mask with 2% isoflurane and received an intracisternal injection of 5 µL of compound (100 µM) or vehicle alone (saline + 1% DMSO) using a 10 µL Hamilton syringe [13]. After recovery (<2 min), rats were placed in an observation field (0.6 × 0.6 m square) under red light for a period test. 6-g von Frey filament was gently applied every 15 or 30 min onto the orofacial region by a first experimenter. The behavioral responses were observed and quantified by a second experimenter (see below).

#### 4.2.5. Behavioral responses to normally innocuous static (6-g von frey filament) mechanical stimulation

The behavioral responses procedure was previously developed by Vos et al. [29]. A rat’s response to mechanical stimulation consisted of one or more of the following elements: (1) detection, rat turn head toward stimulus; (2) withdrawal reaction, rat pull paw away or turn head away or pull it briskly backward when stimulation is applied (a withdrawal reaction is assumed to include a detection element preceding the head withdrawal and therefore consists of two responses elements); (3) escape/attack, rats avoid further contact with the stimulus, either passively by moving their bodies away from the stimulus, or actively by attacking the tip of the pump; (4) asymmetric grooming, rats display an uninterrupted series of at least three wash strokes directed to the stimulated area.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have

appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgments

We acknowledge CNRS and Université Clermont Auvergne (PEPS de site Clermont-Ferrand 2015), and the Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche for providing research facilities and financial support.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111917>.

#### Abbreviations

CFA	complete Freund’s adjuvant
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
IoN-CCI	chronic constriction injury of the rat’s infraorbital nerve
MA	mechanical allodynia
MDH	medullary dorsal horn
p38 MAPK	p38 mitogen-activated protein kinases
PDB	protein data bank
PK	protein kinases
PKC	protein kinase C
SDH	spinal dorsal horn

#### References

- [1] N. Henschke, S.J. Kamper, C.G. Maher, The epidemiology and economic consequences of pain, *Mayo Clin. Proc.* 90 (2015) 139–147.
- [2] F.M. Blyth, D.A. Van Der Windt, P.R. Croft, Chronic disabling pain: a significant public health problem, *Am. J. Prev. Med.* 49 (2015) 98–101.
- [3] D.S. Goldberg, S.J. McGee, Pain as a global public health priority, *BMC Public Health* 11 (2011) 770.
- [4] H. Breivik, E. Eisenberg, T. O’Brien, The individual and societal burden of chronic pain in Europe: the case for strategic prioritisation and action to improve knowledge and availability of appropriate care, *BMC Public Health* 12 (2013) 1229.
- [5] D.J. Gaskin, P. Richard, The economic costs of pain in the United States, *J. Pain* 13 (2012) 715–724.
- [6] D. Borsook, R. Hargreaves, C. Bountra, F. Porreca, Lost but making progress—where will new analgesic drugs come from? *Sci. Transl. Med.* 6 (2014) 249sr3.
- [7] G. Burgess, D. Williams, The discovery and development of analgesics: new mechanisms, new modalities, *J. Clin. Investig.* 120 (2010) 3753–3759.
- [8] D. Bouhassira, N. Attal, H. Alchaar, F. Boureau, B. Brochet, J. Bruzelle, G. Cunin, J. Fermandjian, P. Ginies, A. Grun-Overdyking, H. Jafari-Schluep, M. Lantéri-Minet, B. Laurent, G. Mick, A. Serrie, D. Valade, E. Vicaut, Comparison of pain syndromes associated with nervous or somatic lesions and development of a new neuropathic pain diagnostic questionnaire (DN4), *Pain* 114 (2005) 29–36.
- [9] T.S. Jensen, N.B. Finnerup, Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms, *Lancet Neurol.* 13 (2014) 924–935.
- [10] R.R. Ji, R.W.I.V. Gereau, M. Malcangio, G.R. Strichartz, MAP kinase and pain, *Brain Res. Rev.* 60 (2009) 135–148.
- [11] A.B. Malmberg, C. Chen, S. Tonegawa, A.I. Basbaum, Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC $\gamma$ , *Science* 278 (1997) 279–283.
- [12] L.S. Mirauccourt, R. Dallel, D.L. Voisin, Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through PKC $\gamma$  interneurons, *PLoS One* 2 (2007) e1116.
- [13] L.S. Mirauccourt, X. Moisset, R. Dallel, D.L. Voisin, Glycine inhibitory dysfunction induces a selectively dynamic, morphine-resistant, and neurokinin 1 receptor-independent mechanical allodynia, *J. Neurosci.* 29 (2009) 2519–2527.
- [14] N. Pham Dang, A. Descheemaeker, R. Dallel, A. Artola, Activation of medullary dorsal horn c isoform of protein kinase C interneurons is essential to the development of both static and dynamic facial mechanical allodynia, *Eur. J. Neurosci.* 43 (2016) 802–810.
- [15] C. Peirs, N. Bourgois, A. Artola, R. Dallel, Protein kinase C  $\gamma$  interneurons mediate C-fiber-induced orofacial secondary static mechanical allodynia, but not C-fiber-induced nociceptive behavior, *Anesthesiology* 124 (2016) 1136–1152.
- [16] C.I. Svensson, B. Fitzsimmons, S. Azizi, H.C. Powell, X.Y. Hua, T.L. Yaksh, Spinal p38 $\beta$  isoform mediates tissue injury-induced hyperalgesia and spinal sensitization, *J. Neurochem.* 92 (2005) 1508–1520.
- [17] T. Berta, C.K. Park, Z.Z. Xu, R.G. Xie, T. Liu, N. Lu, Y.C. Liu, R.R. Ji, Extracellular

- caspase-6 drives murine inflammatory pain via microglial TNF- $\alpha$  secretion, *J. Clin. Investig.* 124 (2014) 1173–1186.
- [18] S. Taves, T. Berta, D.L. Liu, S. Gan, G. Chen, Y.H. Kim, T. Van de Ven, S. Laufer, R.R. Ji, Spinal inhibition of p38 MAP kinase reduces inflammatory and neuropathic pain in male but not female mice: sex-dependent microglial signaling in the spinal cord, *Brain Behav. Immun.* 55 (2016) 70–81.
- [19] S.X. Jin, Z.Y. Zhuang, C.J. Woolf, R.R. Ji, p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain, *J. Neurosci.* 23 (2003) 4017–4022.
- [20] M. Tsuda, A. Mizokoshi, Y. Shigemoto-Mogami, S. Koizumi, K. Inoue, Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury, *Glia* 45 (2004) 89–95.
- [21] N. Grodsky, Y. Li, D. Bouzida, R. Love, J. Jensen, B. Nodes, J. Nonomiya, S. Grant, Structure of the catalytic domain of human protein kinase C  $\beta$  II complexed with a bisindolylmaleimide inhibitor, *Biochemistry* 45 (2006) 13970–13981.
- [22] Castro Palomino Laria, J. C.; Terricabras Belart, E.; Erra Sola, M; Navarro Romero, E.; Fonquerna Pou, S; Cardus Figueras, A.; Lozoya Toribio, M. E. Azabiphenylaminobenzoic acid derivatives as DHODH inhibitors. Patent Appl., WO2009021696, 2009.
- [23] Hotta, M.; Sawada, Y.; Kawada, A.; Jikumaru, M.; Matsumoto, M. Nitrogen-containing aromatic compound, organic semiconductor material, and organic electronic device. Patent Appl., EP 2617724, 2013.
- [24] K. Wada, T. Mizutani, S. Kitagawa, Synthesis of functionalized porphyrins as oxygen ligand receptors, *J. Org. Chem.* 68 (2003) 5123–5131.
- [25] Baraldi, P. G.; Borea, P. A.; Pierangelo, G.; Pavani, M. G.; Fruttarolo, F.; Trevisani, M. Biarylcarboxyarylamides as vanilloid-1 receptor modulators. Patent Appl., WO2008006480, 2008.
- [26] C. Alba-Delgado, S. Mountadem, N. Mermet-Joret, L. Monconduit, R. Dallel, A. Artola, M. Antri, 5-HT<sub>2A</sub> receptor-induced morphological reorganization of PKC $\gamma$ -expressing interneurons gates inflammatory mechanical allodynia in rat, *J. Neurosci.* 38 (2018) 10489–10504.
- [27] J. Bain, L. Plater, M. Elliott, N. Shpiro, J. Hastie, H. McLauchlan, I. Klervernic, S.C. Arthur, D.R. Alessi, P. Cohen, The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update, *Biochem. J.* 408 (2007) 297–315.
- [28] M. Prieto, S. Mayor, K. Rodríguez, P. Lloyd-Williams, E. Giralt, Racemization in Suzuki couplings: a quantitative study using 4-hydroxyphenylglycine and tyrosine derivatives as probe molecules, *J. Org. Chem.* 72 (2007) 1047–1050.
- [29] B.P. Vos, A.M. Strassman, R.J. Maciewicz, Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve, *J. Neurosci.* 14 (1994) 2708–2723.
- [30] M. Chartier, T. Chenard, J. Barker, R. Najmanovich, Kinome Render: a stand-alone and web-accessible tool to annotate the human protein kinome tree, *PeerJ* 1 (2013) e126.
- [31] M. Zimmerman, Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals, *Pain* 16 (1983) 109–110.



**DISCUSSION**

**&**

**CONCLUSION**



Ces résultats montrent que la Cdk5 régule le passage de l'information mécanique dans le Sp5C en conditions naïves comme sensibilisées.

### ***Cdk5 et transmission de la sensibilité mécanique en condition basale***

L'électrophysiologie *in vivo* montre que l'activation tonique de la Cdk5 est nécessaire à la transmission basale de l'information mécanique principalement nociceptive, à haut seuil, mais aussi, en partie, à bas seuil, et celle véhiculée par les fibres afférentes de type C. Il est à noter que parmi les réponses à une stimulation mécanique à bas seuil, seule celle à une stimulation statique (filament de von Frey) nécessite l'activation de la Cdk5.

Notre étude immunohistochimique du ganglion trigéminal confirme que le complexe Cdk5/p35 est présent uniquement dans les somas des neurones ganglionnaires de petit diamètre (Ito *et al.*, 1994; Terada *et al.*, 1998; Pareek *et al.*, 2006 ; Yang *et al.*, 2007). Notre étude révèle en plus que ce complexe est présent dans tous les neurones ganglionnaires de type C : les nocicepteurs, peptidergique et non-peptidergique, comme les neurones C-LTMR. Ceci est en accord avec notre observation que la réponse des neurones WDR à une stimulation mécanique dynamique à bas seuil (pinceau) est préservée en présence de roscovitine. En effet, on sait que cette information mécanique dynamique est véhiculée par, spécifiquement, les fibres A $\beta$  (Koltzenburg *et al.*, 1992; Ochoa *et al.*, 1993). De plus, ce type de réponse est préservé chez des souris chez lesquelles le gène codant pour le transporteur vésiculaire au glutamate de type 3 (VGLUT3<sup>-/-</sup>), spécifique des neurones de 1<sup>er</sup> ordre de type C-LTMRs, a été inactivé (Seal *et al.*, 2009).

### ***Cdk5 et transmission de la sensibilité mécanique après une lésion inflammatoire périphérique.***

L'application préventive locale de roscovitine, juste avant une lésion inflammatoire périphérique, supprime toutes douleurs spontanées et allodynies mécaniques, statique et dynamique. Par contre, la roscovitine n'a plus aucun effet en présence d'une hypersensibilité à la douleur mécanique. Cela suggère que l'activation de la Cdk5 est nécessaire à l'induction, mais pas au maintien, de la sensibilisation centrale dans le Sp5C responsable de la l'hypersensibilité à la douleur mécanique en conditions inflammatoires.

Cette conclusion est confirmée par l'électrophysiologie *in vivo*. L'application préventive de roscovitine supprime bien toutes sensibilisations des neurones WDR – aux stimulations mécaniques, statique et dynamique, à bas et haut seuil, et électriques des fibres afférentes de type C – à la suite d'une lésion inflammatoire tissulaire. Par contre, cette même application n'a plus aucun effet sur les réponses sensibilisées. Notre conclusion est aussi cohérente avec l'analyse en Western blot. En effet, l'expression

des activateurs de la Cdk5, p35, p25 et p-ERK1/2, dans le Sp5C augmente très fortement dans un premier temps, juste après l'initiation de la lésion inflammatoire tissulaire, mais tend ensuite à diminuer, suggérant que l'activation de la Cdk5 interviendrait plutôt dans les premières étapes moléculaires conduisant à la sensibilisation centrale d'origine inflammatoire. A noter que l'expression de la Cdk5 elle-même dans le Sp5C n'augmente à aucun moment après la lésion inflammatoire tissulaire, tout au moins dans le délai de 3 jours de notre observation.

### ***Cdk5 et transmission de la sensibilité mécanique après une lésion neuropathique périphérique.***

L'application locale de roscovitine, plus de 2 semaines après une lésion neuropathique périphérique, est capable de supprimer durablement toutes allodynies mécaniques, statique comme dynamique. A noter la durée de cette suppression puisqu'elle n'est réversible qu'après plus de 3 jours. Cela suggère qu'en conditions neuropathiques, l'activation de la Cdk5 est aussi nécessaire au maintien de la sensibilisation centrale dans le Sp5C responsable de l'hypersensibilité à la douleur mécanique.

Notre observation en Western blot que l'expression de la Cdk5 cette fois-ci est élevée, comme celle de ses activateurs, p35, p25 et p-ERK1/2, plus de 2 semaines après la lésion neuropathique périphérique est cohérente avec cette conclusion.

Ces résultats indiquent donc que l'activation de la Cdk5 dans le Sp5C est nécessaire à la sensibilisation du réseau neuronal segmentaire responsable de l'hypersensibilité à la douleur mécanique à la suite d'une lésion inflammatoire ou neuropathique périphérique. Des résultats récents (Zhang *et al.*, 2019) dans la corne dorsale de la moelle épinière suggèrent même que l'activation de la Cdk5 est suffisante pour déclencher une hypersensibilité à la douleur mécanique.

### ***CDK5 ET TRANSMISSION BASALE DE L'INFORMATION MECANIQUE VEHICULEE PAR LES FIBRES AFFERENTES PRIMAIRES C***

Que seuls, parmi tous les inputs mécaniques, ceux véhiculés par les afférences primaires de type C soient réduits à la suite de l'inhibition de la Cdk5 suggère très fortement un effet pre-synaptique, au niveau de la 1<sup>ère</sup> synapse sur les voies nociceptives, entre fibres afférentes primaires de type C et neurones de 2<sup>nd</sup> ordre dans le Sp5C.

Il existe de nombreuses protéines, présentes dans les neurones de 1<sup>er</sup> ordre de type C et dont la phosphorylation par la Cdk5 favorise la libération de glutamate. Ainsi, la phosphorylation soit directement du TRPV1 (Pareek *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2015) soit de la kinesin-3 family member 13B (Xing *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015) par la Cdk5, favorise le 'trafficking' et la localisation à la membrane de ce récepteur et, par conséquent, les courants Ca<sup>2+</sup> à travers ce canal. De même, la phosphorylation

par la Cdk5 (i) de la synaptophysin augmente son expression et son interaction avec les protéines du complexe SNARE (Zhang *et al.*, 2012), (ii) des canaux Ca<sub>v</sub>2.2 (Su *et al.*, 2012) et Ca<sub>v</sub>3.2 (Gomez *et al.*, 2020), favorise leur localisation membranaire, (iii) de la collapsin response mediator protein 2, facilite aussi l'accès des canaux Ca<sub>v</sub>2.2 et Na<sub>v</sub> 1.7 à la membrane neuronale (Brittain *et al.*, 2012; Dustrude *et al.*, 2016; Moutal *et al.*, 2018) et enfin (iv) du récepteur P2X2a (P2X2aR), prévient sa désensibilisation (Coddou *et al.*, 2017). De même, l'activation des récepteurs delta opioïdiques, à la suite d'une lésion inflammatoire périphérique ou d'un traitement chronique avec de la morphine, implique la Cdk5 (Beaudry *et al.*, 2015).

### ***CDK5 ET SENSIBILISATION CENTRALE DANS LE SP5C***

L'électrophysiologie *in vivo* montre qu'une lésion inflammatoire périphérique produit une potentialisation uniforme de l'ensemble des réponses aux stimulations mécaniques – à bas seuil, dynamique (pinceau) et statique (filaments de von Frey) comme à haut seuil, et électriques des fibres C – des neurones WDR (voir Figure 10 des résultats). L'inhibition de la Cdk5 supprime l'ensemble de ces potentialisations. Cette potentialisation serait plutôt due à un processus postsynaptique, i.e. élévation de l'excitabilité du réseau neuronal dans le Sp5C et/ou du neurone WDR enregistré, auquel la Cdk5 contribue. On peut bien entendu considérer la possibilité que cette potentialisation soit le fait d'une élévation de la libération de neurotransmetteur par les fibres afférentes primaires. En effet, les expressions de p35, p25 et p-ERK1/2, et donc l'activité de la Cdk5, sont très fortement augmentées (x5-6) dans le ganglion trigéminal à la suite d'une lésion inflammatoire (modèle formaline ou CFA). Mais, dans ce cas, on n'observerait pas de potentialisation uniforme de toutes les réponses mais celle plus particulière des inputs C.

Ainsi la Cdk5 rejoint d'autres kinases dont l'activation est nécessaire au développement d'une sensibilisation centrale dans la corne dorsale spinale (CDS) ou le sous-noyau caudal du trijumeau (SnC) comme, par exemple l'isoforme  $\gamma$  de la protein kinase C (PKC $\gamma$ ) (Malmberg *et al.*, 1997; Miracourt *et al.*, 2007), l'extracellular signal-regulated protein kinases (ERK) (Ji *et al.*, 1999), ou la p38 (Ji *et al.*, 2013). En particulier, l'intervention de la Cdk5 dans le développement d'une allodynie mécanique ressemble beaucoup à celle de la PKC $\gamma$ . Premièrement, la survenue d'une allodynie mécanique est toujours associée à une activation de la PKC $\gamma$ , qu'elle se manifeste par une augmentation de l'immunoréactivité PKC $\gamma$  (Mao *et al.*, 1995b; Martin *et al.*, 1999) ou une élévation de sa phosphorylation, signe d'une activation (Peirs *et al.*, 2016). Deuxièmement, toutes manœuvres visant à réduire l'activité de la PKC $\gamma$ , que ce soit en l'inhibant – par l'application locale d'inhibiteurs pharmacologiques sélectifs (Shumilla *et al.*, 2005; Miracourt *et al.*, 2007; 2009; Peirs *et al.*, 2016; Petitjean *et al.*, 2015; Pham Dang *et al.*, 2016; Alba-Delgado *et al.*, 2018) ou en réduisant son expression – par injection intrathécale de RNA interférent (Zou *et al.*, 2011) ou invalidation de son gène codant



(Malmberg *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2011) –, supprime parallèlement l'allodynie mécanique dans différentes conditions expérimentales. Enfin, l'activation de la PKC $\gamma$  est capable, seule, de déclencher une allodynie mécanique, statique comme dynamique (Pham Dang *et al.*, 2016). Ces résultats suggèrent que l'activation de la PKC $\gamma$  dans la corne dorsale/Sp5C, comme celle de la Cdk5, est nécessaire et suffisante pour le développement d'une hypersensibilité mécanique cutanée. De plus, comme la Cdk5, la PKC $\gamma$  intervient spécifiquement dans l'induction de l'allodynie mécanique inflammatoire – l'application locale d'un antagoniste de la PKC $\gamma$  prévient, mais ne supprime pas, une allodynie mécanique après une lésion inflammatoire périphérique – mais aussi dans le maintien de l'allodynie mécanique après une lésion neuropathique périphérique – l'application locale d'un antagoniste de la PKC $\gamma$  est capable de supprimer cette allodynie mécanique (Pham Dang, Descheemacker, Artola, Dallel, communication personnelle). Il existe donc une grande communauté fonctionnelle entre Cdk5 et PKC $\gamma$  dans le développement d'une allodynie mécanique.

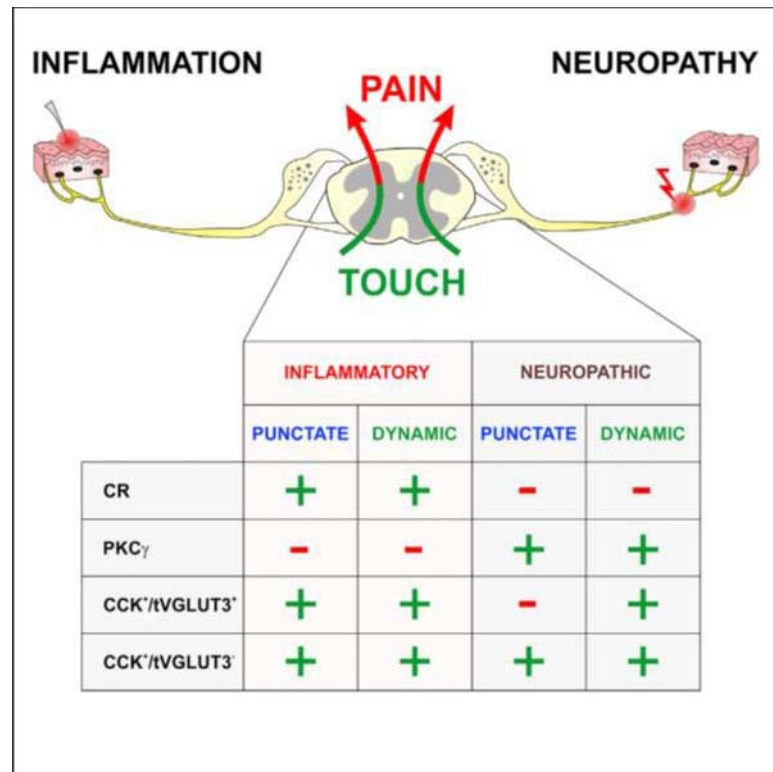
Or, la PKC $\gamma$  est présente dans une classe particulière de neurones excitateurs de la couche II interne (II<sub>i</sub>) de la corne dorsale/Sp5C engagés dans les circuits allodyniques. En effet, l'allodynie mécanique de la face est associée avec l'activation dans la corne dorsale/Sp5C, d'un circuit polysynaptique excitateur dirigé des couches profondes vers les couches superficielles par lequel les informations tactiles accèdent aux voies de la douleur (voir Introduction). Le neurone PKC $\gamma$  est un élément clé de ce circuit polysynaptique allodynique. Ces neurones reçoivent directement les afférences périphériques qui transmettent l'information tactile (Neumann *et al.*, 2008 ; Peirs *et al.*, 2014) et joueraient un rôle de 'portillon' sur le passage de l'information tactile vers les circuits superficiels de la douleur (Miraucourt *et al.*, 2007; Braz *et al.*, 2014; Artola *et al.*, 2020).

D'où la question :

### ***1. La cdk5 est-elle présente dans une classe particulière de neurones de la corne dorsale/sp5c engagés dans un circuit allodynique ?***

Il existe de nombreuses classes de neurones en fonction de l'expression de neuropeptides ou d'enzymes. Ainsi les neurones exprimant la *neurokinin B* (NKB), la *neurotensin* (NTS), la *cholecystokinine* (CCK), la *substance P* (SP), le *neuropeptide FF* ou le GRP–GFP forment des populations de neurones excitateurs plutôt différenciées les unes des autres, avec cependant quelques chevauchements entre les populations NKB/NTS and CCK/SP. De même, les neurones exprimant la *parvalbumin* (PV), la *calretinin* (CR), le *neuropeptide Y* (NPY), *galanin/dynorphin* (GAL/DYN) et *neuronal nitric oxide synthase* (NNOS) forment des populations de neurones inhibiteurs relativement bien différenciées avec, à nouveau, quelques chevauchements entre les populations GAL/DYN et NPY et NNOS et PV (pour revue voir Todd, 2010; Peirs *et al.*, 2020). Récemment, Peirs *et al.* (2021) ont identifié des circuit(s) allodynique(s) distincts en fonction du type de lésion périphérique, incluant différents types de

neurones : CCK, portant transitoirement le transporteur vésiculaire au glutamate 3 (tVGLUT3), CR, et PKC $\gamma$ . Les neurones CR de la couche II interne sont importants pour l'allodynie mécanique à la suite d'une lésion inflammatoire ; les neurones PKC $\gamma$  sont importants pour celle à la suite d'une lésion neuropathique ; les neurones CCK et tVGLUT3, situés dans les couches plus profondes, sont impliqués dans les deux types de circuits, inflammatoire et neuropathique. Le sous-groupe de neurones CCK, exprimant Maf englobant les neurones tVGLUT3, véhiculent l'information mécanique dynamique.



**Figure 1:** Tableau de l'implication (+) ou non (-) des neurones calretinin (CR), protein kinase C  $\gamma$  (PKC $\gamma$ ), cholecystokinin (CCK) portant transitoirement le transporteur vésiculaire au glutamate 3 (tVGLUT3<sup>+</sup>) ou non (tVGLUT3<sup>-</sup>) dans les différents circuits allodymiques, statiques ou dynamiques, à la suite d'une lésion inflammatoire ou neuropathique (par Peirs *et al.*, 2021).

La Cdk5 pourrait donc être présente dans une classe particulière de neurones de la corne dorsale/Sp5C engagée dans un circuit allodymique. Deux observations sont cohérentes avec cette hypothèse. D'une part, la couche II<sub>i</sub>, qui est à l'interface entre les zones de projections tactiles et nociceptives et où siègent déjà les neurones CR et PKC $\gamma$ , importants pour les allodynies mécaniques inflammatoire et neuropathique, respectivement (Peirs *et al.*, 2021), voit la plus forte augmentation d'expression du complexe Cdk5/p35 à la suite d'une lésion inflammatoire périphérique. D'autre part, nos résultats en comportement suggèrent que la Cdk5, comme la PKC $\gamma$ , joue un rôle différent dans le développement de l'allodynie mécanique inflammatoire et neuropathique.

Cependant cela est peu probable. D'une part, notre étude immunohistochimique révèle que les neurones Cdk5<sup>+</sup>/p35<sup>+</sup> peuvent être aussi bien excitateurs qu'inhibiteurs. D'autre part, il faudrait supposer qu'une seule classe d'interneurones englobe près des 3/4 des neurones de la corne dorsale/Cdk5 puisqu'après une lésion inflammatoire périphérique, environ 75% des neurones, dans toutes les couches du Sp5C, expriment la Cdk5/p35. Or, les neurones PKC $\gamma$  de la couche II<sub>i</sub>, qui forment pourtant l'une des plus grandes populations de neurones dans une couche, ne constituent que le 1/3 des neurones de cette couche (Peirs *et al.*, 2014). Il n'en reste pas moins possible que le complexe Cdk5/p35 ne soit exprimé que dans des (plusieurs bien entendu) classes bien spécifiques d'interneurones, leur conférant ainsi un rôle particulier dans le développement de la sensibilisation centrale à l'origine de l'hypersensibilité mécanique cutanée.

### *Perspectives.*

Nous n'avons déterminé que le phénotype en neurotransmetteur des interneurones Cdk5<sup>+</sup>/p35<sup>+</sup> qu'en conditions contrôles. Il serait donc intéressant de déterminer par co-marquage le phénotype neurochimique des interneurones Cdk5<sup>+</sup>/p35<sup>+</sup> en conditions contrôle et à la suite d'une lésion inflammatoire ou neuropathique périphérique.

Une autre question est de savoir si les neurones de projections expriment aussi le complexe Cdk5/p35. Un co-marquage récepteur NK1-Cdk5/p35 permettra de répondre à cette question, étant donné que 80% des neurones de la couche I qui projettent vers l'aire parabrachiale expriment le récepteur NK1 (Todd *et al.*, 2000).

## ***2. Quel peut être le rôle de la Cdk5 dans le développement de la sensibilisation centrale dans le Sp5C?***

### ***2.1. Cdk5 et propriétés intrinsèques des neurones du Sp5C***

Des travaux effectués dans notre laboratoire (Alba-Delgado *et al.* 2015; 2018) comme dans d'autres (Sedlacek *et al.* 2007; Davies & North 2009; Pradier *et al.*, 2019), ont contribué à caractériser les propriétés électrophysiologiques des neurones des couches I et II du Sp5C. Or ces propriétés peuvent changer en conditions pathologiques. En effet, bien que beaucoup de travaux *ex vivo* n'aient retrouvé aucune modification électrophysiologique dans les neurones des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière à la suite d'une lésion inflammatoire (Baba *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 2003; Rivera-Arconada & Lopez-Garcia, 2010; Kurihara *et al.*, 2014) ou neuropathique périphérique (Schoffnegger *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2013), notre groupe a récemment mis en évidence des modifications neuronales, fonctionnelles – dépolarisation et réduction de la résistance membranaire des neurones de la couche II – comme morphologiques – réorganisation anatomique des interneurones PKC $\gamma$  – dans le Sp5C à la suite d'une lésion inflammatoire de la face (Alba-Delgado *et al.*, 2018). De plus, ces changements neuronaux dans le Sp5C sont associés à des modifications astrocytaires, fonctionnelles –

réduction des courants Kir4.1 – comme morphologiques – expression de la GFAP, extension des prolongements astrocytaires (Mountadem *et al.*, En préparation).

#### *Perspectives.*

Il serait intéressant, en enregistrant des interneurons *ex vivo* (technique patch-clamp, configuration whole-cell) dans des tranches de Sp5C prélevées sur des rats inflammatoires ou neuropathiques, de déterminer (i) si des modifications neuronales et astrocytaires sous-tendent aussi la sensibilisation centrale neuropathique, et (ii) quel est le rôle de la Cdk5 dans ces modifications, neuronales et astrocytaires, du Sp5C qui sous-tendent les sensibilisations centrales, inflammatoire ou neuropathique. Etant donné que la Cdk5 semble intervenir dans le maintien de la sensibilisations centrale uniquement neuropathique, seules les propriétés neuronales et/ou astrocytaires chez des animaux neuropathiques devraient être impactées par l'application de roscovitine. Cette analyse pourrait se faire à l'échelle des différentes classes d'interneurones chez des animaux où ces classes peuvent être reconnues par l'expression cre-dépendante de gènes rapporteurs (Heinke *et al.*, 2004; Punnakkal *et al.*, 2014; Peirs *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2017; Moehring *et al.*, 2018).

### ***2.2. Cdk5 et transmission synaptique excitatrice dans le Sp5C***

La Cdk5 interagit avec les récepteurs glutamatergiques de la transmission excitatrice dans la corne dorsale/Sp5C. Ainsi, la Cdk5 phosphoryle les sous-unités GluN2A et GluN2B du récepteur NMDA, favorisant leur expression membranaire, et, par là, facilitant l'induction de la LTP (Li *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2008). De même, elle phosphoryle les sous-unités mGluR1 and mGluR5 des récepteurs glutamatergiques métabotropiques, favorisant ainsi leur regroupement à la membrane (Orlando *et al.*, 2009). Cela suggère que l'activation du complexe Cdk5/p35 à la suite d'une lésion tissulaire inflammatoire ou neuropathique facilite la transmission synaptique excitatrice et sa potentialisation dans le Sp5C, contribuant ainsi à la sensibilisation centrale responsable du développement d'une hypersensibilité mécanique cutanée.

#### *Perspectives.*

Il serait intéressant, en enregistrant des interneurons *ex vivo* (voir ci-dessus) dans des tranches de Sp5C prélevées sur des rats contrôles, inflammatoires ou neuropathiques, d'apprécier l'état de la transmission synaptique excitatrice dans ces différentes conditions et de tester l'effet de la roscovitine sur cet état.

Ce pourrait être au niveau de la 1<sup>ère</sup> synapse sur les voies trigéminales, entre afférence trigéminales primaires et neurones de 2<sup>ème</sup> ordre. Cependant, une difficulté majeure est de préparer des tranches *ex*

*vivo* de tronc cérébral viables avec le nerf trigéminal toujours attaché (Hamba & Onimaru, 1998 ; Hamba *et al.*, 2000; Liang *et al.*, 2005) pour pouvoir activer ces synapses. Grudt & Williams (1998) ont eu recours à des tranches horizontales où ils ont stimulé les fibres qui descendent le long du noyau trigéminal. Plus récemment, Julie Kauer et collaborateurs (Pradier *et al.*, 2018) ont utilisé l'optogénétique pour activer spécifiquement ces afférences. On peut aussi enregistrer les potentiels/courants post-synaptiques excitateurs (PPSEs/CPSEs) spontanés (en présence ou non de TTX) ou utiliser une électrode de stimulation placée (dans les couches I/II) au voisinage de la cellule enregistrée et évoquer électriquement des PPSEs/CPSEs dans le neurone enregistré (voir par exemple Pradier *et al.*, 2018 dans le Sp5C ou Pernía-Andrade *et al.*, 2009, Park & Weon, 2017 dans la corne dorsale). Bien entendu, les synapses activées ne sont pas identifiées. Cependant, c'est un moyen simple de tester l'état de la transmission synaptique – potentialisé, naïf ou déprimé – dans le réseau neuronal du Sp5C. Nous pourrions répondre ainsi aux questions suivantes : (i) Quel est l'état de la transmission synaptique après lésion inflammatoire ou neuropathique périphérique ? (ii) Quel est l'effet de l'application directe de roscovitine sur ces modifications en conditions inflammatoire ou neuropathique ? A nouveau, étant donné que la Cdk5 semble intervenir dans le maintien de la sensibilisation centrale uniquement neuropathique, seuls les changements synaptiques chez des animaux neuropathiques devraient être impactés par l'inhibition de la Cdk5.

### ***2.3. Cdk5 et homeostasie dans le Sp5C***

Cependant, le rôle de Cdk5 dans la corne dorsale/Sp5C pourrait ne pas se limiter à moduler transmission synaptique et potentialisation de la transmission synaptique excitatrice. En effet, les synapses de l'aire CA1 de l'hippocampe de souris déficientes en p35 développent une LTP normale mais non une LTD (Ohshima *et al.*, 2005 ; Mishiba *et al.*, 2014), suggérant que l'activation de la Cdk5 est une étape moléculaire participant à l'induction de la LTD, vraisemblablement par l'intermédiaire de la synthèse de p25 à partir du p35 lors de l'activité synaptique (Seo *et al.*, 2014). Cependant, on a aussi proposé que l'activation de la Cdk5 par le p25 dans ces conditions constituerait un mécanisme homéostatique, nécessaire pour prévenir toute hyperactivité neuronale (Seeburg *et al.*, 2008; Kim & Ryan, 2010; Mitra *et al.*, 2012; Seo *et al.*, 2014). Bien entendu, il existe des différences entre corne dorsale/Sp5C et hippocampe. Ainsi, l'activation de la Cdk5 dans l'hippocampe paraît, d'une part, n'avoir aucun effet sur (Ohshima *et al.*, 2005 ; Mishiba *et al.*, 2014 ; Seo *et al.*, 2014), ou même inhiber (Hawasli *et al.*, 2007), la LTP, et d'autre part, n'avoir pas d'effet sur la présence à la membrane de NR2B (Mishiba *et al.*, 2014) et même favoriser sa dégradation (Hawasli *et al.*, 2007). Il n'en demeure pas moins possible que lors de l'activité synaptique dans la corne dorsale/Sp5C, la synthèse de p25 non seulement puisse participer au maintien de cette activité mais aussi faciliter l'induction d'une LTD pour préserver le réseau neuronal de l'hyperactivité, i.e. homéostasie. En accord avec cette hypothèse, nous observons que p25, est massivement exprimé dans le Sp5C à la suite d'une lésion inflammatoire périphérique. D'où,

l'activation des complexes Cdk5/p35 et/ou Cdk5/p25 contribue-t-elle directement à déprimer la transmission synaptique – ce serait un des mécanismes responsables de la dépression même de la transmission synaptique – ou facilite-t-elle simplement l'induction de la LTD – ce serait alors un processus homéostatique?

### *Perspectives.*

En utilisant des enregistrements intracellulaires de neurones du Sp5C, plusieurs groupes ont montré que la transmission synaptique entre afférence trigéminal primaire et neurone de 2<sup>ème</sup> ordre du Sp5C peut être potentialisée (LTP : Hamba *et al.*, 2000; Liang *et al.*, 2005) ou, inversement, déprimée (LTD : Pradier *et al.*, 2018) durablement en fonction de la fréquence de l'activation des fibres afférentes.

Nous utiliserons plutôt un protocole de 'pairing' pour déterminer la courbe voltage-réponse pour l'induction de la LTD/LTP. Ce protocole consiste à associer une dépolarisation postsynaptique variable avec une activation synaptique concomitante courte de basse fréquence – typiquement 2 Hz pendant 50s – délivrée par l'intermédiaire d'une électrode de stimulation placée (dans les couches I/II) au voisinage de la cellule enregistrée (voir plus haut et aussi Park & Weon, 2017). En effet, on a montré dans le cortex (Artola *et al.*, 1990) comme dans l'aire CA1 de l'hippocampe (Ngezahayo *et al.*, 2000), que le sens de la modification synaptique dépend du niveau de la dépolarisation postsynaptique lors de la stimulation conditionnante: en cas de dépolarisation (i) faible, il n'y a aucune modification, (ii) plus forte, au-dessus d'un 1<sup>er</sup> seuil,  $\Theta^-$ , il y a LTD, et (iii) encore plus forte, au-delà d'un 2<sup>nd</sup> seuil,  $\Theta^+$ , il y a LTP (voir Figure ... dans Introduction). De plus, la position de ces seuils varie avec l'état – potentialisé, normal et déprimé – de la transmission synaptique. En effet, des synapses de l'aire CA1 de l'hippocampe préalablement potentialisées,  $\Theta^-$  glisse vers la gauche (plus polarisé), et  $\Theta^+$ , vers la droite (plus dépolarisé), facilitant la LTD et inhibant la LTP; et *vice versa* dans les synapses déprimées (Ngezahayo *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, *soumis*). Facilitation de la LTD et inhibition de la LTP dans une synapse potentialisée, et *vice versa* dans une synapse déprimée, résultent donc de mouvements opposés et concomitants des deux seuils,  $\Theta^-$  et  $\Theta^+$ . Il existe un continuum de fonctions potentiel-réponses pour l'induction de la LTD/LTP en fonction de l'état de la synapse : potentialisé, naïf ou déprimé (voir Figure ... dans Introduction).

Nous comparerons les fonctions potentiel-réponses pour l'induction de la LTD/LTP en conditions naïves et après lésion inflammatoire ou neuropathique périphérique et testeront l'effet de la roscovitine sur ces différences. Si l'activation de la Cdk5 est une des étapes moléculaires conduisant à la dépression de la transmission synaptique, l'application de roscovitine réduirait alors l'amplitude de la modification synaptique sans modifier les positions (voltages) des seuils  $\Theta^-$  et  $\Theta^+$ . Si au contraire, l'activation de la Cdk5 constitue un mécanisme homéostatique, l'application de roscovitine serait sans effet sur

l'amplitude même de la modification synaptique mais modifierait la position/voltage les deux seuils  $\Theta^-$  et  $\Theta^+$ .

### ***CDK5 ET PERSPECTIVES CLINIQUES***

La roscovitine a fait l'objet d'un essai clinique Rosco-CF de phase 2 afin d'évaluer l'innocuité et tester différentes doses de roscovitine chez des patients atteints de mucoviscidose. En effet, cette molécule a démontré dans des travaux précliniques un potentiel triple intérêt en tant qu'anti-infectieux, anti-inflammatoire, ainsi que correcteur de la fonction de la protéine CFTR (pour l'anglais *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*).

Nos résultats précliniques ainsi que ceux d'autres équipes démontrent un potentiel intérêt de la roscovitine en tant qu'antalgique. En particulier, une seule application locale de roscovitine produit une antalgie à la fois profonde et prolongée (près de trois jours) chez des rats mâles et femelles neuropathiques. Il faut maintenant vérifier que la roscovitine est aussi efficace par voie systémique. Dans ce cas, on pourrait envisager un développement clinique.

# BIBLIOGRAPHIE

Abdallah, K., A. Artola, L. Monconduit, R. Dallel and P. Luccarini (2013). "Bilateral descending hypothalamic projections to the spinal trigeminal nucleus caudalis in rats." *PLoS One* 8(8): e73022.

Abdallah, K., L. Monconduit, A. Artola, P. Luccarini and R. Dallel (2015). "GABAergic inhibition or dopamine denervation of the A11 hypothalamic nucleus induces trigeminal analgesia." *Pain* 156(4): 644-655.

Ahmadi, S., S. Lippross, W. L. Neuhuber and H. U. Zeilhofer (2002). "PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons." *Nat Neurosci* 5(1): 34-40.

Aigner, M., J. Robert Lukas, M. Denk, F. Ziya-Ghazvini, A. Kaider and R. Mayr (2000). "Somatotopic organization of primary afferent perikarya of the guinea-pig extraocular muscles in the trigeminal ganglion: a post-mortem DiI-tracing study." *Exp Eye Res* 70(4): 411-418.

Alba-Delgado, C., S. Mountadem, N. Mermet-Joret, L. Monconduit, R. Dallel, A. Artola and M. Antri (2018). "5-HT<sub>2A</sub> Receptor-Induced Morphological Reorganization of PKC $\gamma$ -Expressing Interneurons Gates Inflammatory Mechanical Allodynia in Rat." *J Neurosci* 38(49): 10489-10504.

Almeida, T. F., S. Roizenblatt and S. Tufik (2004). "Afferent pain pathways: a neuroanatomical review." *Brain Res* 1000(1-2): 40-56.

Amorim, D., S. Puga, R. Braganca, A. Braga, A. Pertovaara, A. Almeida and F. Pinto-Ribeiro (2017). "Minocycline reduces mechanical allodynia and depressive-like behaviour in type-1 diabetes mellitus in the rat." *Behav Brain Res* 327: 1-10.

Artola, A., S. Brocher and W. Singer (1990). "Different voltage-dependent thresholds for inducing long-term depression and long-term potentiation in slices of rat visual cortex." *Nature* 347(6288): 69-72.

Artola, A. and W. Singer (1987). "Long-term potentiation and NMDA receptors in rat visual cortex." *Nature* 330(6149): 649-652.

Arvidsson, J., K. Pfaller and S. Gmeiner (1992). "The ganglionic origins and central projections of primary sensory neurons innervating the upper and lower lips in the rat." *Somatosens Mot Res* 9(3): 199-209.

Baba, H., T. P. Doubell and C. J. Woolf (1999). "Peripheral inflammation facilitates A $\beta$  fiber-mediated synaptic input to the substantia gelatinosa of the adult rat spinal cord." *J Neurosci* 19(2): 859-867.



Bankston, A. N., W. Li, H. Zhang, L. Ku, G. Liu, F. Papa, L. Zhao, J. A. Bibb, F. Cambi, S. K. Tiwari-Woodruff and Y. Feng (2013). "p39, the primary activator for cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) in oligodendroglia, is essential for oligodendroglia differentiation and myelin repair." *J Biol Chem* 288(25): 18047-18057.

Bannister, K., Y. S. Lee, L. Goncalves, F. Porreca, J. Lai and A. H. Dickenson (2014). "Neuropathic plasticity in the opioid and non-opioid actions of dynorphin A fragments and their interactions with bradykinin B2 receptors on neuronal activity in the rat spinal cord." *Neuropharmacology* 85: 375-383.

Basbaum, A. and T. Jessell (2000). "The perception of pain. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, editors. *Principles of Neural Science* 4th ed. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division; 2000.

Basbaum, A. I., D. M. Bautista, G. Scherrer and D. Julius (2009). "Cellular and molecular mechanisms of pain." *Cell* 139(2): 267-284.

Basbaum, A. I. and J. M. Braz (2010). *Transgenic Mouse Models for the Tracing of "Pain" Pathways. Translational Pain Research: From Mouse to Man.* L. Kruger and A. R. Light. Boca Raton, FL.

Bates, S., L. Bonetta, D. MacAllan, D. Parry, A. Holder, C. Dickson and G. Peters (1994). "CDK6 (PLSTIRE) and CDK4 (PSK-J3) are a distinct subset of the cyclin-dependent kinases that associate with cyclin D1." *Oncogene* 9(1): 71-79.

Beaudry, H., A. A. Mercier-Blais, C. Delaygue, C. Lavoie, J. L. Parent, W. Neugebauer and L. Gendron (2015). "Regulation of mu and delta opioid receptor functions: involvement of cyclin-dependent kinase 5." *Br J Pharmacol* 172(10): 2573-2587.

Benn, S. C. and C. J. Woolf (2004). "Adult neuron survival strategies--slamming on the brakes." *Nat Rev Neurosci* 5(9): 686-700.

Bereiter, D. A., J. L. Cioffi, D. F. Bereiter, G. Zardeneta and S. B. Milam (2006). "Local blockade of integrins in the temporomandibular joint region reduces Fos-positive neurons in trigeminal subnucleus caudalis of female rats produced by jaw movement." *Pain* 125(1-2): 65-73.

Bereiter, D. A., H. Hirata and J. W. Hu (2000). "Trigeminal subnucleus caudalis: beyond homologies with the spinal dorsal horn." *Pain* 88(3): 221-224.

Bernal, L. and C. Roza (2018). "Hyperpolarization-activated channels shape temporal patterns of ectopic spontaneous discharge in C-nociceptors after peripheral nerve injury." *Eur J Pain*.

Berta, T., C. K. Park, Z. Z. Xu, R. G. Xie, T. Liu, N. Lu, Y. C. Liu and R. R. Ji (2014). "Extracellular caspase-6 drives murine inflammatory pain via microglial TNF-alpha secretion." *J Clin Invest* 124(3): 1173-1186.

Bertoli, F. M. P., C. D. Bruzamolín, E. Pizzatto, E. M. Losso, J. A. Brancher and J. F. de Souza (2018). "Prevalence of diagnosed temporomandibular disorders: A cross-sectional study in Brazilian adolescents." *PLoS One* 13(2): e0192254.

Besson, J. M. and A. Chaouch (1987). "Peripheral and spinal mechanisms of nociception." *Physiol Rev* 67(1): 67-186.

Bester, H., S. Beggs and C. J. Woolf (2000). "Changes in tactile stimuli-induced behavior and c-Fos expression in the superficial dorsal horn and in parabrachial nuclei after sciatic nerve crush." *J Comp Neurol* 428(1): 45-61.

Bicanic, I., A. Hladnik, D. Dzaja and Z. Petanjek (2019). "The Anatomy of Orofacial Innervation." *Acta Clin Croat* 58(Suppl 1): 35-42.

Birder, L. A. and E. R. Perl (1994). "Cutaneous sensory receptors." *J Clin Neurophysiol* 11(6): 534-552.

Bliss, T. V. and T. Lomo (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." *J Physiol* 232(2): 331-356.

Bongenhielm, U., F. M. Boissonade, A. Westermark, P. P. Robinson and K. Fried (1999). "Sympathetic nerve sprouting fails to occur in the trigeminal ganglion after peripheral nerve injury in the rat." *Pain* 82(3): 283-288.

Bonjardim, L. R., A. P. da Silva, G. H. Gameiro, C. H. Tambeli and M. C. Ferraz de Arruda Veiga (2009). "Nociceptive behavior induced by mustard oil injection into the temporomandibular joint is blocked by a peripheral non-opioid analgesic and a central opioid analgesic." *Pharmacol Biochem Behav* 91(3): 321-326.

Bouhassira, D., M. Lanteri-Minet, N. Attal, B. Laurent and C. Touboul (2008). "Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population." *Pain* 136(3): 380-387.

Bowles, W. R., J. C. Withrow, A. M. Lepinski and K. M. Hargreaves (2003). "Tissue levels of immunoreactive substance P are increased in patients with irreversible pulpitis." *J Endod* 29(4): 265-267.

Boyer, N., R. Dallel, A. Artola and L. Monconduit (2014). "General trigeminospinal central sensitization and impaired descending pain inhibitory controls contribute to migraine progression." *Pain* 155(7): 1196-1205.

Boyer, N., J. Signoret-Genest, A. Artola, R. Dallel and L. Monconduit (2017). "Propranolol treatment prevents chronic central sensitization induced by repeated dural stimulation." *Pain* 158(10): 2025-2034.

Braz, J., C. Solorzano, X. Wang and A. I. Basbaum (2014). "Transmitting pain and itch messages: a contemporary view of the spinal cord circuits that generate gate control." *Neuron* 82(3): 522-536.

Breivik, H., B. Collett, V. Ventafridda, R. Cohen and D. Gallacher (2006). "Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment." *Eur J Pain* 10(4): 287-333.

Brinkkoetter, P. T., P. Olivier, J. S. Wu, S. Henderson, R. D. Krofft, J. W. Pippin, D. Hockenbery, J. M. Roberts and S. J. Shankland (2009). "Cyclin I activates Cdk5 and regulates expression of Bcl-2 and Bcl-XL in postmitotic mouse cells." *J Clin Invest* 119(10): 3089-3101.

Brinkkoetter, P. T., J. W. Pippin and S. J. Shankland (2010). "Cyclin I-Cdk5 governs survival in post-mitotic cells." *Cell Cycle* 9(9): 1729-1731.

Brown, J. W. (1958). "The development of subnucleus caudalis of the nucleus of the spinal tract of V." *J Comp Neurol* 110(1): 105-133.

Burch, R. C., S. Loder, E. Loder and T. A. Smitherman (2015). "The prevalence and burden of migraine and severe headache in the United States: updated statistics from government health surveillance studies." *Headache* 55(1): 21-34.

Burkey, A. R., E. Carstens, J. J. Wenniger, J. Tang and L. Jasmin (1996). "An opioidergic cortical antinociception triggering site in the agranular insular cortex of the rat that contributes to morphine antinociception." *J Neurosci* 16(20): 6612-6623.

Burstein, R., D. Levy and M. Jakubowsky (2005). "A thirty-year perspective on the pathophysiology of migraine pain; in Merskey H, Loeser JD, Dubner R (eds): ." *The Paths of Pain 1975–2005*. Seattle, IASP Press: 151–164.

Burstein, R., R. Nosedá and D. Borsook (2015). "Migraine: multiple processes, complex pathophysiology." *J Neurosci* 35(17): 6619-6629.

Burstein, R., H. Yamamura, A. Malick and A. M. Strassman (1998). "Chemical stimulation of the intracranial dura induces enhanced responses to facial stimulation in brain stem trigeminal neurons." *J Neurophysiol* 79(2): 964-982.

Burstein, R., D. Yarnitsky, I. Goor-Aryeh, B. J. Ransil and Z. H. Bajwa (2000). "An association between migraine and cutaneous allodynia." *Ann Neurol* 47(5): 614-624.

Bushnell, M. C., M. Ceko and L. A. Low (2013). "Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain." *Nat Rev Neurosci* 14(7): 502-511.

Byers, M. R. and M. V. Narhi (1999). "Dental injury models: experimental tools for understanding neuroinflammatory interactions and polymodal nociceptor functions." *Crit Rev Oral Biol Med* 10(1): 4-39.

Calvo, M. and D. L. Bennett (2012). "The mechanisms of microgliosis and pain following peripheral nerve injury." *Exp Neurol* 234(2): 271-282.

Capra, N. F. and T. D. Wax (1989). "Distribution and central projections of primary afferent neurons that innervate the masseter muscle and mandibular periodontium: a double-label study." *J Comp Neurol* 279(3): 341-352.

Carlson, M. L., J. Bradley, J. J. Van Gompel and R. S. Tubbs (2017). "The Disputed Discovery of Facial and Trigeminal Nerve Function: Revisiting the Contributions of Herbert Mayo and Charles Bell." *Otol Neurotol* 38(9): 1376-1381.

Casals-Diaz, L., C. Casas and X. Navarro (2015). "Changes of voltage-gated sodium channels in sensory nerve regeneration and neuropathic pain models." *Restor Neurol Neurosci* 33(3): 321-334.

Caterina, M. J., M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine and D. Julius (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." *Nature* 389(6653): 816-824.

Cervero, F. (1994). "Sensory innervation of the viscera: peripheral basis of visceral pain." *Physiol Rev* 74(1): 95-138.

Chae, T., Y. T. Kwon, R. Bronson, P. Dikkes, E. Li and L. H. Tsai (1997). "Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality." *Neuron* 18(1): 29-42.

Chai, Y., M. Chen, W. Zhang and W. Zhang (2014). "Somatotopic organization of trigeminal ganglion: three-dimensional reconstruction of three divisions." *J Craniofac Surg* 25(5): 1882-1884.

Chebbi, R., N. Boyer, L. Monconduit, A. Artola, P. Luccarini and R. Dallel (2014). "The nucleus raphe magnus OFF-cells are involved in diffuse noxious inhibitory controls." *Exp Neurol* 256: 39-45.

Chen, J., Y. Zhang, M. B. Kelz, C. Steffen, E. S. Ang, L. Zeng and E. J. Nestler (2000). "Induction of cyclin-dependent kinase 5 in the hippocampus by chronic electroconvulsive seizures: role of [Delta]FosB." *J Neurosci* 20(24): 8965-8971.

Chen, N. F., W. F. Chen, C. S. Sung, C. H. Lu, C. L. Chen, H. C. Hung, C. W. Feng, C. H. Chen, K. H. Tsui, H. M. Kuo, H. M. Wang, Z. H. Wen and S. Y. Huang (2016). "Contributions of p38 and ERK to the antinociceptive effects of TGF-beta1 in chronic constriction injury-induced neuropathic rats." *J Headache Pain* 17(1): 72.

Chen, W., H. S. Ennes, J. A. McRoberts and J. C. Marvizon (2018). "Mechanisms of mu-opioid receptor inhibition of NMDA receptor-induced substance P release in the rat spinal cord." *Neuropharmacology* 128: 255-268.

Chessell, I. P., J. P. Hatcher, C. Bountra, A. D. Michel, J. P. Hughes, P. Green, J. Egerton, M. Murfin, J. Richardson, W. L. Peck, C. B. Grahames, M. A. Casula, Y. Yiangou, R. Birch, P. Anand and G. N. Buell (2005). "Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain." *Pain* 114(3): 386-396.

Chiang, C. Y., J. O. Dostrovsky, K. Iwata and B. J. Sessle (2011). "Role of glia in orofacial pain." *Neuroscientist* 17(3): 303-320.

Chiang, C. Y., B. Hu, S. J. Park, S. Zhang, C. L. Kwan, J. W. Hu, J. O. Dostrovsky and B. J. Sessle (2003). "Purinergic and NMDA-receptor mechanisms underlying tooth pulp stimulation-induced central sensitization in trigeminal nociceptive neurons; in Dostrovsky JO, Carr DB, Koltzenburg M (eds):

." Proceedings of the 10th World Congress on Pain: Progress in Pain Research and Management. Seattle, IASP Press 24: 345–354.

Chung, G., S. J. Jung and S. B. Oh (2013). "Cellular and molecular mechanisms of dental nociception." *J Dent Res* 92(11): 948-955.

Chung, K. and J. M. Chung (2001). "Sympathetic sprouting in the dorsal root ganglion after spinal nerve ligation: evidence of regenerative collateral sprouting." *Brain Res* 895(1-2): 204-212.

Clavelou, P., J. Pajot, R. Dallel and P. Raboisson (1989). "Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat." *Neurosci Lett* 103(3): 349-353.

Coddou, C., R. Sandoval, P. Castro, P. Lazcano, M. J. Hevia, M. Rokic, B. Hall, A. Terse, C. Gonzalez-Billault, A. B. Kulkarni, S. S. Stojilkovic and E. Utreras (2017). "Cyclin-dependent kinase 5 modulates the P2X2a receptor channel gating through phosphorylation of C-terminal threonine 372." *Pain* 158(11): 2155-2168.

Contreras-Vallejos, E., E. Utreras and C. Gonzalez-Billault (2012). "Going out of the brain: non-nervous system physiological and pathological functions of Cdk5." *Cell Signal* 24(1): 44-52.

Coste, J., D. L. Voisin, P. Luccarini and R. Dallel (2008). "A role for wind-up in trigeminal sensory processing: intensity coding of nociceptive stimuli in the rat." *Cephalalgia* 28(6): 631-639.

Costigan, M., J. Scholz and C. J. Woolf (2009). "Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage." *Annu Rev Neurosci* 32: 1-32.

Coull, J. A., S. Beggs, D. Boudreau, D. Boivin, M. Tsuda, K. Inoue, C. Gravel, M. W. Salter and Y. De Koninck (2005). "BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain." *Nature* 438(7070): 1017-1021.

Coull, J. A., D. Boudreau, K. Bachand, S. A. Prescott, F. Nault, A. Sik, P. De Koninck and Y. De Koninck (2003). "Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain." *Nature* 424(6951): 938-942.

Cox, J. J., F. Reimann, A. K. Nicholas, G. Thornton, E. Roberts, K. Springell, G. Karbani, H. Jafri, J. Mannan, Y. Raashid, L. Al-Gazali, H. Hamamy, E. M. Valente, S. Gorman, R. Williams, D. P. McHale,

J. N. Wood, F. M. Gribble and C. G. Woods (2006). "An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain." *Nature* 444(7121): 894-898.

Cox, J. J., J. Sheynin, Z. Shorer, F. Reimann, A. K. Nicholas, L. Zubovic, M. Baralle, E. Wraige, E. Manor, J. Levy, C. G. Woods and R. Parvari (2010). "Congenital insensitivity to pain: novel SCN9A missense and in-frame deletion mutations." *Hum Mutat* 31(9): E1670-1686.

Craig, A. D. (2003). "Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing." *Annu Rev Neurosci* 26: 1-30.

Crown, E. D., Y. S. Gwak, Z. Ye, K. M. Johnson and C. E. Hulsebosch (2008). "Activation of p38 MAP kinase is involved in central neuropathic pain following spinal cord injury." *Exp Neurol* 213(2): 257-267.

Cui, Y., Y. Yang, Z. Ni, Y. Dong, G. Cai, A. Foncelle, S. Ma, K. Sang, S. Tang, Y. Li, Y. Shen, H. Berry, S. Wu and H. Hu (2018). "Astroglial Kir4.1 in the lateral habenula drives neuronal bursts in depression." *Nature* 554(7692): 323-327.

Cvejic, E., H. Li, I. B. Hickie, D. Wakefield, A. R. Lloyd and U. Vollmer-Conna (2019). "Contribution of individual psychological and psychosocial factors to symptom severity and time-to-recovery after naturally-occurring acute infective illness: The Dubbo Infection Outcomes Study (DIOS)." *Brain Behav Immun* 82: 76-83.

Dai, Y., K. Iwata, T. Fukuoka, E. Kondo, A. Tokunaga, H. Yamanaka, T. Tachibana, Y. Liu and K. Noguchi (2002). "Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in primary afferent neurons by noxious stimuli and its involvement in peripheral sensitization." *J Neurosci* 22(17): 7737-7745.

Dallel, R., P. Clavelou and A. Woda (1989). "Effects of tractotomy on nociceptive reactions induced by tooth pulp stimulation in the rat." *Exp Neurol* 106(1): 78-84.

Dallel, R., C. Duale, P. Luccarini and J. L. Molat (1999). "Stimulus-function, wind-up and modulation by diffuse noxious inhibitory controls of responses of convergent neurons of the spinal trigeminal nucleus oralis." *Eur J Neurosci* 11(1): 31-40.

Dallel, R., C. Duale and J. L. Molat (1998). "Morphine administered in the substantia gelatinosa of the spinal trigeminal nucleus caudalis inhibits nociceptive activities in the spinal trigeminal nucleus oralis." *J Neurosci* 18(10): 3529-3536.

Dallel, R., P. Raboisson, P. Auroy and A. Woda (1988). "The rostral part of the trigeminal sensory complex is involved in orofacial nociception." *Brain Res* 448(1): 7-19.

Dallel, R. and D. Voisin (2007). "Physiologie et physiopathologie des douleurs orofaciales." *Bull. Acad. Natle Chir. Dent*(50): 53-75.

- DeLeo, J., L. Sorkin and L. Watkins (2007). "Immune and Glial Regulation of Pain." IASP Press
- Dhavan, R. and L. H. Tsai (2001). "A decade of CDK5." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(10): 749-759.
- Diogenes, A., A. M. Patwardhan, N. A. Jeske, N. B. Ruparel, V. Goffin, A. N. Akopian and K. M. Hargreaves (2006). "Prolactin modulates TRPV1 in female rat trigeminal sensory neurons." *J Neurosci* 26(31): 8126-8136.
- Dostrovsky, J. O., K. D. Davis and K. Kawakita (1991). "Central mechanisms of vascular headaches." *Can J Physiol Pharmacol* 69(5): 652-658.
- Dostrovsky JO, S. B. (2006). "Nociceptive processing in the brainstem; in Schmidt RF, Willis WD (eds)." *Encyclopedic Reference of Pain*. Heidelberg, Springer.
- Dubner, R., D. R. Kenshalo, Jr., W. Maixner, M. C. Bushnell and J. L. Oliveras (1989). "The correlation of monkey medullary dorsal horn neuronal activity and the perceived intensity of noxious heat stimuli." *J Neurophysiol* 62(2): 450-457.
- Dubner, R. and K. Ren (2004). "Brainstem mechanisms of persistent pain following injury." *J Orofac Pain* 18(4): 299-305.
- Dubner, R., B. J. Sessle and A. T. Storey (1978). "The Neural Basis of Oral and Facial Function. ." Plenum Press, 1978.
- Ducourneau, V. R., T. Dolique, S. Hachem-Delaunay, L. S. Miraucourt, A. Amadio, L. Blaszczyk, F. Jacquot, J. Ly, L. Devoize, S. H. Oliet, R. Dallel, J. P. Mothet, F. Nagy, V. S. Fenelon and D. L. Voisin (2014). "Cancer pain is not necessarily correlated with spinal overexpression of reactive glia markers." *Pain* 155(2): 275-291.
- Eaton, M. J., J. A. Plunkett, S. Karmally, M. A. Martinez and K. Montanez (1998). "Changes in GAD- and GABA- immunoreactivity in the spinal dorsal horn after peripheral nerve injury and promotion of recovery by lumbar transplant of immortalized serotonergic precursors." *J Chem Neuroanat* 16(1): 57-72.
- Eriksson, J., A. Jablonski, A. K. Persson, J. X. Hao, P. F. Kouya, Z. Wiesenfeld-Hallin, X. J. Xu and K. Fried (2005). "Behavioral changes and trigeminal ganglion sodium channel regulation in an orofacial neuropathic pain model." *Pain* 119(1-3): 82-94.
- Farges, J. C., B. Alliot-Licht, E. Renard, M. Ducret, A. Gaudin, A. J. Smith and P. R. Cooper (2015). "Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries." *Mediators Inflamm* 2015: 230251.
- Field, M. J., S. Bramwell, J. Hughes and L. Singh (1999). "Detection of static and dynamic components of mechanical allodynia in rat models of neuropathic pain: are they signalled by distinct primary sensory neurones?" *Pain* 83(2): 303-311.

- Fields, H. (2004). "State-dependent opioid control of pain." *Nat Rev Neurosci* 5(7): 565-575.
- Fontaine, D., F. Almairac, S. Santucci, C. Fernandez, R. Dallel, J. Pallud and M. Lanteri-Minet (2018). "Dural and pial pain-sensitive structures in humans: new inputs from awake craniotomies." *Brain* 141(4): 1040-1048.
- Fukushima, T. and F. W. Kerr (1979). "Organization of trigeminothalamic tracts and other thalamic afferent systems of the brainstem in the rat: presence of gelatinosa neurons with thalamic connections." *J Comp Neurol* 183(1): 169-184.
- Garcia-Larrea, L. and M. Magnin (2008). "[Pathophysiology of neuropathic pain: review of experimental models and proposed mechanisms]." *Presse Med* 37(2 Pt 2): 315-340.
- Garcia-Larrea, L. and R. Peyron (2013). "Pain matrices and neuropathic pain matrices: a review." *Pain* 154 Suppl 1: S29-43.
- Garcia-Nicas, E., J. M. Laird and F. Cervero (2001). "Vasodilatation in hyperalgesic rat skin evoked by stimulation of afferent A beta-fibers: further evidence for a role of dorsal root reflexes in allodynia." *Pain* 94(3): 283-291.
- Gonzalez, M. I., M. J. Field, J. Hughes and L. Singh (2000). "Evaluation of selective NK(1) receptor antagonist CI-1021 in animal models of inflammatory and neuropathic pain." *J Pharmacol Exp Ther* 294(2): 444-450.
- Graham, S. H., F. R. Sharp and W. Dillon (1988). "Intraoral sensation in patients with brainstem lesions: role of the rostral spinal trigeminal nuclei in pons." *Neurology* 38(10): 1529-1533.
- Guy, N., A. R. Marques, T. Orliaguet, M. Lanteri-Minet, R. Dallel and P. Clavelou (2010). "Are there differences between cephalic and extracephalic cutaneous allodynia in migraine patients?" *Cephalalgia* 30(7): 881-886.
- Gwak, Y. S., C. E. Hulsebosch and J. W. Leem (2017). "Neuronal-Glial Interactions Maintain Chronic Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury." *Neural Plast* 2017: 2480689.
- Hagmann, H., Y. Taniguchi, J. W. Pippin, H. M. Kauerz, T. Benzing, S. J. Shankland and P. T. Brinkkoetter (2015). "Cyclin I and p35 determine the subcellular distribution of Cdk5." *Am J Physiol Cell Physiol* 308(4): C339-347.
- Hains, B. C., K. M. Johnson, M. J. Eaton, W. D. Willis and C. E. Hulsebosch (2003). "Serotonergic neural precursor cell grafts attenuate bilateral hyperexcitability of dorsal horn neurons after spinal hemisection in rat." *Neuroscience* 116(4): 1097-1110.
- Hall, B. E., M. Prochazkova, M. R. Sapio, P. Minetos, N. Kurochkina, B. K. Binukumar, N. D. Amin, A. Terse, J. Joseph, S. J. Raithel, A. J. Mannes, H. C. Pant, M. K. Chung, M. J. Iadarola and A. B.



Kulkarni (2018). "Phosphorylation of the Transient Receptor Potential Ankyrin 1 by Cyclin-dependent Kinase 5 affects Chemo-nociception." *Sci Rep* 8(1): 1177.

Han, L., C. Ma, Q. Liu, H. J. Weng, Y. Cui, Z. Tang, Y. Kim, H. Nie, L. Qu, K. N. Patel, Z. Li, B. McNeil, S. He, Y. Guan, B. Xiao, R. H. Lamotte and X. Dong (2013). "A subpopulation of nociceptors specifically linked to itch." *Nat Neurosci* 16(2): 174-182.

Harada, T., T. Morooka, S. Ogawa and E. Nishida (2001). "ERK induces p35, a neuron-specific activator of Cdk5, through induction of Egr1." *Nat Cell Biol* 3(5): 453-459.

Hargreaves, K. M. (2011). "Orofacial pain." *Pain* 152(3 Suppl): S25-32.

Hargreaves KM, G. H. e. (2000). "Seltzer and Bender's Dental Pulp." Chicago, Quintessence: 500.

Harvey, R. J., U. B. Depner, H. Wassele, S. Ahmadi, C. Heindl, H. Reinold, T. G. Smart, K. Harvey, B. Schutz, O. M. Abo-Salem, A. Zimmer, P. Poisbeau, H. Welzl, D. P. Wolfer, H. Betz, H. U. Zeilhofer and U. Muller (2004). "GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization." *Science* 304(5672): 884-887.

Haynes, S. E., G. Hollopeter, G. Yang, D. Kurpius, M. E. Dailey, W. B. Gan and D. Julius (2006). "The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides." *Nat Neurosci* 9(12): 1512-1519.

Hebb, D. O. (1949 ). "The organization of behaviour " Willey, New-York, USA.

Henssen, D., J. Dijk, R. Knepfle, M. Sieffers, A. Winter and K. Vissers (2019). "Alterations in grey matter density and functional connectivity in trigeminal neuropathic pain and trigeminal neuralgia: A systematic review and meta-analysis." *Neuroimage Clin* 24: 102039.

Henssen, D. J., E. Kurt, T. Kozicz, R. van Dongen, R. H. Bartels and A. M. van Cappellen van Walsum (2016). "New Insights in Trigeminal Anatomy: A Double Orofacial Tract for Nociceptive Input." *Front Neuroanat* 10: 53.

Herrero, J. F., J. M. Laird and J. A. Lopez-Garcia (2000). "Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something?" *Prog Neurobiol* 61(2): 169-203.

Hoffmann, K. D. and M. A. Matthews (1990). "Comparison of sympathetic neurons in orofacial and upper extremity nerves: implications for causalgia." *J Oral Maxillofac Surg* 48(7): 720-726; discussion 727.

Honda, K., J. Kitagawa, B. J. Sessle, M. Kondo, Y. Tsuboi, Y. Yonehara and K. Iwata (2008). "Mechanisms involved in an increment of multimodal excitability of medullary and upper cervical dorsal horn neurons following cutaneous capsaicin treatment." *Mol Pain* 4: 59.

Honjyo, Y., Y. Kawamoto, S. Nakamura, S. Nakano and I. Akiguchi (1999). "Immunohistochemical localization of CDK5 activator p39 in the rat brain." *Neuroreport* 10(16): 3375-3379.

Honore, P., D. Donnelly-Roberts, M. T. Namovic, G. Hsieh, C. Z. Zhu, J. P. Mikusa, G. Hernandez, C. Zhong, D. M. Gauvin, P. Chandran, R. Harris, A. P. Medrano, W. Carroll, K. Marsh, J. P. Sullivan, C. R. Faltynek and M. F. Jarvis (2006). "A-740003 [N-(1-[[[(cyanoimino)(5-quinolinylamino) methyl]amino]-2,2-dimethylpropyl]-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat." *J Pharmacol Exp Ther* 319(3): 1376-1385.

Hosobuchi, Y., J. E. Adams and R. Linchitz (1977). "Pain relief by electrical stimulation of the central gray matter in humans and its reversal by naloxone." *Science* 197(4299): 183-186.

Hossain, M. Z., M. M. Bakri, F. Yahya, H. Ando, S. Unno and J. Kitagawa (2019). "The Role of Transient Receptor Potential (TRP) Channels in the Transduction of Dental Pain." *Int J Mol Sci* 20(3).

Hu, J. W., B. J. Sessle, P. Raboisson, R. Dallel and A. Woda (1992). "Stimulation of craniofacial muscle afferents induces prolonged facilitatory effects in trigeminal nociceptive brain-stem neurones." *Pain* 48(1): 53-60.

Hu, J. W. and A. Woda (2013). Trigeminal Brainstem Nuclear Complex, Physiology. *Encyclopedia of Pain*. G. F. Gebhart and R. F. Schmidt. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 4060-4065.

Hu, J. W., A. Woda and B. J. Sessle (1999). "Effects of pre-emptive local anaesthesia on tooth pulp deafferentation-induced neuroplastic changes in cat trigeminal brainstem neurones." *Arch Oral Biol* 44(3): 287-293.

Hucho, T. and J. D. Levine (2007). "Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology." *Neuron* 55(3): 365-376.

Ikeda, H., T. Asai, M. Randic and K. Murase (1999). "Robust suppression of afferent-induced excitation in the rat spinal dorsal horn after conditioning low-frequency stimulation." *J Neurophysiol* 82(4): 1957-1964.

Ikeda, H., B. Heinke, R. Ruscheweyh and J. Sandkuhler (2003). "Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia." *Science* 299(5610): 1237-1240.

Ikeda, H., J. Stark, H. Fischer, M. Wagner, R. Drdla, T. Jager and J. Sandkuhler (2006). "Synaptic amplifier of inflammatory pain in the spinal dorsal horn." *Science* 312(5780): 1659-1662.

Iwata, K., Y. Imamura, K. Honda and M. Shinoda (2011). "Physiological mechanisms of neuropathic pain: the orofacial region." *Int Rev Neurobiol* 97: 227-250.

Iwata, K., Y. Tsuboi, A. Shima, T. Harada, K. Ren, K. Kanda and J. Kitagawa (2004). "Central neuronal changes after nerve injury: neuroplastic influences of injury and aging." *J Orofac Pain* 18(4): 293-298.

Iyengar, S., M. H. Ossipov and K. W. Johnson (2017). "The role of calcitonin gene-related peptide in peripheral and central pain mechanisms including migraine." *Pain* 158(4): 543-559.

Izumi, H. (1999). "Nervous control of blood flow in the orofacial region." *Pharmacol Ther* 81(2): 141-161.

Jaber, L., W. D. Swaim and R. A. Dionne (2003). "Immunohistochemical localization of mu-opioid receptors in human dental pulp." *J Endod* 29(2): 108-110.

Ji, R. R., H. Baba, G. J. Brenner and C. J. Woolf (1999). "Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity." *Nat Neurosci* 2(12): 1114-1119.

Ji, R. R., T. Berta and M. Nedergaard (2013). "Glia and pain: is chronic pain a gliopathy?" *Pain* 154 Suppl 1: S10-28.

Ji, R. R., C. R. Donnelly and M. Nedergaard (2019). "Astrocytes in chronic pain and itch." *Nat Rev Neurosci* 20(11): 667-685.

Ji, R. R., Y. Kawasaki, Z. Y. Zhuang, Y. R. Wen and Y. Q. Zhang (2007). "Protein kinases as potential targets for the treatment of pathological pain." *Handb Exp Pharmacol*(177): 359-389.

Ji, R. R., A. Nackley, Y. Huh, N. Terrando and W. Maixner (2018). "Neuroinflammation and Central Sensitization in Chronic and Widespread Pain." *Anesthesiology* 129(2): 343-366.

Jin, S. X., Z. Y. Zhuang, C. J. Woolf and R. R. Ji (2003). "p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain." *J Neurosci* 23(10): 4017-4022.

Johnson, L. R., A. R. Battle and B. Martinac (2019). "Remembering Mechanosensitivity of NMDA Receptors." *Front Cell Neurosci* 13: 533.

Julius, D. (2002). "The molecular biology of thermosensation; in Dostrovsky JO, Carr DB, Koltzenburg M

(eds): *Proceedings of the 10th World Congress on Pain.* Progress in Pain Research and Management. Seattle, IASP Press 24: 345-354.

Julius, D. and A. I. Basbaum (2001). "Molecular mechanisms of nociception." *Nature* 413(6852): 203-210.

Kandel, E. and J. Schwartz (1985). "Principles of Neural Science, 2nd Edition."

Kanpolat, Y., A. Savas, H. C. Ugur and M. Bozkurt (2005). "The trigeminal tract and nucleus procedures in treatment of atypical facial pain." *Surg Neurol* 64 Suppl 2: S96-100; discussion S100-101.

Kerr, F. W. (1970). "The fine structure of the subnucleus caudalis of the trigeminal nerve." *Brain Res* 23(2): 129-145.

Kibaly, C., H. H. Loh and P. Y. Law (2016). "A Mechanistic Approach to the Development of Gene Therapy for Chronic Pain." *Int Rev Cell Mol Biol* 327: 89-161.

Kidd, B. L. and L. A. Urban (2001). "Mechanisms of inflammatory pain." *Br J Anaesth* 87(1): 3-11.

Kim, H. Y., J. Jun, J. Wang, A. Bittar, K. Chung and J. M. Chung (2015). "Induction of long-term potentiation and long-term depression is cell-type specific in the spinal cord." *Pain* 156(4): 618-625.

Kim, Y. S., S. K. Paik, Y. S. Cho, H. S. Shin, J. Y. Bae, M. Moritani, A. Yoshida, D. K. Ahn, J. Valtschanoff, S. J. Hwang, C. Moon and Y. C. Bae (2008). "Expression of P2X3 receptor in the trigeminal sensory nuclei of the rat." *J Comp Neurol* 506(4): 627-639.

Kitagawa, J., M. Takeda, I. Suzuki, J. Kadoi, Y. Tsuboi, K. Honda, S. Matsumoto, H. Nakagawa, A. Tanabe and K. Iwata (2006). "Mechanisms involved in modulation of trigeminal primary afferent activity in rats with peripheral mononeuropathy." *Eur J Neurosci* 24(7): 1976-1986.

Klineberg I, S. B. e. D. R., ) ( 1985). "OroFacial Pain and Neuromuscular Dysfunction: Mechanisms and Clinical Correlates. Oxford,

Pergamon Press." 3-19.

Knabl, J., R. Witschi, K. Hosl, H. Reinold, U. B. Zeilhofer, S. Ahmadi, J. Brockhaus, M. Sergejeva, A. Hess, K. Brune, J. M. Fritschy, U. Rudolph, H. Mohler and H. U. Zeilhofer (2008). "Reversal of pathological pain through specific spinal GABAA receptor subtypes." *Nature* 451(7176): 330-334.

Ko, J., S. Humbert, R. T. Bronson, S. Takahashi, A. B. Kulkarni, E. Li and L. H. Tsai (2001). "p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment." *J Neurosci* 21(17): 6758-6771.

Kobayashi, K., H. Yamanaka, T. Fukuoka, Y. Dai, K. Obata and K. Noguchi (2008). "P2Y12 receptor upregulation in activated microglia is a gateway of p38 signaling and neuropathic pain." *J Neurosci* 28(11): 2892-2902.

Koerber, H. R., K. Mirnics, P. B. Brown and L. M. Mendell (1994). "Central sprouting and functional plasticity of regenerated primary afferents." *J Neurosci* 14(6): 3655-3671.

- Koltzenburg, M. and J. Scadding (2001). "Neuropathic pain." *Curr Opin Neurol* 14(5): 641-647.
- Kosugi, M., G. Kato, S. Lukashov, G. Pendse, Z. Puskar, M. Kozsurek and A. M. Strassman (2013). "Subpopulation-specific patterns of intrinsic connectivity in mouse superficial dorsal horn as revealed by laser scanning photostimulation." *J Physiol* 591(7): 1935-1949.
- Kumar, K., G. R. Polston and M. S. Wallace (2006). "The effect of intravenous ketorolac on capsaicin-induced deep tissue hyperalgesia." *Anesth Analg* 103(3): 696-702.
- Lagerstrom, M. C., K. Rogoz, B. Abrahamsen, E. Persson, B. Reinius, K. Nordenankar, C. Olund, C. Smith, J. A. Mendez, Z. F. Chen, J. N. Wood, A. Wallen-Mackenzie and K. Kullander (2010). "VGLUT2-dependent sensory neurons in the TRPV1 population regulate pain and itch." *Neuron* 68(3): 529-542.
- Lam, D. K., B. J. Sessle and J. W. Hu (2008). "Surgical incision can alter capsaicin-induced central sensitization in rat brainstem nociceptive neurons." *Neuroscience* 156(3): 737-747.
- Lam, D. K., B. J. Sessle and J. W. Hu (2009). "Glutamate and capsaicin effects on trigeminal nociception I: Activation and peripheral sensitization of deep craniofacial nociceptive afferents." *Brain Res* 1251: 130-139.
- LaMotte, R. H., C. N. Shain, D. A. Simone and E. F. Tsai (1991). "Neurogenic hyperalgesia: psychophysical studies of underlying mechanisms." *J Neurophysiol* 66(1): 190-211.
- Lapirot, O., R. Chebbi, L. Monconduit, A. Artola, R. Dallel and P. Luccarini (2009). "NK1 receptor-expressing spinoparabrachial neurons trigger diffuse noxious inhibitory controls through lateral parabrachial activation in the male rat." *Pain* 142(3): 245-254.
- Lapirot, O., C. Melin, A. Modolo, C. Nicolas, Y. Messaoudi, L. Monconduit, A. Artola, P. Luccarini and R. Dallel (2011). "Tonic and phasic descending dopaminergic controls of nociceptive transmission in the medullary dorsal horn." *Pain* 152(8): 1821-1831.
- Larsson, M. (2009). "Ionotropic glutamate receptors in spinal nociceptive processing." *Mol Neurobiol* 40(3): 260-288.
- Larsson, M. and J. Broman (2019). "Synaptic Organization of VGLUT3 Expressing Low-Threshold Mechanosensitive C Fiber Terminals in the Rodent Spinal Cord." *eNeuro* 6(1).
- Lau, B. K. and C. W. Vaughan (2014). "Descending modulation of pain: the GABA disinhibition hypothesis of analgesia." *Curr Opin Neurobiol* 29: 159-164.
- Lavigne, G. J. and B. J. Sessle (2016). "The Neurobiology of Orofacial Pain and Sleep and Their Interactions." *J Dent Res* 95(10): 1109-1116.

- Lazarov, N. E. (2002). "Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus." *Prog Neurobiol* 66(1): 19-59.
- Lee, J. H. and K. T. Kim (2004). "Induction of cyclin-dependent kinase 5 and its activator p35 through the extracellular-signal-regulated kinase and protein kinase A pathways during retinoic-acid mediated neuronal differentiation in human neuroblastoma SK-N-BE(2)C cells." *J Neurochem* 91(3): 634-647.
- Li, K., T. Lin, Y. Cao, A. R. Light and K. Y. Fu (2010). "Peripheral formalin injury induces 2 stages of microglial activation in the spinal cord." *J Pain* 11(11): 1056-1065.
- Li, K., G. Q. Zhao, L. Y. Li, G. Z. Wu and S. S. Cui (2014). "Epigenetic upregulation of Cdk5 in the dorsal horn contributes to neuropathic pain in rats." *Neuroreport* 25(14): 1116-1121.
- Li, S., I. Bjelobaba and S. S. Stojilkovic (2018). "Interactions of Pannexin1 channels with purinergic and NMDA receptor channels." *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1860(1): 166-173.
- Li, X. H., H. H. Miao and M. Zhuo (2019). "NMDA Receptor Dependent Long-term Potentiation in Chronic Pain." *Neurochem Res* 44(3): 531-538.
- Light, A. R. and E. R. Perl (1979). "Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers." *J Comp Neurol* 186(2): 133-150.
- Lin, J., Y. Y. Zhang, F. Liu, X. Y. Fang, M. K. Liu, C. L. Huang, H. Wang, D. Q. Liao, C. Zhou and J. F. Shen (2019). "The P2Y14 receptor in the trigeminal ganglion contributes to the maintenance of inflammatory pain." *Neurochem Int* 131: 104567.
- Lindia, J. A., E. McGowan, N. Jochowitz and C. Abbadie (2005). "Induction of CX3CL1 expression in astrocytes and CX3CR1 in microglia in the spinal cord of a rat model of neuropathic pain." *J Pain* 6(7): 434-438.
- Liu, J., J. Du, Y. Yang and Y. Wang (2015). "Phosphorylation of TRPV1 by cyclin-dependent kinase 5 promotes TRPV1 surface localization, leading to inflammatory thermal hyperalgesia." *Exp Neurol* 273: 253-262.
- Liu, P. Y., I. H. Lee, P. H. Tan, Y. P. Wang, C. F. Tsai, H. C. Lin, F. Y. Lee and C. L. Lu (2015). "P2X7 Receptor Mediates Spinal Microglia Activation of Visceral Hyperalgesia in a Rat Model of Chronic Pancreatitis." *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 1(6): 710-720 e715.
- Liu, X., Y. Liu, J. Zhang, W. Zhang, Y. E. Sun, X. Gu and Z. Ma (2014). "Intrathecal administration of roscovitine prevents remifentanyl-induced postoperative hyperalgesia and decreases the phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptor and metabotropic glutamate receptor 5 in spinal cord." *Brain Res Bull* 106: 9-16.

Liu, X. and J. Sandkuhler (1997). "Characterization of long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in spinal dorsal horn of adult rat: essential role of NK1 and NK2 receptors." *J Neurophysiol* 78(4): 1973-1982.

Liu, X. D., J. J. Wang, L. Sun, L. W. Chen, Z. R. Rao, L. Duan, R. Cao and M. Q. Wang (2009). "Involvement of medullary dorsal horn glial cell activation in mediation of masseter mechanical allodynia induced by experimental tooth movement." *Arch Oral Biol* 54(12): 1143-1150.

Liu, Y., K. Obata, H. Yamanaka, Y. Dai, T. Fukuoka, A. Tokunaga and K. Noguchi (2004). "Activation of extracellular signal-regulated protein kinase in dorsal horn neurons in the rat neuropathic intermittent claudication model." *Pain* 109(1-2): 64-72.

Lu, Y. and E. R. Perl (2005). "Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II)." *J Neurosci* 25(15): 3900-3907.

Luo, F., J. Zhang, K. Burke, R. H. Miller and Y. Yang (2016). "The Activators of Cyclin-Dependent Kinase 5 p35 and p39 Are Essential for Oligodendrocyte Maturation, Process Formation, and Myelination." *J Neurosci* 36(10): 3024-3037.

Luo, X., B. Fitzsimmons, A. Mohan, L. Zhang, N. Terrando, H. Kordasiewicz and R. R. Ji (2018). "Intrathecal administration of antisense oligonucleotide against p38alpha but not p38beta MAP kinase isoform reduces neuropathic and postoperative pain and TLR4-induced pain in male mice." *Brain Behav Immun* 72: 34-44.

Lynn, B. (1991). "'Silent' nociceptors in the skin." *Trends Neurosci* 14(3): 95.

Ma, W. and R. Quirion (2014). "Targeting cell surface trafficking of pain-facilitating receptors to treat chronic pain conditions." *Expert Opin Ther Targets* 18(4): 459-472.

Macfarlane, T. V., A. S. Blinkhorn, R. M. Davies, P. Ryan, H. V. Worthington and G. J. Macfarlane (2002). "Orofacial pain: just another chronic pain? Results from a population-based survey." *Pain* 99(3): 453-458.

Malan, T. P., H. P. Mata and F. Porreca (2002). "Spinal GABA(A) and GABA(B) receptor pharmacology in a rat model of neuropathic pain." *Anesthesiology* 96(5): 1161-1167.

Malenka, R. C. and R. A. Nicoll (1999). "Long-term potentiation--a decade of progress?" *Science* 285(5435): 1870-1874.

Malmberg, A. B., C. Chen, S. Tonegawa and A. I. Basbaum (1997). "Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKCgamma." *Science* 278(5336): 279-283.

Malumbres, M. (2014). "Cyclin-dependent kinases." *Genome Biol* 15(6): 122.

Mantyh, P. W., S. D. Rogers, P. Honore, B. J. Allen, J. R. Ghilardi, J. Li, R. S. Daughters, D. A. Lappi, R. G. Wiley and D. A. Simone (1997). "Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor." *Science* 278(5336): 275-279.

Mao, J., D. D. Price, R. L. Hayes, J. Lu, D. J. Mayer and H. Frenk (1993). "Intrathecal treatment with dextrophan or ketamine potently reduces pain-related behaviors in a rat model of peripheral mononeuropathy." *Brain Res* 605(1): 164-168.

Marchand, J. E., W. H. Wurm, T. Kato and R. M. Kream (1994). "Altered tachykinin expression by dorsal root ganglion neurons in a rat model of neuropathic pain." *Pain* 58(2): 219-231.

Marfurt, C. F. and D. M. Rajchert (1991). "Trigeminal primary afferent projections to "non-trigeminal" areas of the rat central nervous system." *J Comp Neurol* 303(3): 489-511.

Marshall, G. E., S. A. Shehab, R. C. Spike and A. J. Todd (1996). "Neurokinin-1 receptors on lumbar spinothalamic neurons in the rat." *Neuroscience* 72(1): 255-263.

Matsuzawa-Yanagida, K., M. Narita, M. Nakajima, N. Kuzumaki, K. Niikura, H. Nozaki, T. Takagi, E. Tamai, N. Hareyama, M. Terada, M. Yamazaki and T. Suzuki (2008). "Usefulness of antidepressants for improving the neuropathic pain-like state and pain-induced anxiety through actions at different brain sites." *Neuropsychopharmacology* 33(8): 1952-1965.

Matthews, B. (1989). "Autonomic mechanisms in oral sensations." *Proc Finn Dent Soc* 85(4-5): 365-373.

Mayer, D. J. and J. C. Liebeskind (1974). "Pain reduction by focal electrical stimulation of the brain: an anatomical and behavioral analysis." *Brain Res* 68(1): 73-93.

Mayer, D. J., D. D. Price and D. P. Becker (1975). "Neurophysiological characterization of the anterolateral spinal cord neurons contributing to pain perception in man." *Pain* 1(1): 51-58.

Merrill, R. L. (2007). "Central mechanisms of orofacial pain." *Dent Clin North Am* 51(1): 45-59, v.

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

Milligan, E. D. and L. R. Watkins (2009). "Pathological and protective roles of glia in chronic pain." *Nat Rev Neurosci* 10(1): 23-36.

Milligan, E. D., V. Zapata, M. Chacur, D. Schoeniger, J. Biedenkapp, K. A. O'Connor, G. M. Verge, G. Chapman, P. Green, A. C. Foster, G. S. Naeve, S. F. Maier and L. R. Watkins (2004). "Evidence that exogenous and endogenous fractalkine can induce spinal nociceptive facilitation in rats." *Eur J Neurosci* 20(9): 2294-2302.



Miraucourt, L. S., R. Dallel and D. L. Voisin (2007). "Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through PKC $\gamma$  interneurons." *PLoS One* 2(11): e11116.

Miraucourt, L. S., X. Moisset, R. Dallel and D. L. Voisin (2009). "Glycine inhibitory dysfunction induces a selectively dynamic, morphine-resistant, and neurokinin 1 receptor-independent mechanical allodynia." *J Neurosci* 29(8): 2519-2527.

Miraucourt, L. S., C. Peirs, R. Dallel and D. L. Voisin (2011). "Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through astrocyte-derived D-serine." *Pain* 152(6): 1340-1348.

Miyamoto, M., Y. Tsuboi, K. Takamiya, R. L. Huganir, M. Kondo, M. Shinoda, Y. Oi and K. Iwata (2011). "Involvement of GluR2 and GluR3 subunit C-termini in the trigeminal spinal subnucleus caudalis and C1-C2 neurons in trigeminal neuropathic pain." *Neurosci Lett* 491(1): 8-12.

Moayedi, M. and M. Hodaie (2019). "Trigeminal nerve and white matter brain abnormalities in chronic orofacial pain disorders." *Pain Rep* 4(4): e755.

Moisset, X., V. Calbacho, P. Torres, C. Gremeau-Richard and R. Dallel (2016). "Co-occurrence of Pain Symptoms and Somatosensory Sensitivity in Burning Mouth Syndrome: A Systematic Review." *PLoS One* 11(9): e0163449.

Morales-Soto, W. and B. D. Gulbransen (2019). "Enteric Glia: A New Player in Abdominal Pain." *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 7(2): 433-445.

Morel, V., D. Joly, C. Villatte, C. Dubray, X. Durando, L. Daulhac, C. Coudert, D. Roux, B. Pereira and G. Pickering (2016). "Memantine before Mastectomy Prevents Post-Surgery Pain: A Randomized, Blinded Clinical Trial in Surgical Patients." *PLoS One* 11(4): e0152741.

Morgan, J. R. and G. F. Gebhart (2008). "Characterization of a model of chronic orofacial hyperalgesia in the rat: contribution of NA(V) 1.8." *J Pain* 9(6): 522-531.

Moutal, A., S. Luo, T. M. Largent-Milnes, T. W. Vanderah and R. Khanna (2019). "Cdk5-mediated CRMP2 phosphorylation is necessary and sufficient for peripheral neuropathic pain." *Neurobiol Pain* 5.

Muller, F., B. Heinke and J. Sandkuhler (2003). "Reduction of glycine receptor-mediated miniature inhibitory postsynaptic currents in rat spinal lamina I neurons after peripheral inflammation." *Neuroscience* 122(3): 799-805.

Nair, A., M. Simonetti, E. Fabbretti and A. Nistri (2010). "The Cdk5 kinase downregulates ATP-gated ionotropic P2X3 receptor function via serine phosphorylation." *Cell Mol Neurobiol* 30(4): 505-509.

Nakagawa, K., M. Takeda, Y. Tsuboi, M. Kondo, J. Kitagawa, S. Matsumoto, A. Kobayashi, B. J. Sessle, M. Shinoda and K. Iwata (2010). "Alteration of primary afferent activity following inferior alveolar nerve transection in rats." *Mol Pain* 6: 9.

Nakajima, A., Y. Tsuboi, I. Suzuki, K. Honda, M. Shinoda, M. Kondo, S. Matsuura, K. Shibuta, M. Yasuda, N. Shimizu and K. Iwata (2011). "PKC $\gamma$  in Vc and C1/C2 is involved in trigeminal neuropathic pain." *J Dent Res* 90(6): 777-781.

Nassenstein, C., T. E. Taylor-Clark, A. C. Myers, F. Ru, R. Nandigama, W. Bettner and B. J. Udem (2010). "Phenotypic distinctions between neural crest and placodal derived vagal C-fibres in mouse lungs." *J Physiol* 588(Pt 23): 4769-4783.

Nazemi, S., H. Manaheji, S. M. Noorbakhsh, J. Zaringhalam, M. Sadeghi, M. Mohammad-Zadeh and A. Haghparast (2015). "Inhibition of microglial activity alters spinal wide dynamic range neuron discharge and reduces microglial Toll-like receptor 4 expression in neuropathic rats." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 42(7): 772-779.

Nichols, M. L., B. J. Allen, S. D. Rogers, J. R. Ghilardi, P. Honore, N. M. Luger, M. P. Finke, J. Li, D. A. Lappi, D. A. Simone and P. W. Mantyh (1999). "Transmission of chronic nociception by spinal neurons expressing the substance P receptor." *Science* 286(5444): 1558-1561.

Nieuwenhuys R, V. J., van Huijzen C (2008). "The human central nervous system."

Nishimori, T., M. Sera, S. Suemune, A. Yoshida, K. Tsuru, Y. Tsuiki, T. Akisaka, T. Okamoto, Y. Dateoka and Y. Shigenaga (1986). "The distribution of muscle primary afferents from the masseter nerve to the trigeminal sensory nuclei." *Brain Res* 372(2): 375-381.

Noguchi, K., Y. Kawai, T. Fukuoka, E. Senba and K. Miki (1995). "Substance P induced by peripheral nerve injury in primary afferent sensory neurons and its effect on dorsal column nucleus neurons." *J Neurosci* 15(11): 7633-7643.

Normandin, A., P. Luccarini, J. L. Molat, L. Gendron and R. Dallel (2013). "Spinal mu and delta opioids inhibit both thermal and mechanical pain in rats." *J Neurosci* 33(28): 11703-11714.

Obi, T., M. Takatsu, K. Yamazaki, R. Kuroda, T. Terada and K. Mizoguchi (2007). "Conduction velocities of Adelta-fibers and C-fibers in human peripheral nerves and spinal cord after CO<sub>2</sub> laser stimulation." *J Clin Neurophysiol* 24(3): 294-297.

Ochoa, J. L. and D. Yarnitsky (1993). "Mechanical hyperalgesias in neuropathic pain patients: dynamic and static subtypes." *Ann Neurol* 33(5): 465-472.

Odajima, J., Z. P. Wills, Y. M. Ndassa, M. Terunuma, K. Kretschmannova, T. Z. Deeb, Y. Geng, S. Gawrzak, I. M. Quadros, J. Newman, M. Das, M. E. Jecrois, Q. Yu, N. Li, F. Bienvenu, S. J. Moss, M. E. Greenberg, J. A. Marto and P. Sicinski (2011). "Cyclin E constrains Cdk5 activity to regulate synaptic plasticity and memory formation." *Dev Cell* 21(4): 655-668.

Okamoto, K., H. Hirata, S. Takeshita and D. A. Bereiter (2003). "Response properties of TMJ units in superficial laminae at the spinomedullary junction of female rats vary over the estrous cycle." *J Neurophysiol* 89(3): 1467-1477.

Olsen, M. L., B. S. Khakh, S. N. Skatchkov, M. Zhou, C. J. Lee and N. Rouach (2015). "New Insights on Astrocyte Ion Channels: Critical for Homeostasis and Neuron-Glia Signaling." *J Neurosci* 35(41): 13827-13835.

Olszewski, J. (1950). "On the anatomical and functional organization of the spinal trigeminal nucleus." *J Comp Neurol* 92(3): 401-413.

Ossipov, M. H., K. Morimura and F. Porreca (2014). "Descending pain modulation and chronification of pain." *Curr Opin Support Palliat Care* 8(2): 143-151.

Paige, C., G. B. Maruthy, G. Mejia, G. Dussor and T. Price (2018). "Spinal Inhibition of P2XR or p38 Signaling Disrupts Hyperalgesic Priming in Male, but not Female, Mice." *Neuroscience* 385: 133-142.

Pajot, J., C. Ressot, I. Ngom and A. Woda (2003). "Gonadectomy induces site-specific differences in nociception in rats." *Pain* 104(1-2): 367-373.

Panneton, W. M. (1991). "Primary afferent projections from the upper respiratory tract in the muskrat." *J Comp Neurol* 308(1): 51-65.

Panneton, W. M., S. N. Johnson and N. D. Christensen (1994). "Trigeminal projections to the peribrachial region in the muskrat." *Neuroscience* 58(3): 605-625.

Pareek, T. K., J. Keller, S. Kesavapany, N. Agarwal, R. Kuner, H. C. Pant, M. J. Iadarola, R. O. Brady and A. B. Kulkarni (2007). "Cyclin-dependent kinase 5 modulates nociceptive signaling through direct phosphorylation of transient receptor potential vanilloid 1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(2): 660-665.

Pareek, T. K., J. Keller, S. Kesavapany, H. C. Pant, M. J. Iadarola, R. O. Brady and A. B. Kulkarni (2006). "Cyclin-dependent kinase 5 activity regulates pain signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(3): 791-796.

Pareek, T. K. and A. B. Kulkarni (2006). "Cdk5: a new player in pain signaling." *Cell Cycle* 5(6): 585-588.

Park, S. J., S. Zhang, C. Y. Chiang, J. W. Hu, J. O. Dostrovsky and B. J. Sessle (2006). "Central sensitization induced in thalamic nociceptive neurons by tooth pulp stimulation is dependent on the functional integrity of trigeminal brainstem subnucleus caudalis but not subnucleus oralis." *Brain Res* 1112(1): 134-145.

Patrick, G. N., L. Zukerberg, M. Nikolic, S. de la Monte, P. Dikkes and L. H. Tsai (1999). "Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration." *Nature* 402(6762): 615-622.

Paxinos, G. (2004). "The rat nervous system." 149-164.

Peirs, C., N. Bourgois, A. Artola and R. Dallel (2016). "Protein Kinase C gamma Interneurons Mediate C-fiber-induced Orofacial Secondary Static Mechanical Allodynia, but Not C-fiber-induced Nociceptive Behavior." *Anesthesiology* 124(5): 1136-1152.

Peirs, C., S. Patil, R. Bouali-Benazzouz, A. Artola, M. Landry and R. Dallel (2014). "Protein kinase C gamma interneurons in the rat medullary dorsal horn: distribution and synaptic inputs to these neurons, and subcellular localization of the enzyme." *J Comp Neurol* 522(2): 393-413.

Pinto, L. G., G. R. Souza, R. Kusuda, A. H. Lopes, M. B. Sant'Anna, F. Q. Cunha, S. H. Ferreira and T. M. Cunha (2019). "Non-Peptidergic Nociceptive Neurons Are Essential for Mechanical Inflammatory Hypersensitivity in Mice." *Mol Neurobiol* 56(8): 5715-5728.

Polgar, E., S. Gray, J. S. Riddell and A. J. Todd (2004). "Lack of evidence for significant neuronal loss in laminae I-III of the spinal dorsal horn of the rat in the chronic constriction injury model." *Pain* 111(1-2): 144-150.

Polgar, E., D. I. Hughes, A. Z. Arham and A. J. Todd (2005). "Loss of neurons from laminae I-III of the spinal dorsal horn is not required for development of tactile allodynia in the spared nerve injury model of neuropathic pain." *J Neurosci* 25(28): 6658-6666.

Polgar, E., D. I. Hughes, J. S. Riddell, D. J. Maxwell, Z. Puskar and A. J. Todd (2003). "Selective loss of spinal GABAergic or glycinergic neurons is not necessary for development of thermal hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain." *Pain* 104(1-2): 229-239.

Price, T. J., F. Cervero, M. S. Gold, D. L. Hammond and S. A. Prescott (2009). "Chloride regulation in the pain pathway." *Brain Res Rev* 60(1): 149-170.

Prochazkova, M., B. Hall, M. Hu, T. Okine, J. Reukauf, B. K. Binukumar, N. D. Amin, E. Roque, H. C. Pant and A. Kulkarni (2017). "Peripheral and orofacial pain sensation is unaffected by the loss of p39." *Mol Pain* 13: 1744806917737205.

Puebla-Díaz, F. (2005). "Tipos de dolor y escala terapéutica de la O.M.S. Dolor iatrogénico." *Oncologia* 28(3): 33-37.

Qiao, L. Y., S. Shen, M. Liu, C. Xia, J. C. Kay and Q. L. Zhang (2016). "Inflammation and activity augment brain-derived neurotrophic factor peripheral release." *Neuroscience* 318: 114-121.

Raboisson, P., R. Dallel and A. Woda (1989). "Responses of neurones in the ventrobasal complex of the thalamus to orofacial noxious stimulation after large trigeminal tractotomy." *Exp Brain Res* 77(3): 569-576.

Randic, M., M. C. Jiang and R. Cerne (1993). "Long-term potentiation and long-term depression of primary afferent neurotransmission in the rat spinal cord." *J Neurosci* 13(12): 5228-5241.

- Raney, R., A. A. Raney and C. R. Hunter (1950). "Treatment of major trigeminal neuralgia through section of the trigeminospinal tract in the medulla." *Am J Surg* 80(1): 11-17.
- Ren, K. and R. Dubner (2008). "Neuron-glia crosstalk gets serious: role in pain hypersensitivity." *Curr Opin Anaesthesiol* 21(5): 570-579.
- Rexed, B. (1952). "The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat." *J Comp Neurol* 96(3): 414-495.
- Reynolds, D. V. (1969). "Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation." *Science* 164(3878): 444-445.
- Richter, F., G. Natura, S. Loser, K. Schmidt, H. Viisanen and H. G. Schaible (2010). "Tumor necrosis factor causes persistent sensitization of joint nociceptors to mechanical stimuli in rats." *Arthritis Rheum* 62(12): 3806-3814.
- Rodriguez, E., K. Sakurai, J. Xu, Y. Chen, K. Toda, S. Zhao, B. X. Han, D. Ryu, H. Yin, W. Liedtke and F. Wang (2017). "A craniofacial-specific monosynaptic circuit enables heightened affective pain." *Nat Neurosci* 20(12): 1734-1743.
- Ruscheweyh, R., A. Goralczyk, G. Wunderbaldinger, A. Schober and J. Sandkuhler (2006). "Possible sources and sites of action of the nitric oxide involved in synaptic plasticity at spinal lamina I projection neurons." *Neuroscience* 141(2): 977-988.
- Sahlgren, C. M., H. M. Pallari, T. He, Y. H. Chou, R. D. Goldman and J. E. Eriksson (2006). "A nestin scaffold links Cdk5/p35 signaling to oxidant-induced cell death." *EMBO J* 25(20): 4808-4819.
- Samad, T. A., K. A. Moore, A. Sapirstein, S. Billet, A. Allchorne, S. Poole, J. V. Bonventre and C. J. Woolf (2001). "Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity." *Nature* 410(6827): 471-475.
- Sandkuhler, J. (2009). "Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia." *Physiol Rev* 89(2): 707-758.
- Sandkuhler, J. and D. Gruber-Schoffnegger (2012). "Hyperalgesia by synaptic long-term potentiation (LTP): an update." *Curr Opin Pharmacol* 12(1): 18-27.
- Scanlon, G. C., M. S. Wallace, J. S. Ispirescu and G. Schulteis (2006). "Intradermal capsaicin causes dose-dependent pain, allodynia, and hyperalgesia in humans." *J Investig Med* 54(5): 238-244.
- Schmidt, R., M. Schmelz, C. Forster, M. Ringkamp, E. Torebjork and H. Handwerker (1995). "Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin." *J Neurosci* 15(1 Pt 1): 333-341.

Scholz, J., D. C. Broom, D. H. Youn, C. D. Mills, T. Kohno, M. R. Suter, K. A. Moore, I. Decosterd, R. E. Coggeshall and C. J. Woolf (2005). "Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury." *J Neurosci* 25(32): 7317-7323.

Scholz, J. and C. J. Woolf (2002). "Can we conquer pain?" *Nat Neurosci* 5 Suppl: 1062-1067.

Scholz, J. and C. J. Woolf (2007). "The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia." *Nat Neurosci* 10(11): 1361-1368.

Seal, R. P., X. Wang, Y. Guan, S. N. Raja, C. J. Woodbury, A. I. Basbaum and R. H. Edwards (2009). "Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors." *Nature* 462(7273): 651-655.

Sekhon, K. K., S. R. Fashler, J. Versloot, S. Lee and K. D. Craig (2017). "Children's Behavioral Pain Cues: Implicit Automaticity and Control Dimensions in Observational Measures." *Pain Res Manag* 2017: 3017837.

Sekiguchi, K., S. Takehana, E. Shibuya, N. Matsuzawa, S. Hidaka, Y. Kanai, M. Inoue, Y. Kubota, Y. Shimazu and M. Takeda (2016). "Resveratrol attenuates inflammation-induced hyperexcitability of trigeminal spinal nucleus caudalis neurons associated with hyperalgesia in rats." *Mol Pain* 12.

Seo, J., P. Giusti-Rodriguez, Y. Zhou, A. Rudenko, S. Cho, K. T. Ota, C. Park, H. Patzke, R. Madabhushi, L. Pan, A. E. Mungenast, J. S. Guan, I. Delalle and L. H. Tsai (2014). "Activity-dependent p25 generation regulates synaptic plasticity and Aβ-induced cognitive impairment." *Cell* 157(2): 486-498.

Sessle, B. (2005). "Orofacial pain; in Merskey H, Loeser JD, Dubner R (eds): *The Paths of Pain*

" IASP Press: 131–150.

Sessle, B. J. (2000). "Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates." *Crit Rev Oral Biol Med* 11(1): 57-91.

Sessle, B. J. (2011). "Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain." *Int Rev Neurobiol* 97: 179-206.

Shah, K. and D. K. Lahiri (2014). "Cdk5 activity in the brain - multiple paths of regulation." *J Cell Sci* 127(Pt 11): 2391-2400.

Shehab, S. A., R. C. Spike and A. J. Todd (2003). "Evidence against cholera toxin B subunit as a reliable tracer for sprouting of primary afferents following peripheral nerve injury." *Brain Res* 964(2): 218-227.

Shelukhina, I., R. Paddenberg, W. Kummer and V. Tsetlin (2015). "Functional expression and axonal transport of alpha7 nAChRs by peptidergic nociceptors of rat dorsal root ganglion." *Brain Struct Funct* 220(4): 1885-1899.

Shigenaga, Y., M. Sera, T. Nishimori, S. Suemune, M. Nishimura, A. Yoshida and K. Tsuru (1988). "The central projection of masticatory afferent fibers to the trigeminal sensory nuclear complex and upper cervical spinal cord." *J Comp Neurol* 268(4): 489-507.

Shinoda, M., K. Kawashima, N. Ozaki, H. Asai, K. Nagamine and Y. Sugiura (2007). "P2X3 receptor mediates heat hyperalgesia in a rat model of trigeminal neuropathic pain." *J Pain* 8(7): 588-597.

Shortland, P. J., J. A. DeMaro and M. F. Jacquin (1995). "Trigeminal structure-function relationships: a reevaluation based on long-range staining of a large sample of brainstem alpha beta fibers." *Somatosens Mot Res* 12(3-4): 249-275.

Simone, D. A., L. S. Sorkin, U. Oh, J. M. Chung, C. Owens, R. H. LaMotte and W. D. Willis (1991). "Neurogenic hyperalgesia: central neural correlates in responses of spinothalamic tract neurons." *J Neurophysiol* 66(1): 228-246.

Sivilotti, L. and C. J. Woolf (1994). "The contribution of GABAA and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord." *J Neurophysiol* 72(1): 169-179.

Sivilotti, L. G., S. W. Thompson and C. J. Woolf (1993). "Rate of rise of the cumulative depolarization evoked by repetitive stimulation of small-caliber afferents is a predictor of action potential windup in rat spinal neurons in vitro." *J Neurophysiol* 69(5): 1621-1631.

Slugg, R. M., R. A. Meyer and J. N. Campbell (2000). "Response of cutaneous A- and C-fiber nociceptors in the monkey to controlled-force stimuli." *J Neurophysiol* 83(4): 2179-2191.

Sluka, K. A. (2002). "Stimulation of deep somatic tissue with capsaicin produces long-lasting mechanical allodynia and heat hypoalgesia that depends on early activation of the cAMP pathway." *J Neurosci* 22(13): 5687-5693.

Sonohata, M., H. Furue, T. Katafuchi, T. Yasaka, A. Doi, E. Kumamoto and M. Yoshimura (2004). "Actions of noradrenaline on substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord revealed by in vivo patch recording." *J Physiol* 555(Pt 2): 515-526.

Spike, R. C., Z. Puskar, D. Andrew and A. J. Todd (2003). "A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord." *Eur J Neurosci* 18(9): 2433-2448.

Strock, C. J., J. I. Park, E. K. Nakakura, G. S. Bova, J. T. Isaacs, D. W. Ball and B. D. Nelkin (2006). "Cyclin-dependent kinase 5 activity controls cell motility and metastatic potential of prostate cancer cells." *Cancer Res* 66(15): 7509-7515.

Sugimoto, T., G. J. Bennett and K. C. Kajander (1990). "Transsynaptic degeneration in the superficial dorsal horn after sciatic nerve injury: effects of a chronic constriction injury, transection, and strychnine." *Pain* 42(2): 205-213.

Sugiura, Y., N. Terui and Y. Hosoya (1989). "Difference in distribution of central terminals between visceral and somatic unmyelinated (C) primary afferent fibers." *J Neurophysiol* 62(4): 834-840.

Sulak, M. A., M. Ghosh, P. Sinharoy, S. R. Andrei and D. S. Damron (2018). "Modulation of TRPA1 channel activity by Cdk5 in sensory neurons." *Channels (Austin)* 12(1): 65-75.

Sun, L. H., W. X. Zhang, Q. Xu, H. Wu, C. C. Jiao and X. Z. Chen (2019). "Estrogen modulation of visceral pain." *J Zhejiang Univ Sci B* 20(8): 628-636.

Sunakawa, M., C. Y. Chiang, B. J. Sessle and J. W. Hu (1999). "Jaw electromyographic activity induced by the application of algescic chemicals to the rat tooth pulp." *Pain* 80(3): 493-501.

Sundaram, J. R., C. P. Poore, N. H. Sulaimie, T. Pareek, A. B. Asad, R. Rajkumar, W. F. Cheong, M. R. Wenk, G. S. Dawe, K. H. Chuang, H. C. Pant and S. Kesavapany (2013). "Specific inhibition of p25/Cdk5 activity by the Cdk5 inhibitory peptide reduces neurodegeneration in vivo." *J Neurosci* 33(1): 334-343.

Suzuki, I., Y. Tsuboi, M. Shinoda, K. Shibuta, K. Honda, A. Katagiri, M. Kiyomoto, B. J. Sessle, S. Matsuura, K. Ohara, K. Urata and K. Iwata (2013). "Involvement of ERK phosphorylation of trigeminal spinal subnucleus caudalis neurons in thermal hypersensitivity in rats with infraorbital nerve injury." *PLoS One* 8(2): e57278.

Suzuki, R., S. Morcuende, M. Webber, S. P. Hunt and A. H. Dickenson (2002). "Superficial NK1-expressing neurons control spinal excitability through activation of descending pathways." *Nat Neurosci* 5(12): 1319-1326.

Suzuki, R., W. Rahman, L. J. Rygh, M. Webber, S. P. Hunt and A. H. Dickenson (2005). "Spinal-supraspinal serotonergic circuits regulating neuropathic pain and its treatment with gabapentin." *Pain* 117(3): 292-303.

Svensson, C. I., B. Fitzsimmons, S. Azizi, H. C. Powell, X. Y. Hua and T. L. Yaksh (2005). "Spinal p38beta isoform mediates tissue injury-induced hyperalgesia and spinal sensitization." *J Neurochem* 92(6): 1508-1520.

Takahashi, S., T. Saito, S. Hisanaga, H. C. Pant and A. B. Kulkarni (2003). "Tau phosphorylation by cyclin-dependent kinase 5/p39 during brain development reduces its affinity for microtubules." *J Biol Chem* 278(12): 10506-10515.

Tal, M. and M. Devor (1992). "Ectopic discharge in injured nerves: comparison of trigeminal and somatic afferents." *Brain Res* 579(1): 148-151.



Tammiala-Salonen, T., T. Hiidenkari and T. Parvinen (1993). "Burning mouth in a Finnish adult population." *Community Dent Oral Epidemiol* 21(2): 67-71.

Tanaka, C. and N. Saito (1992). "Localization of subspecies of protein kinase C in the mammalian central nervous system." *Neurochem Int* 21(4): 499-512.

Taves, S., T. Berta, D. L. Liu, S. Gan, G. Chen, Y. H. Kim, T. Van de Ven, S. Laufer and R. R. Ji (2016). "Spinal inhibition of p38 MAP kinase reduces inflammatory and neuropathic pain in male but not female mice: Sex-dependent microglial signaling in the spinal cord." *Brain Behav Immun* 55: 70-81.

Teodoro, F. C., M. F. Tronco Junior, A. R. Zampronio, A. C. Martini, G. A. Rae and J. G. Chichorro (2013). "Peripheral substance P and neurokinin-1 receptors have a role in inflammatory and neuropathic orofacial pain models." *Neuropeptides* 47(3): 199-206.

Todd, A. J. (2010). "Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn." *Nat Rev Neurosci* 11(12): 823-836.

Todd, A. J., M. M. McGill and S. A. Shehab (2000). "Neurokinin 1 receptor expression by neurons in laminae I, III and IV of the rat spinal dorsal horn that project to the brainstem." *Eur J Neurosci* 12(2): 689-700.

Todd, A. J., E. Polgar, C. Watt, M. E. Bailey and M. Watanabe (2009). "Neurokinin 1 receptor-expressing projection neurons in laminae III and IV of the rat spinal cord have synaptic AMPA receptors that contain GluR2, GluR3 and GluR4 subunits." *Eur J Neurosci* 29(4): 718-726.

Todd, A. J. and A. C. Sullivan (1990). "Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat." *J Comp Neurol* 296(3): 496-505.

Tong, X., Y. Ao, G. C. Faas, S. E. Nwaobi, J. Xu, M. D. Haustein, M. A. Anderson, I. Mody, M. L. Olsen, M. V. Sofroniew and B. S. Khakh (2014). "Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington's disease model mice." *Nat Neurosci* 17(5): 694-703.

Torebjork, H. E., L. E. Lundberg and R. H. LaMotte (1992). "Central changes in processing of mechanoreceptive input in capsaicin-induced secondary hyperalgesia in humans." *J Physiol* 448: 765-780.

Torrance, N., B. H. Smith, M. I. Bennett and A. J. Lee (2006). "The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey." *J Pain* 7(4): 281-289.

Tozaki-Saitoh, H., M. Tsuda, H. Miyata, K. Ueda, S. Kohsaka and K. Inoue (2008). "P2Y<sub>12</sub> receptors in spinal microglia are required for neuropathic pain after peripheral nerve injury." *J Neurosci* 28(19): 4949-4956.

Tracey, D. J. and P. M. E. Waite (1995). "Somatosensory System, In: G. Paxinos, Ed., The Rat Nervous System." Academic Press, San Diego: 689-704.

Trang, T., S. Beggs, X. Wan and M. W. Salter (2009). "P2X4-receptor-mediated synthesis and release of brain-derived neurotrophic factor in microglia is dependent on calcium and p38-mitogen-activated protein kinase activation." *J Neurosci* 29(11): 3518-3528.

Tsuboi, Y., K. Iwata, J. O. Dostrovsky, C. Y. Chiang, B. J. Sessle and J. W. Hu (2011). "Modulation of astroglial glutamine synthetase activity affects nociceptive behaviour and central sensitization of medullary dorsal horn nociceptive neurons in a rat model of chronic pulpitis." *Eur J Neurosci* 34(2): 292-302.

Tsuboi, Y., M. Takeda, T. Tanimoto, M. Ikeda, S. Matsumoto, J. Kitagawa, K. Teramoto, K. Simizu, Y. Yamazaki, A. Shima, K. Ren and K. Iwata (2004). "Alteration of the second branch of the trigeminal nerve activity following inferior alveolar nerve transection in rats." *Pain* 111(3): 323-334.

Tsuda, M., K. Inoue and M. W. Salter (2005). "Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia." *Trends Neurosci* 28(2): 101-107.

Tsuda, M., A. Mizokoshi, Y. Shigemoto-Mogami, S. Koizumi and K. Inoue (2004). "Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury." *Glia* 45(1): 89-95.

Tsuda, M., Y. Shigemoto-Mogami, S. Koizumi, A. Mizokoshi, S. Kohsaka, M. W. Salter and K. Inoue (2003). "P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury." *Nature* 424(6950): 778-783.

Tsuda, M., E. Toyomitsu, T. Komatsu, T. Masuda, E. Kunifusa, K. Nasu-Tada, S. Koizumi, K. Yamamoto, J. Ando and K. Inoue (2008). "Fibronectin/integrin system is involved in P2X(4) receptor upregulation in the spinal cord and neuropathic pain after nerve injury." *Glia* 56(5): 579-585.

Tsuda, M., H. Tozaki-Saitoh, T. Masuda, E. Toyomitsu, T. Tezuka, T. Yamamoto and K. Inoue (2008). "Lyn tyrosine kinase is required for P2X(4) receptor upregulation and neuropathic pain after peripheral nerve injury." *Glia* 56(1): 50-58.

Ulmann, L., J. P. Hatcher, J. P. Hughes, S. Chaumont, P. J. Green, F. Conquet, G. N. Buell, A. J. Reeve, I. P. Chessell and F. Rassendren (2008). "Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain." *J Neurosci* 28(44): 11263-11268.

Utreras, E., A. Futatsugi, T. K. Pareek and A. B. Kulkarni (2009). "Molecular Roles of Cdk5 in Pain Signaling." *Drug Discov Today Ther Strateg* 6(3): 105-111.

van Hecke, O., S. K. Austin, R. A. Khan, B. H. Smith and N. Torrance (2014). "Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies." *Pain* 155(4): 654-662.

van Hecke, O., N. Torrance and B. H. Smith (2013). "Chronic pain epidemiology - where do lifestyle factors fit in?" *Br J Pain* 7(4): 209-217.

van Hecke, O., N. Torrance and B. H. Smith (2013). "Chronic pain epidemiology and its clinical relevance." *Br J Anaesth* 111(1): 13-18.

Vassal, F., C. Creac'h, P. Convers, B. Laurent, L. Garcia-Larrea and R. Peyron (2013). "Modulation of laser-evoked potentials and pain perception by transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS): a placebo-controlled study in healthy volunteers." *Clin Neurophysiol* 124(9): 1861-1867.

Virtuoso, A., C. Herrera-Rincon, M. Papa and F. Panetsos (2019). "Dependence of Neuroprosthetic Stimulation on the Sensory Modality of the Trigeminal Neurons Following Nerve Injury. Implications in the Design of Future Sensory Neuroprostheses for Correct Perception and Modulation of Neuropathic Pain." *Front Neurosci* 13: 389.

Visseq, A., A. Descheemaeker, N. Pinto-Pardo, L. Nauton, V. Thery, F. Giraud, I. Abrunhosa-Thomas, A. Artola, F. Anizon, R. Dallel and P. Moreau (2020). "Pyridin-2(1H)one derivatives: A possible new class of therapeutics for mechanical allodynia." *Eur J Med Chem* 187: 111917.

Vit, J. P., P. T. Ohara, D. A. Tien, J. R. Fike, L. Eikmeier, A. Beitz, G. L. Wilcox and L. Jasmin (2006). "The analgesic effect of low dose focal irradiation in a mouse model of bone cancer is associated with spinal changes in neuro-mediators of nociception." *Pain* 120(1-2): 188-201.

Watanabe, S., K. Uchida, H. Nakajima, H. Matsuo, D. Sugita, A. Yoshida, K. Honjoh, W. E. Johnson and H. Baba (2015). "Early transplantation of mesenchymal stem cells after spinal cord injury relieves pain hypersensitivity through suppression of pain-related signaling cascades and reduced inflammatory cell recruitment." *Stem Cells* 33(6): 1902-1914.

Watkins, R. H., J. Wessberg, H. Backlund Wasling, J. P. Dunham, H. Olausson, R. D. Johnson and R. Ackerley (2017). "Optimal delineation of single C-tactile and C-nociceptive afferents in humans by latency slowing." *J Neurophysiol* 117(4): 1608-1614.

Wei, F. Y., K. Tomizawa, T. Ohshima, A. Asada, T. Saito, C. Nguyen, J. A. Bibb, K. Ishiguro, A. B. Kulkarni, H. C. Pant, K. Mikoshiba, H. Matsui and S. Hisanaga (2005). "Control of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activity by glutamatergic regulation of p35 stability." *J Neurochem* 93(2): 502-512.

Wei, J., R. G. Marangoni, F. Fang, W. Wang, J. Huang, J. H. W. Distler and J. Varga (2018). "The non-neuronal cyclin-dependent kinase 5 is a fibrotic mediator potentially implicated in systemic sclerosis and a novel therapeutic target." *Oncotarget* 9(12): 10294-10306.

Wen, Y. R., M. R. Suter, R. R. Ji, G. C. Yeh, Y. S. Wu, K. C. Wang, T. Kohno, W. Z. Sun and C. C. Wang (2009). "Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia contributes to incision-induced mechanical allodynia." *Anesthesiology* 110(1): 155-165.

Willer, J. C., D. Bouhassira and D. Le Bars (1999). "[Neurophysiological bases of the counterirritation phenomenon: diffuse control inhibitors induced by nociceptive stimulation]." *Neurophysiol Clin* 29(5): 379-400.

Willis, W. D. and R. E. Coggeshall (2004). "Sensory Mechanisms of the Spinal Cord." New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Wilson Gerard, M. (1923). "Afferent impulses of trigeminal nerve: The intramedullary course of the painful, Thermal and tactile impulses." *Arch NeurPsych* 9(3): 306-338.

Woda, A. (2003). "Pain in the trigeminal system: from orofacial nociception to neural network modeling." *J Dent Res* 82(10): 764-768.

Woda, A., J. L. Molat and P. Luccarini (2001). "Low doses of N-methyl-D-aspartate antagonists in superficial laminae of medulla oblongata facilitate wind-up of convergent neurones." *Neuroscience* 107(2): 317-327.

Woolf, C. J. (1983). "Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity." *Nature* 306(5944): 686-688.

Woolf, C. J. (1997). "Molecular signals responsible for the reorganization of the synaptic circuitry of the dorsal horn after peripheral nerve injury: the mechanisms of tactile allodynia. In: Barsook D, editor. p. 171–200." *Molecular neurobiology of pain*. Seattle (WA): IASP Press.

Woolf, C. J. and Q. Ma (2007). "Nociceptors--noxious stimulus detectors." *Neuron* 55(3): 353-364.

Woolf, C. J. and M. W. Salter (2000). "Neuronal plasticity: increasing the gain in pain." *Science* 288(5472): 1765-1769.

Woolf, C. J., P. Shortland and R. E. Coggeshall (1992). "Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents." *Nature* 355(6355): 75-78.

Woolf, C. J., P. Shortland, M. Reynolds, J. Ridings, T. Doubell and R. E. Coggeshall (1995). "Reorganization of central terminals of myelinated primary afferents in the rat dorsal horn following peripheral axotomy." *J Comp Neurol* 360(1): 121-134.

Woolf, C. J. and S. W. Thompson (1991). "The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states." *Pain* 44(3): 293-299.

Wu, J., M. Hocevar, B. Bie, J. F. Foss and M. Naguib (2019). "Cannabinoid Type 2 Receptor System Modulates Paclitaxel-Induced Microglial Dysregulation and Central Sensitization in Rats." *J Pain* 20(5): 501-514.

Xie, W., J. A. Strong and J. M. Zhang (2015). "Local knockdown of the NaV1.6 sodium channel reduces pain behaviors, sensory neuron excitability, and sympathetic sprouting in rat models of neuropathic pain." *Neuroscience* 291: 317-330.

Xie, W. Y., Y. He, Y. R. Yang, Y. F. Li, K. Kang, B. M. Xing and Y. Wang (2009). "Disruption of Cdk5-associated phosphorylation of residue threonine-161 of the delta-opioid receptor: impaired receptor function and attenuated morphine antinociceptive tolerance." *J Neurosci* 29(11): 3551-3564.

Xie, Y. F., S. Zhang, C. Y. Chiang, J. W. Hu, J. O. Dostrovsky and B. J. Sessle (2007). "Involvement of glia in central sensitization in trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn)." *Brain Behav Immun* 21(5): 634-641.

Xing, B. M., Y. R. Yang, J. X. Du, H. J. Chen, C. Qi, Z. H. Huang, Y. Zhang and Y. Wang (2012). "Cyclin-dependent kinase 5 controls TRPV1 membrane trafficking and the heat sensitivity of nociceptors through KIF13B." *J Neurosci* 32(42): 14709-14721.

Xiong, Y., H. Zhang and D. Beach (1992). "D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA." *Cell* 71(3): 505-514.

Yamagata, K., M. Sugimura, M. Yoshida, S. Sekine, A. Kawano, A. Oyamaguchi, H. Maegawa and H. Niwa (2016). "Estrogens Exacerbate Nociceptive Pain via Up-Regulation of TRPV1 and ANO1 in Trigeminal Primary Neurons of Female Rats." *Endocrinology* 157(11): 4309-4317.

Yamamoto, M., R. Ueda, K. Takahashi, K. Saigo and T. Uemura (2006). "Control of axonal sprouting and dendrite branching by the Nrg-Ank complex at the neuron-glia interface." *Curr Biol* 16(16): 1678-1683.

Yamazaki, Y., K. Ren, M. Shimada and K. Iwata (2008). "Modulation of paratrigeminal nociceptive neurons following temporomandibular joint inflammation in rats." *Exp Neurol* 214(2): 209-218.

Yang, L., X. Gu, W. Zhang, J. Zhang and Z. Ma (2014). "Cdk5 inhibitor roscovitine alleviates neuropathic pain in the dorsal root ganglia by downregulating N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2A." *Neurol Sci* 35(9): 1365-1371.

Yang, Y. R., Y. He, Y. Zhang, Y. Li, Y. Li, Y. Han, H. Zhu and Y. Wang (2007). "Activation of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) in primary sensory and dorsal horn neurons by peripheral inflammation contributes to heat hyperalgesia." *Pain* 127(1-2): 109-120.

Yu, X. M., B. J. Sessle and J. W. Hu (1993). "Differential effects of cutaneous and deep application of inflammatory irritant on mechanoreceptive field properties of trigeminal brain stem nociceptive neurons." *J Neurophysiol* 70(4): 1704-1707.

Zeilhofer, H. U., H. Mohler and A. Di Lio (2009). "GABAergic analgesia: new insights from mutant mice and subtype-selective agonists." *Trends Pharmacol Sci* 30(8): 397-402.

Zhang, H., L. Chang, H. Zhang, J. Nie, Z. Zhang, X. Yang, A. M. Vuong, Z. Wang, A. Chen and Q. Niu (2017). "Calpain-2/p35-p25/Cdk5 pathway is involved in the neuronal apoptosis induced by polybrominated diphenyl ether-153." *Toxicol Lett* 277: 41-53.

Zhang, H. H., X. Q. Zhang, W. Y. Wang, Q. S. Xue, H. Lu, J. L. Huang, T. Gui and B. W. Yu (2012). "Increased synaptophysin is involved in inflammation-induced heat hyperalgesia mediated by cyclin-dependent kinase 5 in rats." *PLoS One* 7(10): e46666.

Zhang, H. H., X. Q. Zhang, Q. S. Xue, L. Yan, J. L. Huang, S. Zhang, H. J. Shao, H. Lu, W. Y. Wang and B. W. Yu (2014). "The BDNF/TrkB signaling pathway is involved in heat hyperalgesia mediated by Cdk5 in rats." *PLoS One* 9(1): e85536.

Zhang, R., Y. Liu, J. Zhang, Y. Zheng, X. Gu and Z. Ma (2012). "Intrathecal administration of roscovitine attenuates cancer pain and inhibits the expression of NMDA receptor 2B subunit mRNA." *Pharmacol Biochem Behav* 102(1): 139-145.

Zhang, T., N. Zhang, R. Zhang, W. Zhao, Y. Chen, Z. Wang, B. Xu, M. Zhang, X. Shi, Q. Zhang, Y. Guo, J. Xiao, D. Chen and Q. Fang (2018). "Preemptive intrathecal administration of endomorphins relieves inflammatory pain in male mice via inhibition of p38 MAPK signaling and regulation of inflammatory cytokines." *J Neuroinflammation* 15(1): 320.

Zhao, B., L. Gu, K. Liu, M. Zhang and H. Liu (2017). "Maxi-anion channels play a key role in glutamate-induced ATP release from mouse astrocytes in primary culture." *Neuroreport* 28(7): 380-385.

Zhuang, Z. Y., Y. Kawasaki, P. H. Tan, Y. R. Wen, J. Huang and R. R. Ji (2007). "Role of the CX3CR1/p38 MAPK pathway in spinal microglia for the development of neuropathic pain following nerve injury-induced cleavage of fractalkine." *Brain Behav Immun* 21(5): 642-651.

Zimmermann, M. (1983). "Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals." *Pain* 16(2): 109-110.

