



**HAL**  
open science

# Mécanismes segmentaires de l'allodynie mécanique statique trigéminal: rôle des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), de la désinhibition GABAergique et des interneurons PKC $\gamma$

Cédric Peirs

► **To cite this version:**

Cédric Peirs. Mécanismes segmentaires de l'allodynie mécanique statique trigéminal: rôle des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), de la désinhibition GABAergique et des interneurons PKC $\gamma$ . Neurosciences [q-bio.NC]. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2012. Français. NNT : 2012CLF1DD03 . tel-04498186

**HAL Id: tel-04498186**

**<https://theses.hal.science/tel-04498186v1>**

Submitted on 11 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 D'AUVERGNE – UFR D'ODONTOLOGIE

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

Année 2012

THESE n°

## **THESE**

pour le

## **DOCTORAT D'UNIVERSITE**

**Mention : Sciences Biologiques et Médicales**

**Option : Neurosciences**

Présentée et soutenue publiquement le 14 décembre 2012 par

**Cédric PEIRS**

Né le 28/01/1985 à Lille (59)

### **MECANISMES SEGMENTAIRES DE L'ALLODYNIE MECANIQUE STATIQUE TRIGEMINALE : ROLE DES DERIVES REACTIFS DE L'OXYGENE (ROS), DE LA DESINHIBITION GABAERGIQUE ET DES INTERNEURONES PKC $\gamma$**

#### **Membres du Jury**

Mme Marie CONRATH  
Mme Christine COURTEIX  
M. Radhouane DALLEL  
M. Eric LINGUEGLIA  
M. Daniel VOISIN

Chargée de Recherche CNRS – Paris  
Professeur – Université d'Auvergne  
Professeur – Université d'Auvergne  
Chargé de Recherche INSERM – Nice  
Professeur – Université Bordeaux II

Examineur  
Examineur  
Directeur  
Rapporteur  
Rapporteur

UNIVERSITE D'AUVERGNE – UFR D'ODONTOLOGIE

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

Année 2012

THESE n°

## **THESE**

pour le

## **DOCTORAT D'UNIVERSITE**

**Mention : Sciences Biologiques et Médicales**

**Option : Neurosciences**

Présentée et soutenue publiquement le 14 décembre 2012 par

**Cédric PEIRS**

Né le 28/01/1985 à Lille (59)

### **MECANISMES SEGMENTAIRES DE L'ALLODYNIE MECANIQUE STATIQUE TRIGEMINALE : ROLE DES DERIVES REACTIFS DE L'OXYGENE (ROS), DE LA DESINHIBITION GABAERGIQUE ET DES INTERNEURONES PKC $\gamma$**

#### **Membres du Jury**

Mme Marie CONRATH  
Mme Christine COURTEIX  
M. Radhouane DALLEL  
M. Eric LINGUEGLIA  
M. Daniel VOISIN

Chargée de Recherche CNRS – Paris  
Professeur – Université d'Auvergne  
Professeur – Université d'Auvergne  
Chargé de Recherche INSERM – Nice  
Professeur – Université Bordeaux II

Examineur  
Examineur  
Directeur  
Rapporteur  
Rapporteur

## REMERCIEMENTS

*Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse qui ont accepté de traverser la ville ou la France : Messieurs Eric Lingueglia et Daniel Voisin qui ont accepté de juger ce travail et d'en être rapporteurs, Mesdames Marie Conrath et Christine Courteix qui ont accepté de l'examiner et Monsieur Radhouane Dallel pour avoir su encadrer ce travail au cours de ces trois dernières années.*

*Je tiens particulièrement à adresser ma profonde gratitude au Professeur Radhouane Dallel pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour avoir dirigé ce travail. Je garderai un souvenir impérissable de nos discussions scientifiques lors desquelles nous refaisions le monde jusque tard dans la nuit. Merci de m'avoir guidé, de m'avoir supporté, et de m'avoir accordé un temps si précieux.*

*Je voudrais remercier très sincèrement le Professeur Alain Artola pour son aide inestimable, sa gentillesse et pour m'avoir fait partager son savoir scientifique. Ce fut un réel plaisir de travailler à vos côtés et j'espère vivement vous retrouver un jour, peut-être au détour d'un congrès.*

*Merci également à Marc Landry pour m'avoir accueilli dans son équipe Bordelaise pendant quelques mois. Ce fut, comme toujours, un réel plaisir de travailler à tes côtés. Je remercie également André Calas pour sa bonne humeur, son humour et ses compétences techniques évidentes. Merci aux personnels des plateformes de microscopies de Bordeaux et de Clermont-Ferrand qui m'ont apporté une aide précieuse.*

*Merci aux membres du laboratoire pour leur gentillesse, leur humour et leurs précieux conseils. Merci particulièrement à Amélie pour m'avoir soutenu quand le temps me manquait. Merci à Myriam pour ton aide précieuse en électrophysiologie. Merci du fond du cœur à Anne-Marie pour ta joie de vivre et ton travail irréprochable.*

*Un grand merci à Khaled, Céline et Eric qui, en plus d'être des collègues fantastiques, sont devenus mes amis. Merci aux frères Berthom de nous avoir accompagnés lors de nos virées et de nous avoir procurés tant de fous rires.*

*Je voudrais remercier très sincèrement mes parents, Anne et Jean-Marie, pour m'avoir soutenu au cours de ce long cursus universitaire. Huit années de labeur, d'incertitudes, de joies et de pleurs. Sans vous rien n'aurait été possible.*

*Merci très chaleureusement à ma compagne de tous les jours, Mélissa, pour ta patience, ton soutien sans faille et pour avoir vécu cette thèse autant que moi... Courage c'est bientôt fini !*

*Enfin, je dédie cette thèse à tous les étudiants en sciences.*



# LISTE DES ABREVIATIONS

·OH	radical hydroxyl	NPY	neuropeptide y
AMPA	amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole	NS	nociceptif spécifique
ASIC	acid-sensing ion channel	O <sup>2-</sup>	anion superoxide
ATP	adénosine tri-phosphate	ONOO-	peroxynitrite
BDNF	brain derived neurotrophic factor	PAG	substance grise périaqueducale
CAA	cortex cingulaire antérieur	PAP	prostatic acid phosphatase
CAMKII	calcium/calmodulin-dependent kinase ii	PDBu	phorbol 12,13-dibutyrate
CFA	adjuvant complet de freund	PGE2	prostaglandine e2
CGRP	calcitonin-gene related peptide	PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase
CIDN	contrôle inhibiteur diffus induit par une stimulation nociceptive	PKA	protéine kinase a
CL	noyau central latéral	PKC	protéine kinase c
CREB	camp-response-element-binding protein	PKC $\gamma$	isoforme gamma de la protéine kinase c
DAG	diacylglycérol	PLC	phospholipase c
DEG/ENaC	degenerin/epithelial na <sup>+</sup> channel	PPSE	potentiel postsynaptique exciteur
DRG	dorsal root ganglion	PPSI	potentiel postsynaptique inhibiteur
ERK	extracellular signal-regulated protein kinase	PPTB	préprotrakinin b
GABA	$\gamma$ -aminobutyric acid	Pr5	noyau principal du trijumeau
GAD	glutamate décarboxylase	RACK	receptor for activated protein kinase c
GDNF	glia derived neurotrophic factor	RAM	rapidly adapting mechanoreceptor
GFAP	glial fibrillary acidic protein	RO <sup>·</sup>	radicaux alkoxyles
GFP	green fluorescent protein	RO <sup>2·</sup>	radicaux peroxyles
GLAST	cotransporteur glutamate/aspartate	ROS	reactive oxygen species
GLT1	transporteur glial 1 du glutamate	RVM	région rostrale ventromédiale de la medulla
GlyT2	transporteur 2 de la glycine	SAM	slowly adapting mechanoreceptor
GPx	glutathione peroxydase	s.c.	sous-cutanée
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxyde d'hydrogène	SI	cortex somatosensoriel primaire
HO <sup>2·</sup>	hydroperoxyl	SII	cortex somatosensoriel secondaire
IB4	isolectine b4	SOD	superoxide dysmutase
i.c.	intracisternale	Sp5	noyau spinal du trijumeau
i.c.v.	intracérébroventriculaire	Sp5C	sous-noyau caudal
i.t.	intrathécale	Sp5I	sous-noyau interpolaire
Ile	couche ii externe	Sp5O	sous-noyau oral
Iii	couche ii interne	SRD	sous-noyau réticulaire dorsal
IIIe	couche iii externe	Su5	noyau supratrigéminale
IL-1 $\beta$	interleukin 1 $\beta$	TH	tyrosine hydroxylase
INS	cortex insulaire	TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$
IP3	inositol triphosphate	TRP	transient receptor potential
JNK	c-jun n-terminal kinase	TRPA	transient receptor potential ankyrin
KCC2	potassium-chloride exporter	TRPM8	transient receptor potential melastatin-8
KO	knock-out	TRPV1	transient receptor potential vanilloid 1
LTD	dépression à long terme	V1	branche ophtalmique du nerf trijumeau
LTMR	low threshold mechanoreceptor	V2	branche maxillaire du nerf trijumeau
LTP	plasticité synaptique à long terme	V3	branche mandibulaire du nerf trijumeau

MAPK	mitogen activated protein kinase	VGLUT	vesicular glutamate transporteur
MDvc	portion ventro-caudale du noyau dorso-médian	Vmpo	partie postérieure du noyau ventro-médial
mGluR	récepteur métabotrope au glutamate	Vn	nerf trijumeau
Mo5	noyau moteur du trijumeau	VPI	noyau ventro-postéro-inférieur
NFκB	nuclear factor κ b	VPL	noyau ventro-postéro-latéral
NGF	nerve growth factor	VPM	noyau ventro-postéro-médial
NK1	récepteur neurokinine 1	WDR	wide dynamic range
NMDA	n-methyl-d-aspartic acid		
NO	oxide d'azote		
NOS	nitric oxide synthase		

# TABLE DES MATIERES

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>2</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>3</b>
<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>8</b>
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>10</b>
<b>1. LA DOULEUR.....</b>	<b>11</b>
1.1. DEFINITIONS .....	11
1.2. DIFFERENTS TYPES DE DOULEURS.....	13
1.2.1. DOULEURS NOCICEPTIVES .....	14
1.2.2. DOULEURS INFLAMMATOIRES.....	14
1.2.3. DOULEURS NEUROPATHIQUES.....	17
1.2.4. DOULEURS DYSFONCTIONNELLES OU IDIOPATHIQUES .....	18
1.2.5. DOULEURS AIGUES / DOULEURS CHRONIQUES.....	18
1.3. LA DOULEUR TRIGEMINALE .....	19
1.4. ALLODYNIE MECANIQUE TRIGEMINALE.....	24
<b>2. RESEAU NEURONAL IMPLIQUE DANS LA DOULEUR TRIGEMINALE.....</b>	<b>28</b>
2.1. ETAGE PERIPHERIQUE.....	28
2.1.1. INNERVATION PERIPHERIQUE TRIGEMINALE.....	28
2.1.2. CLASSIFICATION DES FIBRES PERIPHERIQUES.....	28
2.2. ETAGE SEGMENTAIRE.....	35
2.2.1. COMPLEXE SENSITIF DU TRIJUMEAU.....	37
2.2.2. LA CORNE DORSALE.....	40
2.3. ETAGE SUPRASEGMENTAIRE .....	54
2.3.1. VOIES ASCENDANTES .....	54
2.3.2. VOIES DESCENDANTES.....	57

<b>3. PHYSIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DOULEUR.....</b>	<b>62</b>
3.1. ACTIVATION DES FIBRES PERIPHERIQUES.....	62
3.1.1. ACTIVATION MECANIQUE .....	62
3.1.2. ACTIVATION THERMIQUE.....	65
3.1.3. ACTIVATION CHIMIQUE .....	67
3.2. HYPERSENSIBILITE .....	69
3.2.1. SENSIBILISATION DU NOCICEPTEUR.....	69
3.2.2. SENSIBILISATION CENTRALE .....	69
3.3. MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES SEGMENTAIRES.....	75
3.3.1. MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES–THEORIE DU « SPROUTING ».....	77
3.3.2. DESINHIBITION SEGMENTAIRE .....	79
3.3.3. ROLE DE LA GLIE.....	91
<b>4. SENSIBILISATION CENTRALE ET PLASTICITE .....</b>	<b>95</b>
4.1. LE GLUTAMATE .....	95
4.2. LA VOIE « EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASE » (ERK).....	97
<b>5. LES PROTEINES KINASES C .....</b>	<b>101</b>
5.1. LOCALISATION ANATOMIQUE.....	101
5.2. LES PROTEINES KINASES C ET LA NOCICEPTION .....	103
5.3. LA PROTEINE KINASE C GAMMA (PKC $\gamma$ ).....	104
5.3.1. PROPRIETES STRUCTURALES ET ANATOMIQUES .....	104
5.3.2. FONCTION DE LA PKC $\gamma$ .....	105
5.3.3. NEUROCHIMIE DES NEURONES PKC $\gamma$ DANS LA CORNE DORSALE .....	106
5.3.4. MECANISMES D’ACTION DE LA PKC $\gamma$ DANS LA CORNE DORSALE .....	108
5.3.5. LA PKC $\gamma$ ET LA DOULEUR.....	111
<b>6. LES QUESTIONS POSEES : .....</b>	<b>118</b>

<b>CHAPITRE 2 : L'HYPERSENSIBILITE MECANIQUE STATIQUE INDUITE PAR L'ACTIVATION DES FIBRES C NECESSITE UNE SURPRODUCTION DE ROS, UNE DESINHIBITION GABAERGIQUE ET UNE ACTIVATION DES INTERNEURONES PKC<math>\gamma</math>.....</b>	<b>123</b>
---	------------

<b>CHAPITRE 3 : LES INTERNEURONES DE LA CORNE DORSALE MEDULLAIRE EXPRIMANT LA PKC<math>\gamma</math> : DISTRIBUTION ET CONNECTIVITE DE CES NEURONES. LOCALISATION SYNAPTIQUE DE LA PKC<math>\gamma</math>.....</b>	<b>176</b>
--	------------

<b>CHAPITRE 4 : DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>224</b>
--	------------

<b>1. ALLODYNIE MECANIQUE : UN RESEAU NEURONAL SPECIFIQUE .....</b>	<b>225</b>
---	------------

<b>2. ALLODYNIE MECANIQUE : INTERNEURONES PKC<math>\gamma</math> .....</b>	<b>227</b>
--	------------

<b>3. ALLODYNIE MECANIQUE : STATIQUE / DYNAMIQUE .....</b>	<b>237</b>
--	------------

<b>4. CAUSE DE L'ALLODYNIE MECANIQUE STATIQUE .....</b>	<b>239</b>
---	------------

4.1. POTENTIALISATION DES SYNAPSES EXCITATRICES ? .....	239
---	-----

4.2. DESINHIBITION SEGMENTAIRE .....	240
--------------------------------------	-----

4.3. ORIGINE DE LA DESINHIBITION.....	242
---------------------------------------	-----

4.4. CAUSES DE LA DESINHIBITION.....	243
--------------------------------------	-----

<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>251</b>
---	------------

<b>CHAPITRE 5 : ANNEXES.....</b>	<b>252</b>
----------------------------------	------------

<b>CHAPITRE 6 : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>274</b>
--	------------

<b>RESUME.....</b>	<b>316</b>
--------------------	------------

# LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 : Les différents types de douleur.....</b>	<b>16</b>
<b>Figure 2 : Tissus innervés par le système sensoriel trigéminal.....</b>	<b>20</b>
<b>Figure 3 : Territoires cutanés innervés par le nerf trijumeau.....</b>	<b>29</b>
<b>Figure 4 : Afférences primaires cutanées.....</b>	<b>32</b>
<b>Figure 5 : Organisation des fibres cutanées non nociceptives.....</b>	<b>36</b>
<b>Figure 6 : Organisation du complexe sensitif du trijumeau et ses connexions.....</b>	<b>39</b>
<b>Figure 7 : Organisation laminaire de la corne dorsale et afférences primaires.....</b>	<b>41</b>
<b>Figure 8 : Glomérules retrouvés dans la corne dorsale spinale.....</b>	<b>43</b>
<b>Figure 9 : Connectivités et localisations morphométriques des neurones de la substance gélatineuse.....</b>	<b>47</b>
<b>Figure 10 : Caractéristiques électrophysiologiques des neurones inhibiteurs et excitateurs de la couche II.....</b>	<b>49</b>
<b>Figure 11 : Théorie du « gate control ».....</b>	<b>53</b>
<b>Figure 12 : Voies ascendantes et descendantes de la nociception.....</b>	<b>61</b>
<b>Figure 13 : Le récepteur TRPV1.....</b>	<b>66</b>
<b>Figure 14 : Médiateurs inflammatoires.....</b>	<b>68</b>
<b>Figure 15 : Sensibilisation centrale.....</b>	<b>71</b>
<b>Figure 16 : Rôle de la sensibilisation centrale dans l'hyperalgésie secondaire.....</b>	<b>73</b>
<b>Figure 17 : Mécanismes de la sensibilisation centrale.....</b>	<b>76</b>
<b>Figure 18 : Hypothèse du « sprouting ».....</b>	<b>78</b>
<b>Figure 19 : Localisation des interneurones inhibiteurs GABAergiques et glycinergiques dans la corne dorsale.....</b>	<b>81</b>
<b>Figure 20 : Transmission synaptique sur les neurones de second ordre.....</b>	<b>83</b>

<b>Figure 21 : Perturbation de l'homéostasie du chlore en condition pathologique.....</b>	<b>86</b>
<b>Figure 22 : Sources de ROS et leurs effets cellulaires.....</b>	<b>88</b>
<b>Figure 23 : Désinhibition induite par les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS).....</b>	<b>90</b>
<b>Figure 24 : Le rôle de la glie dans la douleur.....</b>	<b>94</b>
<b>Figure 25 : Les voies de signalisation de ERK dans la corne dorsale par différents récepteurs postsynaptiques et protéine kinases.....</b>	<b>99</b>
<b>Figure 26 : Représentation schématique des isoformes de protéines kinases C.....</b>	<b>102</b>
<b>Figure 27 : Expression de p-ERK dans les neurones PKC<math>\gamma</math>.....</b>	<b>228</b>
<b>Figure 28 : Schéma hypothétique de l'environnement synaptique des interneurons PKC<math>\gamma</math>.....</b>	<b>230</b>
<b>Figure 29 : Morphologies des neurones PKC<math>\gamma</math> de la couche III.....</b>	<b>232</b>
<b>Figure 30 : Propriétés électrophysiologiques des interneurons PKC<math>\gamma</math>.....</b>	<b>234</b>
<b>Figure 31 : Schéma hypothétique du rôle de la PKC<math>\gamma</math> au niveau des épines dendritiques postsynaptiques.....</b>	<b>236</b>
<b>Figure 32 : Schéma hypothétique des mécanismes segmentaires responsables de l'allodynie mécanique.....</b>	<b>247</b>
<b>Figure 33 : Effet de l'application de capsaïcine 1 <math>\mu</math>M sur les courants postsynaptiques inhibiteurs (IPSCs) dans les neurones PKC<math>\gamma</math> de la couche III.....</b>	<b>250</b>

# CHAPITRE 1 :

## INTRODUCTION GENERALE

*« Savoir que l'on sait ce que l'on sait, et savoir que l'on ne sait pas ce que l'on ne sait pas : voilà la véritable intelligence. »*

*Confucius*



## **1. LA DOULEUR**

L'origine de la douleur ainsi que son caractère physiologique ou pathologique fascine scientifiques et philosophes depuis des centaines d'années. Charles Darwin décrit la douleur comme une « émotion homéostatique », essentielle à la survie des espèces (Darwin, 1872). Le philosophe du 17<sup>ème</sup> siècle René Descartes, quant à lui, la définit comme résultante de l'activation d'un canal défini, de la peau vers le cerveau, concept qui fut à l'origine de deux théories du 19<sup>ème</sup> siècle expliquant la douleur sur la base d'une forte intensité de stimulation de n'importe quelle fibre ou par l'intermédiaire de nocicepteurs spécifiques (Todd and Kucharski, 2004). Depuis, de fantastiques efforts ont été faits afin de comprendre les mécanismes mis en jeu lors d'une sensation de douleur aboutissant parfois à des avancées conceptuelles majeures, parfois à de frustrantes déceptions.

### **1.1. DEFINITIONS**

La douleur constitue un signal d'alarme visant à protéger l'organisme contre ou à la suite d'un stimulus potentiellement dommageable. Le sujet qui la ressent focalise ainsi son attention sur cette perturbation homéostatique, oblitérant toute autre activité devenant ainsi secondaire. Ainsi, bien qu'apparemment paradoxal, la douleur est un mécanisme physiologique d'une importance majeur. Les patients atteints de la canalopathie Na<sub>v</sub>1.7., une des formes les plus sévères d'insensibilité congénitale à la douleur, illustrent parfaitement cette notion de nécessité de la sensibilité douloureuse. L'absence de ce canal sodique voltage-dépendant indispensable à la transmission nociceptive provoque chez ces sujets une forme diffuse et radicale d'insensibilité à la douleur. Les symptômes associés sont alarmants et regroupent des automutilations sévères, des troubles affectifs et

émotionnels multiples ainsi que des défauts de la perception corporelle (Danziger and Willer, 2009).

La notion même de douleur est particulièrement difficile à définir puisque faisant intervenir la perception et le vécu du sujet qui la ressent. Ainsi, une même sensation pourra être interprétée comme une douleur pour certains individus, et non douloureuse pour d'autres. En 1979, The International Association for the Study of Pain (IASP) définit la douleur comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à un dommage tissulaire présent ou potentiel, ou décrite en termes d'un tel dommage ». Cette prudente définition illustre bien le caractère complexe, pluridimensionnel et plurifactoriel de la notion de douleur. Le terme de douleur se doit donc d'être abordé autant par son aspect somatosensoriel que son aspect cognitivo-émotionnel. Ainsi, il me semble nécessaire de remettre dans leurs contextes quelques définitions fondamentales relatives à la douleur (Loeser and Melzack, 1999).

- La **nociception** est, selon l'IASP, « le mécanisme neuronal codant une stimulation nociceptive ». Les conséquences de la nociception peuvent être autonomiques (comme l'observation d'une élévation de la pression artérielle) ou comportementales (comme l'induction d'un réflexe moteur de retrait). La nociception ne conduit pas nécessairement à une douleur mais met en jeu ses mécanismes d'action. Ainsi, on parlera de « messages nociceptifs » lors de la mise en œuvre de cette voie, en faisant abstraction des composantes cognitive ou émotionnelle qui y sont associées.

- La **perception** est, par définition, « une représentation consciente d'une sensation ». La perception d'une douleur met en jeu la composante cognitive du sujet qui la perçoit. Il est important de bien saisir la nuance de cette définition. Il sera ainsi possible d'interpréter une situation comme nociceptive sans pour autant la considérer comme désagréable.

- La **sensation** est, par définition, « un état psychologique découlant des impressions reçues et à prédominance affective et émotionnelle ». La sensation de douleur est donc subjective, et est généralement associée à une souffrance, une sensation désagréable et alarmante. Ici encore, il est important d'intégrer le fait qu'une telle émotion peut être déclenchée en l'absence de stimulation nociceptive.

- La **réponse** est, par définition, « une réaction à un stimulus ». La réponse comportementale à la douleur résulte d'une sensation et/ou d'une perception de la douleur. Les manifestations sont variées et incluent des manifestations verbales (« aïe »), des grimaces, des frottements cutanés, des crampes abdominales, etc... mais aussi des comportements sociaux comme le recours à la médication ou le refus de réaliser des tâches quotidiennes. Cette dernière définition, bien que la plus abstraite, est sans conteste la plus importante. En effet, il n'existe pas de « douleur inventée ». Toute personne souffrant de douleur se doit d'être prise en considération avec respect et compassion. Qu'elle soit d'origine lésionnelle ou non, apparente ou non, physiopathologique ou « psychologique », la douleur a nécessairement une origine et il existe donc toujours une méthode pour la soulager. Il convient par conséquent d'adapter un traitement à une situation symptomatologique propre.

## 1.2. DIFFERENTS TYPES DE DOULEURS

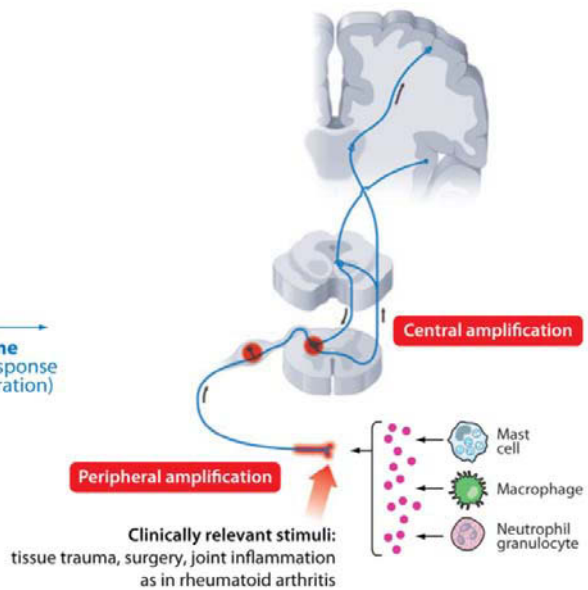
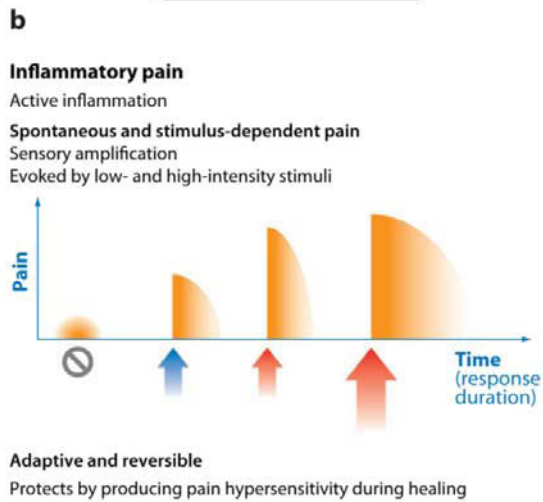
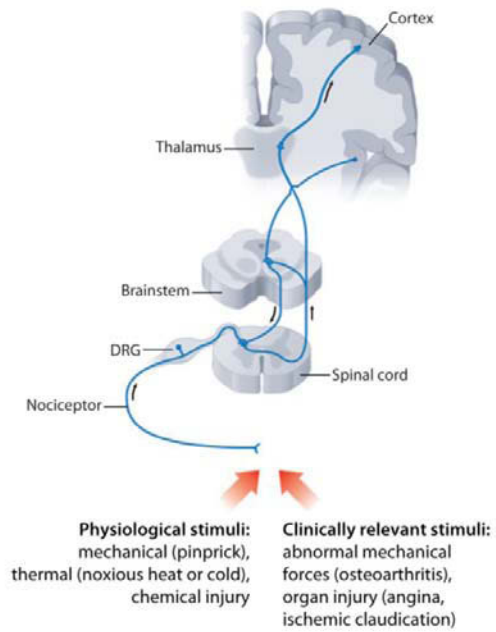
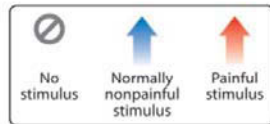
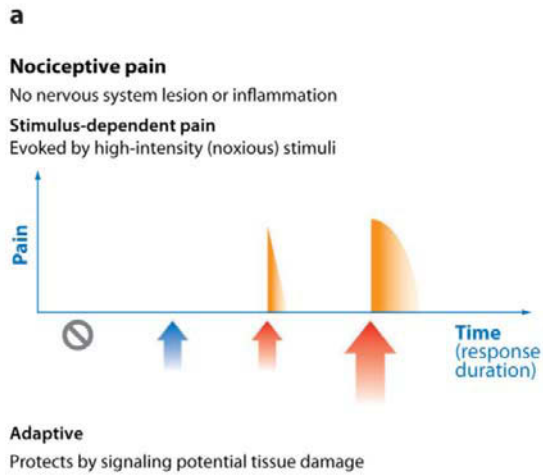
La classification des différents types de douleur peut s'effectuer d'un point de vue temporel (douleurs aiguës, douleurs chroniques) ou étiologique. En fonction de son origine, la douleur peut être classée en quatre grandes catégories : les douleurs nociceptives, inflammatoires, neuropathiques et une dernière classe de douleurs ni inflammatoires ni associées à une lésion nerveuse, qualifiées d'idiopathiques ou « dysfonctionnelles » (Costigan et al., 2009; Dallel, 2010).

### 1.2.1. DOULEURS NOCICEPTIVES

La douleur nociceptive est déclenchée par une stimulation des fibres nociceptives (Woolf and Ma, 2007). Elle est principalement médiée par des nocicepteurs spécifiques répondant à des stimulations électriques, mécaniques, thermiques et chimiques de haute intensité. Ce type de douleur ne persiste que si le stimulus nociceptif perdure. (Figure 1a).

### 1.2.2. DOULEURS INFLAMMATOIRES

Les douleurs inflammatoires sont liées à une lésion tissulaire et aux médiateurs libérés au cours des processus inflammatoires (par exemples douleurs postopératoire, post-traumatique ou viscérale). Ce type de douleur diffère de la douleur nociceptive par sa réponse adaptative et non plus seulement informative. Afin de protéger le territoire lésé, les fibres périphériques vont répondre de manières différentes aux stimuli périphériques. Une stimulation normalement non-nociceptive sera capable d'entraîner une sensation de douleur, phénomène appelé « allodynie ». Une stimulation nociceptive, quant à elle, sera capable d'induire une sensation de douleur exagérée pouvant perdurer parfois bien au-delà de la durée du stimulus (Juhl et al., 2008), phénomène appelé « hyperalgésie ». Ces symptômes peuvent être observés non seulement au niveau de la lésion (allodynie / hyperalgésie primaire) mais aussi dans les zones limitrophes (allodynie / hyperalgésie secondaire) et peuvent résulter d'une sensibilisation périphérique et/ou centrale (Woolf and Salter, 2000; Huang et al., 2006; Hucho and Levine, 2007). Le traitement habituel de ces douleurs repose sur l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens et d'antalgiques non opioïdes (Bouhassira and Attal, 2007a). Généralement, la douleur inflammatoire disparaît après réparation du territoire lésé. (Figure 1b).



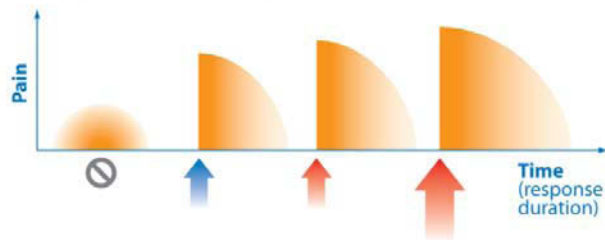
c

**Neuropathic pain**

Nervous system lesion or disease  
Marked neuroimmune response

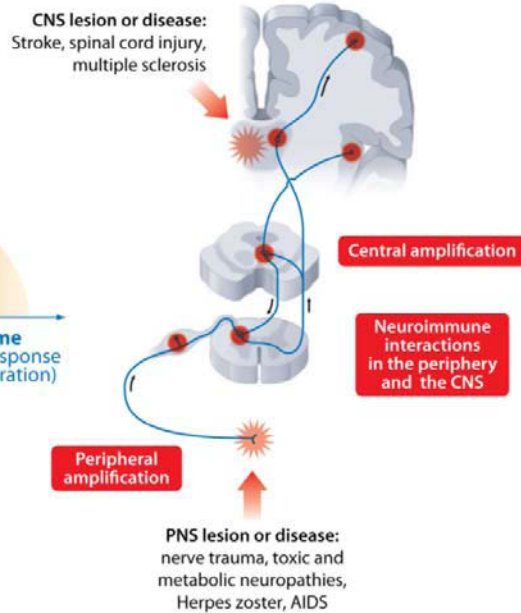
**Spontaneous and stimulus-dependent pain**

Sensory amplification  
Evoked by low- and high-intensity stimuli



**Maladaptive and commonly persistent**

Abnormal amplification maintained independent of the lesion or disease



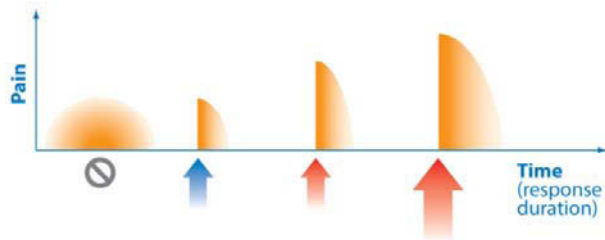
d

**Dysfunctional pain**

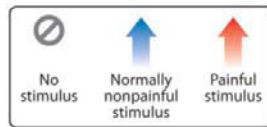
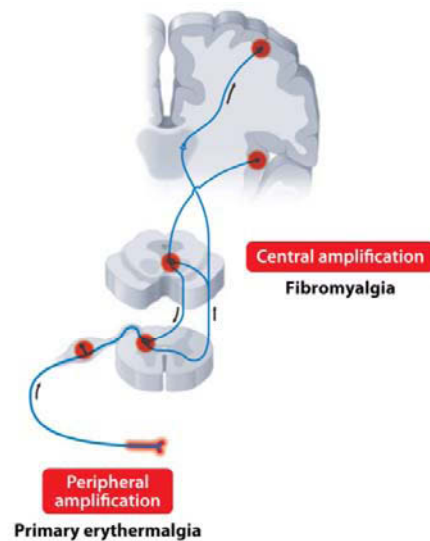
No known structural nervous system lesion or active peripheral inflammation

**Spontaneous and stimulus-dependent pain**

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



**Maladaptive and potentially persistent**



**Figure 1 : Les différents types de douleurs.** a. La douleur nociceptive apparaît pour des stimuli nociceptifs de haute intensité. Elle peut être induite par des stimuli physiologiques ou pathologiques, mécaniques, thermiques ou chimiques. b. La douleur inflammatoire résulte de l'activation excessive des nocicepteurs périphériques par les médiateurs libérés lors des processus inflammatoires. Tout comme les douleurs dysfonctionnelles et neuropathiques, la douleur inflammatoire peut entraîner des phénomènes d'hyperalgésie ou d'allodynie. c. La douleur neuropathique fait suite à une lésion nerveuse centrale ou périphérique. Elle est la conséquence de processus maladaptatifs pouvant conduire à des douleurs chroniques d. La douleur dysfonctionnelle ne fait suite ni à une lésion tissulaire ou nerveuse, ni à une réponse inflammatoire. Elle fait intervenir des mécanismes d'hypersensibilité périphérique et de sensibilisation centrale. (adapté d'après Costigan et al., 2009).

### 1.2.3. DOULEURS NEUROPATHIQUES

Les douleurs neuropathiques, autrefois appelées « douleurs de désafférentations », sont secondaires à une lésion du système nerveux périphérique (provoqué par un trauma, un zona ou une chirurgie) ou central (accident vasculaire, lésion bulbaire, sclérose en plaques). L'incidence des douleurs neuropathiques dans la population générale est de 8,2%/an (Dieleman et al., 2008), et la prévalence de douleurs neuropathiques en France est de 6,9% (Bouhassira et al., 2008). Des douleurs neuropathiques postopératoires aiguës apparaissent après 10 à 50% des actes chirurgicaux, et peuvent devenir chroniques dans 2 à 10% des cas (Kehlet et al., 2006). La majorité des patients atteints de lésions spinales sévères (tétraplégie, hémiparésie) souffrent de douleurs chroniques (Siddall et al., 2003). Bien qu'une origine génétique ait été suggérée, la cause de la chronicisation des douleurs neuropathiques reste encore inconnue (LaCroix-Fralish and Mogil, 2009). Les douleurs neuropathiques se manifestent par des douleurs spontanées et des réponses aberrantes aux stimuli périphériques (allodynie, hyperalgésie) (Baron, 2006). Ces douleurs sont parmi les plus difficiles à traiter. En effet, bien que d'extraordinaires efforts ont pu être faits au cours des dernières décennies dans la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de l'apparition ou le maintien des douleurs neuropathiques, les traitements incluant majoritairement antidépresseurs, antiépileptiques et opioïdes sont toujours insatisfaisants. Ces drogues n'ont que peu, voire pas d'effets thérapeutiques chez l'homme et sont souvent associées à des phénomènes de tolérance et à de nombreux effets indésirables incluant nausée, sédation, constipation et dépendance (Baron et al., 2010 ; Finnerup et al., 2010) (Figure 1c). De manière intéressante, la capsaïcine (composé actif du piment responsable des sensations de brûlures) appliquée en périphérie soit de manière successive sous forme de crèmes à faible dose soit en application unique sous forme de

patch à forte dose (Derry et al., 2009b; Anand and Bley, 2011), permet de réduire certaines douleurs neuropathiques par désensibilisation de son récepteur « transient receptor potential vanilloïde-1 » (TRPV1) (Touska et al., 2011).

#### 1.2.4. DOULEURS DYSFUNCTIONNELLES OU IDIOPATHIQUES

La dernière catégorie de douleurs dites « dysfonctionnelles » ou « idiopathiques » ne résulte ni d'une inflammation, ni d'une lésion nerveuse évidente. L'origine de ces pathologies est le plus souvent inconnue. De ce fait, ces douleurs ont longtemps été considérées comme des douleurs « psychologiques », oblitérant l'existence bien réelle d'une origine tissulaire. Ces douleurs sont considérées comme des douleurs maladaptatives dans le sens où elles ne supportent pas, *a priori*, une réparation tissulaire ou un retour à un état homéostatique. Cette catégorie inclut un ensemble de syndromes douloureux chroniques comme la fibromyalgie, le syndrome du colon irritable, les céphalées de tension ou les algies orofaciales idiopathiques. De même que pour les douleurs neuropathiques, les antalgiques usuels sont rarement efficaces et les traitements préconisés regroupent antidépresseurs, antiépileptiques et opioïdes (Bouhassira and Attal, 2007a) (Figure 1d).

#### 1.2.5. DOULEURS AIGUES / DOULEURS CHRONIQUES

Il est important de distinguer la douleur aiguë, transitoire, de la douleur chronique. La douleur aiguë est un mécanisme physiologique visant à alerter l'organisme d'une perturbation homéostatique importante. Elle permet de prévenir une blessure en créant à la fois un réflexe de retrait du stimulus et une sensation si désagréable qu'elle va entraîner une stratégie comportementale d'évitement à un futur stimulus identique. Ce type de douleur est omniprésente dans la vie de tous les jours et ne nécessite pas particulièrement

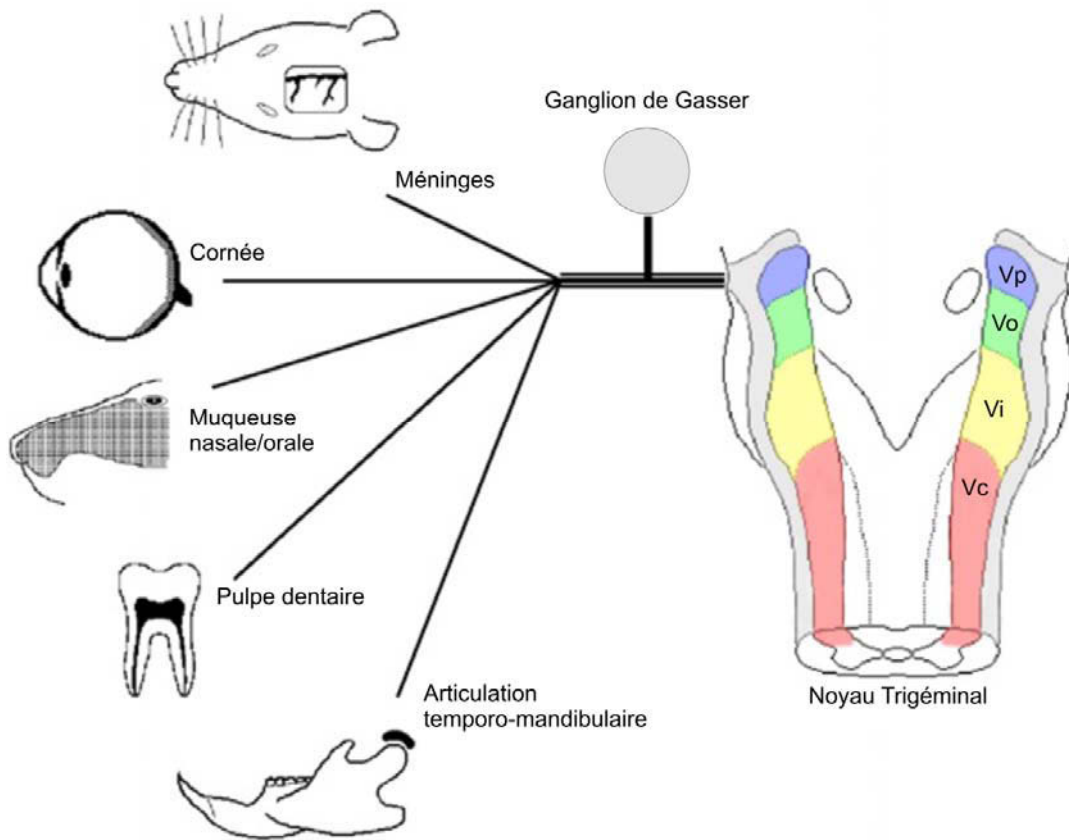


de recours à la médication, hormis pour atténuer l'intensité de la douleur ou accélérer le processus de guérison. A l'inverse, les douleurs chroniques ne servent pas, *a priori*, l'intérêt biologique et entraînent au contraire détresse et souffrance. Par définition, la douleur devient chronique au-delà de trois mois d'évolutions (Loeser and Melzack, 1999). Les douleurs chroniques sont généralement associées à des modifications centrales, puisque pouvant persister une fois la cause éliminée et la cicatrisation achevée. La compréhension des mécanismes d'induction et de maintien des douleurs chroniques représente aujourd'hui un des axes prioritaires de la Recherche médicale.

### 1.3. LA DOULEUR TRIGEMINALE

Le traitement des douleurs trigéminales constitue un enjeu médical et socio-économique particulièrement important. En effet, on estime qu'aux Etats-Unis, plus de 39 millions, soit 22% de la population âgée de plus de 18 ans, ressentent régulièrement des douleurs dans la région orofaciale. Des observations similaires ont pu être rapportées en Europe (Hargreaves, 2011). Bien que l'incidence des douleurs trigéminales chroniques au sein de la population générale soit plus faible (38,7/100000/an ; Koopman et al., 2009) que celles liées aux autres parties du corps, elles sont souvent très invalidantes et diminuent considérablement la qualité de vie des patients (alimentation, sommeil, phonation, audition, vision).

Les tissus organiques mis en jeu dans les douleurs trigéminales regroupent les méninges, la cornée, la pulpe dentaire, les muqueuses orale et nasale et les articulations temporo-mandibulaires (Figure 2). Les douleurs dentaires sont probablement les plus communes des douleurs aiguës. De nombreuses pathologies chroniques concernent l'aire innervée par le trijumeau (la névralgie essentielle du trijumeau, les névralgies post-zostériennes, les névralgies post-traumatiques, l'algie faciale atypique, l'algie vasculaire



**Figure 2 : Tissus innervés par le système sensoriel trigéminal.** Vp, Noyau principal. Vo, Sous-noyau oral. Vi, Sous-noyau interpolaire. Vc, Sous-noyau caudal. (*adapté d'après Bereiter et al., 2008*).

de la face, les migraines...). Ces douleurs sont caractéristiques de cette région et sont souvent décrites comme extrêmement sévères par leur intensité, comme la névralgie du trijumeau qualifiée de « fulgurante » ou l'algie vasculaire de la face qualifiée de « douleur suicidaire ». Ces douleurs sont actuellement les plus difficiles à traiter (Benoliel and Eliav, 2008). A l'instar des douleurs des autres parties du corps, les douleurs chroniques trigéminales ne répondent pas ou peu aux traitements antalgiques usuels. Leur traitement repose sur l'utilisation d'antidépresseurs et d'antiépileptiques, dont l'efficacité demeure modeste et variable (Dallel, 2010 ; Finnerup et al., 2010). Les raisons de cet échec relèvent d'une part de la complexité de leurs mécanismes, avec pour conséquence un manque de cibles thérapeutiques probantes et d'autre part de l'absence de stratégie diagnostique adéquate permettant d'identifier les mécanismes impliqués chez un patient donné (Dallel and Voisin, 2001). Il apparaît donc indispensable de mettre à jour les mécanismes moléculaires et cellulaires qui participent à la genèse des symptômes observés dans les douleurs chroniques trigéminales.

Les raisons d'étudier la physiologie de la nociception trigéminal sont donc spécifiques, mais le système trigéminal représente un modèle intéressant pour l'étude de la douleur en général. En effet, la densité des récepteurs périphériques est plus grande au niveau des lèvres et de la langue que partout ailleurs dans le corps. De même, l'étendue de la représentation thalamique et corticale et les implications comportementales et physiologiques de la sphère orofaciale sont plus importantes que celle des autres régions corporelles (Amaral, 2000; Sessle, 2000). Enfin, certaines particularités anatomiques et fonctionnelles distinguent les systèmes trigéminaux et spinaux. Par exemple, certaines structures comme la pulpe dentaire, la cornée ou les méninges sont essentiellement innervées par des fibres nociceptives, la douleur étant généralement considérée comme la

seule sensation provoquée par la stimulation de ces tissus. Ainsi, le nombre de publications relatives à la douleur orofaciale a considérablement augmenté au cours des dernières dizaines d'années, regroupant entre 2004 et 2005, 975 articles publiés dans 275 journaux et représentant 54 pays, démontrant un réel investissement collectif dans la compréhension des mécanismes sous-tendant ce type de douleur (Hargreaves, 2011).

De nombreuses études cliniques se sont intéressées à la douleur aiguë d'origine inflammatoire dans le système trigéminal. Le modèle de douleur par impaction dentaire (lors de la présence d'une dent n'ayant pas émergée, comme une dent de sagesse) est utilisé comme méthode clinique standard afin d'évaluer l'effet de nombreux analgésiques (Derry et al., 2009a ; Cooper and Desjardins, 2010 ; Mehlich et al., 2010). D'autres études ont utilisé ce modèle de douleur inflammatoire aiguë afin d'évaluer l'effet d'anesthésiques locaux (Gordon et al., 1997 ; Gordon et al., 2002a), l'activation de mécanismes opioïdes endogènes (Levine et al., 1978a ; Levine et al., 1978b ; Gracely et al., 1983 ; Hargreaves et al., 1986), la libération locale de médiateurs inflammatoires (Hargreaves and Costello, 1990 ; Swift et al., 1993 ; Gordon et al., 2002b ; Dionne et al., 2003) et l'association entre polymorphisme génétique et douleur postopératoire (Kim et al., 2006 ; Lee et al., 2006 ; Kim et al., 2009). Ce modèle clinique possède de nombreux avantages comme la participation de sujets relativement sains ne suivant aucun traitement médicamenteux, l'utilisation de procédures chirurgicales standardisées et un relativement grand nombre de volontaires potentiels.

D'autres études cliniques sur pulpites (inflammation de la pulpe dentaire) irréversibles (domages supérieurs au potentiel réparateur de la pulpe) ont montré que les conditions d'inflammation et de nécrose d'origine bactérienne étaient corrélées à une modification d'expression de canaux ioniques (Alvarado et al., 2007 ; Warren et al., 2008 ; Henry et al.,

2009 ; Beneng et al., 2010 ; Luo et al., 2010 ; Wu et al., 2010), de récepteurs (Li et al., 2010) et de neuropeptides (Byers and Narhi, 1999 ; Bowles et al., 2003). Il est intéressant de remarquer que dans des conditions cliniques de pulpites, malgré un territoire extrêmement restreint (<200µl), des douleurs intenses sont reportées (Grushka and Sessle, 1984) ainsi que des douleurs référées (Falace et al., 1996). De plus il semblerait que l'inflammation d'une seule dent soit suffisante pour induire une sensibilisation centrale (Sigurdsson and Maixner, 1994 ; Falace et al., 1996 ; Khan et al., 2007 ; Owatz et al., 2007). Le modèle de pulpite apparaît donc comme un intéressant outil de recherche non seulement par sa haute prévalence (Lipton et al., 1993) mais aussi dans le cadre de la recherche fondamentale.

De nombreuses études cliniques se sont intéressées aux douleurs neuropathiques trigéminales. Plusieurs travaux ont étudiés les effets d'une chirurgie ou d'un traitement médicamenteux sur ce type de douleur (Zakrzewska et al., 1999 ; Cheshire, Jr., 2002 ; Oh et al., 2008 ; Park et al., 2008 ; Miller et al., 2009 ; Tashiro et al., 2009 ; Baron et al., 2010). Plusieurs facteurs étiologiques semblent contribuer au développement des douleurs neuropathiques trigéminales, comme la compression ou la lésion du nerf trigéminal, l'implication de facteurs inflammatoires ou l'infection par le virus de l'herpès (Vos et al., 1994 ; Benoliel et al., 2005 ; Oh et al., 2008 ; Ahn et al., 2009 ; Chichorro et al., 2009 ; Okada-Ogawa et al., 2009 ; Baron et al., 2010). Comme énoncé précédemment, toutes les lésions nerveuses, et particulièrement celles impliquant le trijumeau, ne conduisent pas à des douleurs neuropathiques, que ce soit suite à un traitement endodontique (Campbell et al., 1990 ; Lobb et al., 1996 ; Polycarpou et al., 2005), un traumatisme facial (Benoliel et al., 2005), une chirurgie orthognatique (maxillo-faciale) (Cheung and Lo, 2002), une extraction dentaire (Carmichael and McGowan, 1992 ; Robinson and Smith, 1996 ;

Valmaseda-Castellon et al., 2000 ; Berge, 2002) ou la pause d'un implant dentaire (Gregg, 2000). Cette apparente résistance à la neuropathie reste aujourd'hui énigmatique et représente une piste très intéressante en recherche clinique et préclinique. Quelques facteurs de risques semblent cependant exister, au moins dans la névralgie trigéminal, comme la sclérose (Cruccu et al., 2009 ; Putzki et al., 2009) et l'hypertension (Katusic et al., 1990).

#### 1.4. ALLODYNIE MECANIQUE TRIGEMINALE

L'allodynie mécanique est un symptôme fréquemment observé lors de pathologies chroniques trigéminales comme la névralgie essentielle du trijumeau, les névralgies post-zostériennes, les névralgies post-traumatiques, l'algie faciale idiopathique persistante (ou algie faciale atypique), l'algie vasculaire de la face et les migraines (Bouhassira and Attal, 2007b ; Pato and Sturzenegger, 2008 ; Woda and Pionchon, 2009). Quelques exemples seront présentés dans ce chapitre afin d'illustrer l'allodynie mécanique trigéminal.

La névralgie du trijumeau est une pathologie touchant trois fois plus la femme que l'homme et principalement dans la deuxième moitié de la vie (Fontaine and Lyon-Caen, 1995). Son incidence est de 1,5/100000 (Love and Coakham, 2001). Elle se manifeste sous forme de périodes de crises suivies de périodes réfractaires qui peuvent s'étaler sur quelques jours ou quelques semaines et parfois plusieurs mois (Zakrzewska and Lopez, 2006). On retrouve généralement un terrain dépressif ou anxieux qui va souvent en s'amplifiant compte tenu du caractère répétitif et intense de la douleur. En effet, la névralgie du trijumeau se caractérise par une douleur fulgurante sous forme de décharges électriques, d'éclairs (Navez et al., 2005). Celle-ci est unilatérale, impliquant les deuxième et troisième branches du nerf trijumeau (exceptionnellement le territoire ophtalmique (<5%)) et est essentiellement diurne (Navez et al., 2005). Parfois spontanée, la douleur est

le plus souvent déclenchée par la stimulation mécanique légère d'une zone gâchette (« trigger zone ») située dans la région du nez, de la lèvre, de la gencive supérieure ou de la commissure centrale de la lèvre inférieure (Navez et al., 2005). Les facteurs déclenchant peuvent être le froid, le vent ou un simple contact. Ainsi, des tâches quotidiennes comme la parole, le rire ou la mastication imposent aux patients des conduites d'évitement et une attitude figée (Navez et al., 2005). Une contraction musculaire de la face peut coexister avec la douleur, réflexe moteur appelé « tic douloureux ». Sa physiopathologie est liée à un conflit vasculo-nerveux comprimant la racine nerveuse dans l'angle ponto-cérébelleux. Pour certains auteurs, la compression serait responsable de la formation de plaques de démyélinisation permettant la genèse de potentiels d'action ectopiques extrasynaptiques entre fibres myélinisées et amyéliniques (Love and Coakham, 2001). Pour d'autres auteurs rapportant l'absence de compression vasculo-nerveuse visible, les foyers d'activation ectopiques seraient localisés au sein du ganglion de Gasser (Zakrzewska and Lopez, 2006). Cependant, d'autres mécanismes peuvent être à l'origine des symptômes observés lors de la névralgie du trijumeau dans la mesure où compression vasculaire et démyélinisation ne sont pas sélectives des seuls patients qui souffrent de cette pathologie (Hardy and Rhoton, Jr., 1978). Le traitement de la névralgie du trijumeau est d'abord médicamenteux, principalement à base d'antiépileptiques comme la Carmabazépine. Les antiépileptiques et le baclofène, agoniste des récepteurs GABA<sub>B</sub>, agissent sur l'activité des foyers d'activation ectopiques ou sur le processus de sensibilisation centrale qui en résulte. Le traitement devient chirurgical si les médicaments sont inefficaces ou mal tolérés. La chirurgie de décompression vasculaire vise à lever le conflit vasculo-nerveux en interposant du téflon entre la boucle vasculaire et la racine trigéminal (Navez et al., 2005). La thermocoagulation du ganglion de Gasser et les autres traitements de lésions partielles des fibres afférentes permettent également d'induire une analgésie.

Une allodynie mécanique peut également être observée lors de neuropathies post-traumatiques (Hargreaves, 2011). Les traumatismes maxillo-faciaux et certaines chirurgies cranio-faciales peuvent entraîner des douleurs neuropathiques qui peuvent parfois survenir plusieurs années après la chirurgie (Hargreaves, 2011). Les fractures complexes du massif maxillo-facial (Lefort I, II et III) ainsi que de la mandibule peuvent évoluer vers une douleur neuropathique chronique. Cette évolution est présente dans 3,3% des cas de fracture complexe zygomatique (Benoliel et al., 2005). Les douleurs neuropathiques post-traumatiques sont caractérisées par des douleurs spontanées continues ou paroxystiques ainsi que des douleurs évoquées (allodynie, hyperalgésie) (Bouhassira and Attal, 2007b). Lors d'une neuropathie post-traumatique trigéminal, les causes de la pathologie sont claires et proviennent de l'écrasement d'une branche trigéminal lors d'une fracture ou d'une chirurgie faciale ou dentaire (Benoliel et al., 2005 ; Polycarpou et al., 2005).

La névralgie post-zostérienne est une complication de l'infection par le virus de la varicelle et peut intervenir des dizaines d'années après l'infection primaire (Steiner, 1996). Son incidence augmente avec l'âge pour atteindre 8/1000/an dès 70 ans (Pato and Sturzenegger, 2008). Les patients âgés, ou ceux dont le système immunitaire est affaibli, courent un risque élevé de névralgie postzostérienne. Le plus souvent, c'est la première branche du trijumeau qui est atteinte (zona ophtalmique). Dans la névralgie postzostérienne, les douleurs neuropathiques sont les symptômes prédominants, caractérisés par des douleurs à typologie de brûlures persistantes, d'une cruelle intensité, et des douleurs évoquées (allodynie et hyperalgésie) (Bouhassira and Attal, 2007b). Le traitement analgésique des névralgies post-zostériennes se base sur l'utilisation d'antidépresseurs, antiépileptiques et opioïdes (Pato and Sturzenegger, 2008). La vaccination de rappel est le moyen de prévention le plus prometteur chez les personnes



âgées : lorsqu'elles sont vaccinées, leur risque de névralgies post-zostériennes diminue de 66% (Oxman et al., 2005).

## 2. RESEAU NEURONAL IMPLIQUE DANS LA DOULEUR TRIGEMINALE

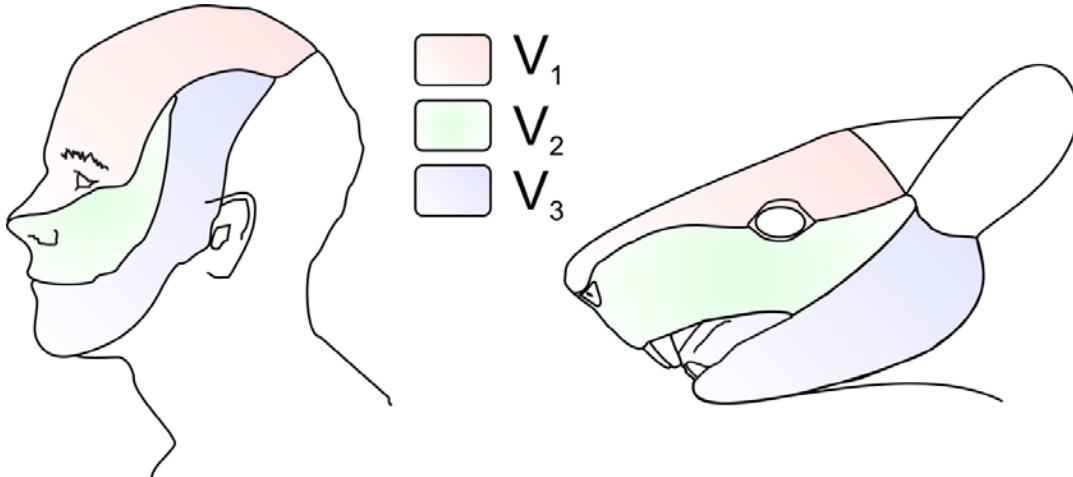
### 2.1. ETAGE PERIPHERIQUE

#### 2.1.1. INNERVATION PERIPHERIQUE TRIGEMINALE

L'innervation sensitive de la région orofaciale est assurée essentiellement par le nerf trijumeau Vn, relayant les informations nociceptives et non-nociceptives cutanées, musculaires et méningées. Le trijumeau se divise en trois branches : le V<sub>1</sub> ou branche ophtalmique, le V<sub>2</sub> ou branche maxillaire et le V<sub>3</sub> ou branche mandibulaire. Le V<sub>1</sub> assure l'innervation des méninges, du front, de la région orbitaire, de la cornée, de la région temporale supérieure et antérieure, de la racine du nez et de la muqueuse nasale. Le V<sub>2</sub> innerve les téguments de la lèvre supérieure, de la joue, de la paupière inférieure, de la région temporale, des gencives, de la cloison des fosses nasales, du palais et des 2/3 antérieurs du rhino-pharynx et de la muqueuse du sinus maxillaire. Le V<sub>3</sub> innerve les téguments de la tempe, du menton, des dents et gencives de la mâchoire inférieure, des 2/3 antérieurs de la langue et de la muqueuse buccale et des joues. (Figure 3).

#### 2.1.2. CLASSIFICATION DES FIBRES PERIPHERIQUES

Les fibres nerveuses périphériques (encore appelées afférences primaires, protoneurones ou neurones de premier ordre), ont un corps cellulaire situé au niveau des ganglions rachidiens dorsaux (DRG) ou du ganglion de Gasser pour les afférences trigéminales. Les fibres nerveuses qui composent la racine trigéminal sont organisées : les larges fibres myélinisées A $\beta$  sont situées médialement tandis que les fibres peu ou pas myélinisées A $\delta$  et C sont situées plus latéralement (Crissman et al., 1996). Ces fibres peuvent répondre à des stimulations électriques, thermiques, chimiques ou mécaniques en fonction des récepteurs qu'elles présentent au niveau de leurs terminaisons périphériques.



**Figure 3 : Territoires cutanés innervés par le nerf trijumeau. a.** Schéma illustrant l'homme. **b.** Schéma illustrant le rat. Les territoires innervés par la branche ophtalmique V<sub>1</sub> (rouge), la branche maxillaire V<sub>2</sub> (vert) et mandibulaire V<sub>3</sub> (bleu) sont indiqués. (*adapté d'après Kelly, 1985 et Waite and Tracey, 1995*).

Le seuil de détection des fibres périphériques est également spécifique et permet de les classer en deux grandes catégories que sont les fibres non nociceptives et nociceptives. En condition physiologique, ces fibres permettent de véhiculer respectivement les messages indolores, et ceux provoquant une douleur. Cependant, leurs propriétés électrochimiques peuvent être perturbées en condition pathologique avec pour conséquences une augmentation ou une réduction de leur seuil d'excitabilité, voire la génération de décharges ectopiques (Devor, 2009 ; Berger et al., 2011).

En fonction de leurs caractéristiques morphologiques, moléculaires et électrophysiologiques, les fibres afférentes peuvent être classées en fibres A $\beta$ , A $\delta$  et C.

#### *2.1.2.1. FIBRES A $\beta$*

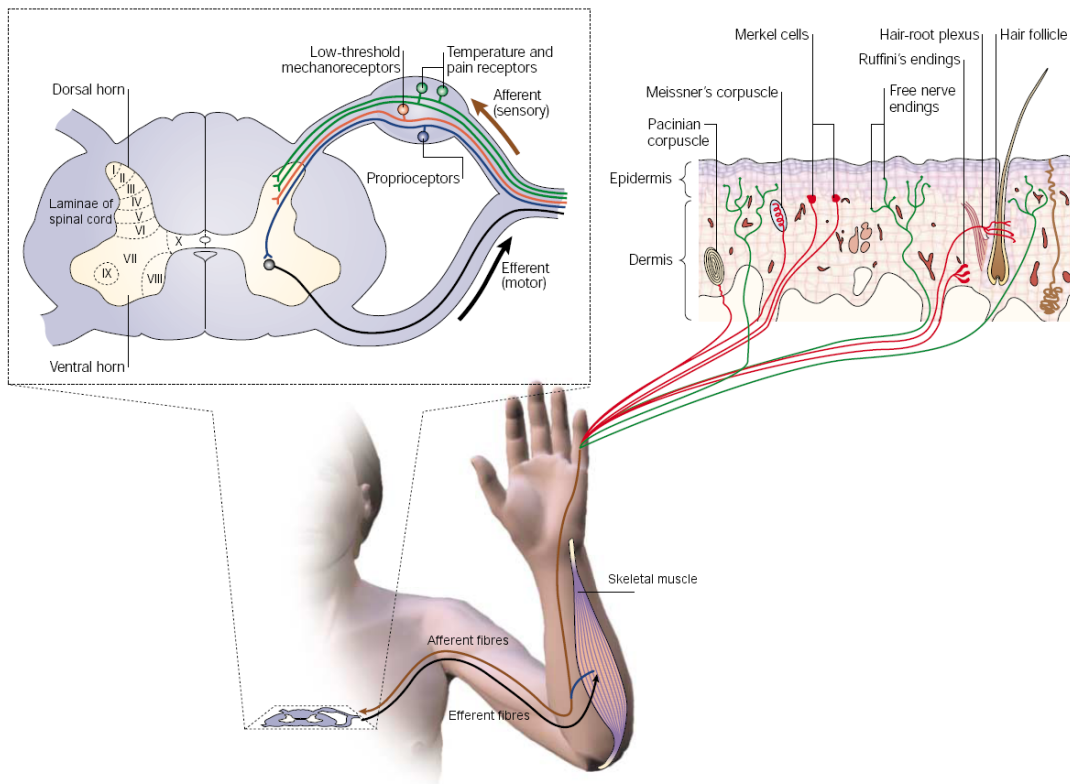
Les fibres A $\beta$  sont de larges diamètres et entourées d'une épaisse gaine de myéline. Elles sont capables de véhiculer les informations tactiles non-nociceptives avec une vitesse de conduction élevée : 36-72 m/s chez l'homme (Lewin and Moshourab, 2004). Les fibres A $\beta$  peuvent répondre différemment aux stimuli périphériques : ainsi il sera possible de distinguer les fibres possédant une vitesse d'adaptation rapide (RAM : rapidly adapting mechanoreceptor) de celles possédant une vitesse d'adaptation lente (SAM : slowly adapting mechanoreceptor). Les RAM, retrouvées dans les corpuscules de Messner et de Pacini, ont un champ récepteur de 3 à 5 mm et sont insensibles aux stimuli statiques ou à basse fréquence. Elles sont capables de détecter des vibrations d'une amplitude de 3 nm lorsque le stimulus est appliqué directement sur le corpuscule (Bolanowski, Jr. and Zwislocki, 1984) et de 10 nm pour un stimulus cutané (Brisben et al., 1999). Elles ont vraisemblablement un rôle prépondérant dans les phénomènes de préemption (Johansson and Westling, 1984 ; Macefield and Johansson, 1996 ; Johnson, 2001). Les SAM, retrouvées dans les complexes de Merkel, ont un champ récepteur de 2 à 3 mm et une

résolution spatiale de 0,5 mm. Ces fibres sont dix fois plus sensibles aux stimuli dynamiques que statiques et répondent de manière très précise aux variations de texture et aux courbures de surface (Edin and Johansson, 1995 ; Collins and Prochazka, 1996 ; Johnson et al., 2000) (Figure 4). D'un point de vue moléculaire, les fibres A $\beta$  expriment le récepteur « Ret » tyrosine kinase au « glia derived neurotrophic factor » (GDNF), (Durbec et al., 1996 ; Luo et al., 2009), le marqueur de neurofilaments NFS et NF-200 (Lawson et al., 1993) et sont directement visibles par une green fluorescent protein (GFP) chez les souris *Npy2r-GFP* récemment caractérisées (Li et al., 2011). De manière intéressante, seules les fibres myélinisées expriment le transporteur 1 du glutamate (VGLUT1), ce dernier pouvant ainsi être utilisé comme marqueur moléculaire des fibres non nociceptives (Todd et al., 2003). Les terminaisons centrales des fibres A $\beta$  sont principalement retrouvées dans les couches II interne (IIi) à V (Neumann et al., 2008 ; Li et al., 2011).

#### 2.1.2.2. FIBRES A $\delta$

Les fibres A $\delta$  ont un diamètre inférieur et sont faiblement myélinisées. Elles peuvent transmettre des informations nociceptives ou non nociceptives en fonction de la composition de leur terminaison périphérique, avec une vitesse de conduction comprise entre 4 et 36 m/s chez l'homme (Lewin and Moshourab, 2004). Les fibres A $\delta$  non nociceptives se retrouvent principalement dans les follicules pileux (D-hair) et répondent de façon remarquable aux pressions tactiles et aux variations brusques et décroissantes de température (Li et al., 2011) (Figure 4). Elles expriment le récepteur TrkB au « brain derived neurotrophic factor » (BDNF) et à la neurotrophine-4 (Klein et al., 1991 ; Klein et al., 1992 ; Li et al., 2011). Les projections centrales des fibres A $\delta$  non nociceptives se retrouvent principalement dans les couches IIi et III (Li et al., 2011) alors que celle des fibres A $\delta$  nociceptives sont principalement localisées dans les couches I, II externe (IIe)

a



b

Fiber	Cross section	Fiber type	Sensation	%	CV (m/s)	vFT (mN)	Thermo-sensitivity	stimulus	afferent signals
A $\beta$		RAM	Touch	10	>10	1.0	light blue		rapidly-adapting
		SAM	Touch	12	>10	1.5	light blue		slowly-adapting
A $\delta$		D-hair	Touch	6	2-10	<0.5	light blue		
		AM	Nociception	12	2-10	5	red		
C		C-polymodal	Nociception	30	<1.5	10	red		
		CMMH/MC/H	Nociception	20	<1.5	6	red		
		"silent"	Nociception	-5	<1.5	N/A	red		
		CLT	Touch	-5	<1.5	<0.5	light blue		

**Figure 4 : Afférences primaires cutanées.** a. Les fibres afférentes primaires cutanées véhiculent les messages nociceptifs et non nociceptifs vers la corne dorsale de la moelle épinière. b. Modalités sensorielles des fibres afférentes primaires cutanées. Les pourcentages sont indiqués en fonction du nombre total de fibres cutanées. La sensibilité thermique est représentée de la manière suivante : rouge = chaud ; bleu = froid ; pâle = pas de sensibilité thermique. nf = fibre nerveuse ; ms = myéline ; CV = vitesse de conduction ; vFT = seuil de détection mécanique ; mN = milli-Newtons ; RAM = rapidly adapting mechanoreceptor ; SAM = slowly adapting mechanoreceptor ; AM = A $\delta$ -mechanonociceptor ; CM = C-mechanonociceptor ; CMH = C-mechanoheatnociceptor ; CMC = C-mechanocoldnociceptor ; CH = C-heatnociceptor ; CLT = C-low threshold fiber (adapté d'après Patapoutian et al., 2003, Smith and Lewin, 2009 et Geffeney and Goodman, 2012).

ainsi que dans la couche V (Light and Perl, 1979 ; Woodbury and Koerber, 2003 ; Woodbury et al., 2008). Les fibres A $\delta$  nociceptives, tout comme les fibres C nociceptives expriment le transporteur 2 du glutamate (VGLUT2) (Todd et al., 2003).

### *2.1.2.3. FIBRES C*

Enfin, les fibres C sont de petits diamètres et sont dépourvues de gaine de myéline. Elles véhiculent les messages nociceptifs via leurs terminaisons libres avec une vitesse de conduction lente : comprise entre 0,4 et 2 m/s chez l'homme (Lewin and Moshourab, 2004). Environ 70% des fibres C sont sensibles à la température avec un seuil de détection au-dessus de 40°C pour les températures chaudes et en-dessous de 10°C pour les températures froides (Treede et al., 1992 ; Lewin and Moshourab, 2004). Les fibres C peuvent répondre uniquement à des stimulations mécaniques, chimiques ou thermique mais la majorité d'entre elles sont polymodales (Lewin and Moshourab, 2004). De manière intéressante, une sous-population de fibres C appelée « fibres C silencieuses » ne répondent à des stimulations thermiques ou mécaniques qu'après inflammation (Meyer et al., 1991 ; Handwerker et al., 1991 ; Kress et al., 1992 ; Schmidt et al., 1995 ; Weidner et al., 1999). Bien que l'existence d'une autre population de fibres C, non nociceptive, soit connue depuis plus de 50 ans (Zotterman, 1939 ; Bessou and Perl, 1969), ce n'est que récemment qu'elle a commencé à être intensivement étudiée. La fonction de ces fibres reste encore aujourd'hui débattue et semblerait intervenir dans la composante affective positive des sensations tactiles (Olausson et al., 2010) ainsi que dans l'hypersensibilité mécanique après inflammation ou lésion nerveuse (Seal et al., 2009) (Figure 4). Malgré l'hétérogénéité des fibres C, il est possible de les distinguer par leurs propriétés neurochimiques. Ainsi, les fibres C nociceptives peptidergiques expriment la substance P, le « calcitonin-gene related peptide » (CGRP) et le récepteur TrkA à la neurotrophine

répondant au « nerve growth factor » (NGF). Les fibres C nociceptives non peptidergiques expriment le récepteur c-Ret à la neurotrophine ainsi que le site de liaison de l'isolectine B4 (IB4), des récepteurs couplés aux protéines G de la famille Mrg et des récepteurs purinergiques comme le récepteur P2X<sub>3</sub> sensible à l'adénosine tri-phosphate (ATP) (Dong et al., 2001 ; Basbaum et al., 2009). Les fibres C nociceptives peuvent également être différenciées selon les canaux ioniques qu'elles expriment liés à leurs modalités sensorielles. Ainsi, les fibres sensibles aux températures élevées expriment préférentiellement les canaux « transient receptor potential vanilloid 1 » (TRPV1), celles sensibles au froid expriment préférentiellement les canaux « transient receptor potential melastatin-8 » (TRPM8), les fibres sensibles aux irritants chimiques expriment préférentiellement les canaux « transient receptor potential ankyrin-1 » (TRPA1) et les fibres sensibles à un milieu acide expriment préférentiellement les canaux « acid-sensing ion channels » (ASICs) (Julius and Basbaum, 2001 ; Basbaum et al., 2009). Les fibres C non nociceptives expriment la tyrosine hydroxylase (TH) et le transporteur 3 du glutamate (VGLUT3) (Seal et al., 2009 ; Li et al., 2011). Leur rôle dans la nociception a récemment été suggéré bien que leur fonction reste encore largement méconnue (Seal et al., 2009). Les projections centrales des fibres C peptidergiques se retrouvent principalement dans les couches I et IIe, avec quelques terminaisons dispersées dans la couche Iii, celles des fibres C non peptidergiques IB4-positives principalement dans la couche Iii, et celles des fibres C non peptidergiques restantes dans la couche Iii, ces dernières étant distinctes de celles des fibres IB4 chez la souris (Ribeiro-da-Silva et al., 1989 ; Plenderleith et al., 1990 ; Averill et al., 1995 ; Neumann et al., 2008 ; Seal et al., 2009 ; Li et al., 2011).

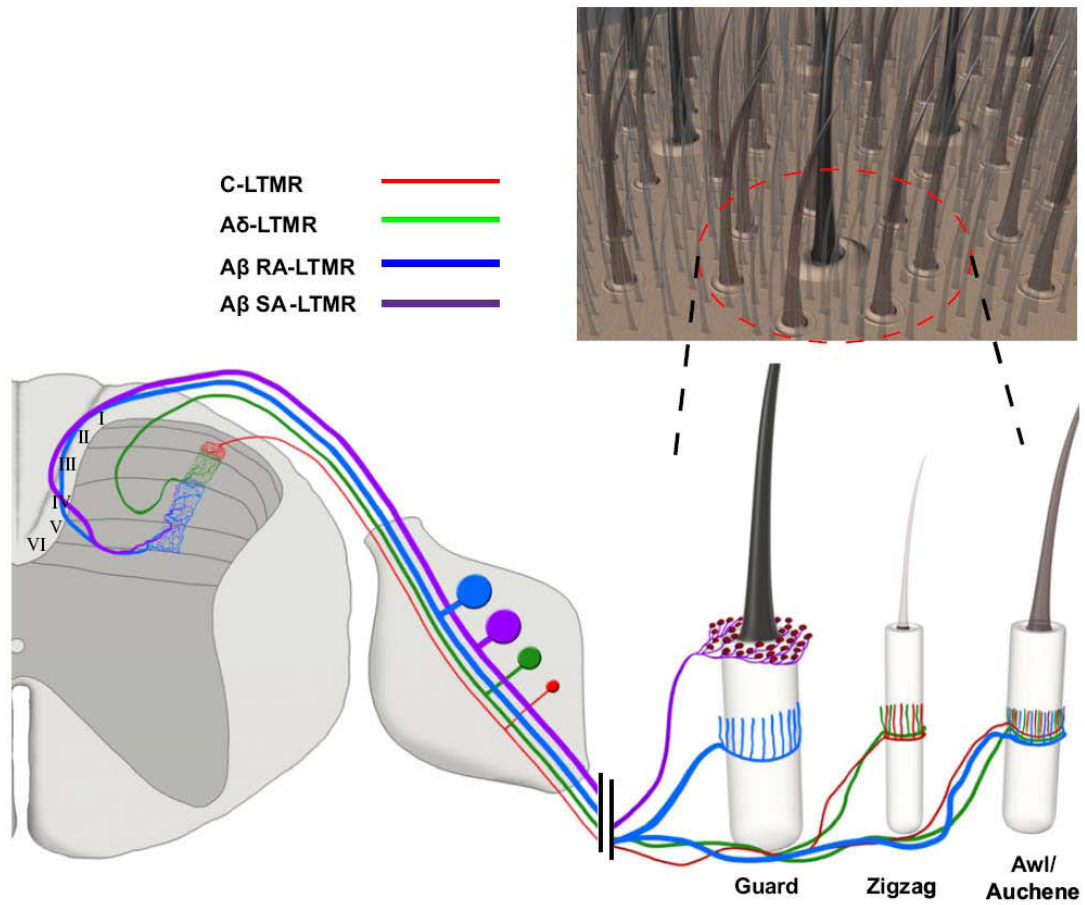
Récemment, Li et ses collaborateurs (2011) ont pu caractériser avec précision la distribution des fibres non nociceptives issues de territoires cutanés pileux mettant à jour



l'existence de territoires innervés simultanément par les trois types de fibres A $\beta$ , A $\delta$  et C (Li et al., 2011). Ces travaux résultent de l'utilisation de marqueurs génétiques permettant d'une part de localiser précisément les terminaisons nerveuses périphériques et d'autre part de cibler et de déterminer les caractéristiques électrophysiologiques des différents types de fibres par enregistrement intracellulaire *in vivo*. Bien que ces travaux aient considérablement amélioré notre compréhension des afférences responsables de la sensation tactile, ils soulèvent également l'existence d'une combinaison des fibres A $\beta$ , A $\delta$  et C activables à bas seuils au sein d'un même territoire (Figure 5). En conséquence, une stimulation d'intensité donnée est capable de recruter les trois types de fibres, nous forçant à reconsidérer le classement généralement admis des fibres nociceptives et non nociceptives en fonction de leur vitesse de conduction A $\beta$ , A $\delta$  et C. Ainsi, cette approche génétique utilisée par Li et ses collaborateurs (2011), couplée aux récentes avancées dans le domaine de l'optogénétique (Boyden, 2011), pourrait bientôt permettre de mieux comprendre la physiologie et la physiopathologie du toucher et de la douleur, au moins dans sa composante périphérique.

Il est intéressant de noter que la proportion de fibres afférentes primaires de type A et C au niveau spinal est différente au niveau trigéminal. Les fibres A ne représentent que 20% des afférences spinales, alors qu'elles représentent 80% des afférences trigéminales (DaSilva and DosSantos, 2012). Cette forte proportion en fibres tactiles dans le complexe trigéminal est probablement corrélée avec la grande capacité de discrimination spatiale des fibres trigéminales, l'intense représentation des territoires de la face au sein du cortex somatosensoriel ainsi qu'avec le rôle important de la sensibilité cutanée dans certaines structures comme les lèvres ou la langue.

## 2.2. ETAGE SEGMENTAIRE



**Figure 5 : Organisation des fibres cutanées non nociceptives.** Les fibres A $\beta$ , A $\delta$  ou C-LTMR peuvent être associées à l'un ou les deux autres types de fibres au sein des follicules pileux. Les terminaisons de ces fibres se retrouvent au sein de la corne dorsale et forment une étroite colonne dorso-ventrale spécialisée dans les réponses tactiles. (*adapté d'après Li et al., 2011*).

Au niveau spinal, les fibres sensibles sont localisées dans les racines dorsales et projettent au niveau de la corne dorsale des différents segments de la moelle épinière alors que les fibres périphériques trigéminales se rassemblent au sein de la racine sensitive trigéminale qui pénètre dans le tronc cérébral au niveau du pont. Elles projettent ensuite au niveau du complexe sensitif du trijumeau qui constitue le premier relais central des informations somesthésiques orofaciales.

### 2.2.1. COMPLEXE SENSITIF DU TRIJUMEAU

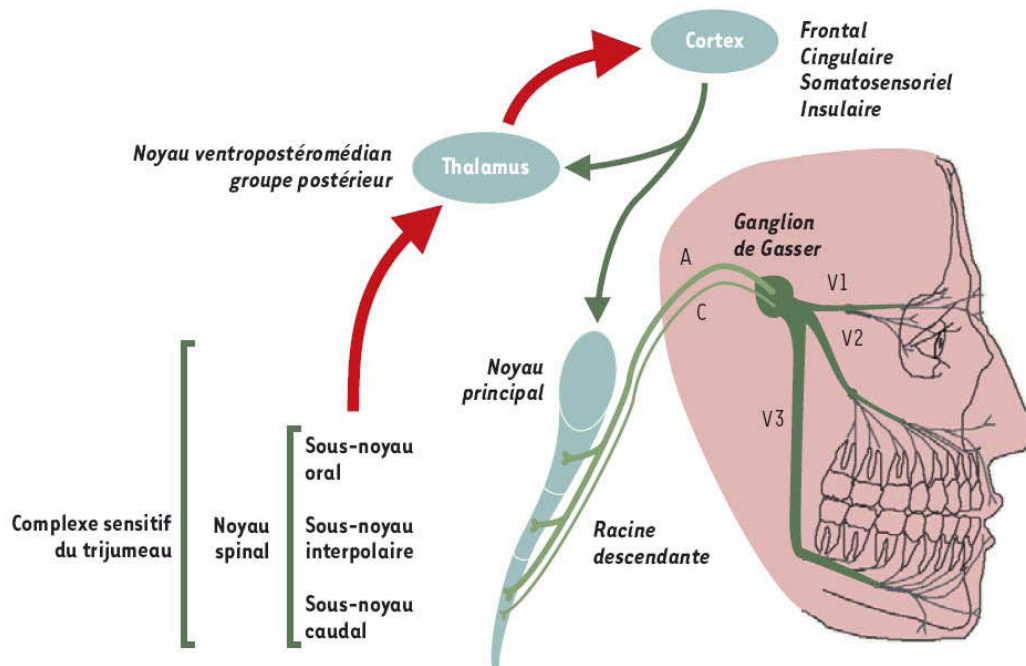
Le complexe sensitif du trijumeau s'étend des premiers segments cervicaux de la moelle jusqu'à la limite caudale du mésencéphale. Il se divise en deux noyaux : le noyau principal (Pr5 ou Vp), situé rostralement, et le noyau spinal, caudalement (Sp5). Celui-ci se divise en trois sous noyaux : le sous-noyau oral (Sp5O ou Vo) (le plus rostral), le sous-noyau interpolaire (Sp5I ou Vi) et le sous-noyau caudal (Sp5C ou Vc) (le plus caudal) (Olszewski, 1950). Le système trigéminale inclut également le noyau moteur du trijumeau (Mo5) situé médialement par rapport au Pr5, le noyau supratrigéminale (Su5) à la limite dorso-médiale du Pr5 et le noyau intertrigéminale faisant le lien entre Pr5 et Mo5. Le Mo5 et le Su5 participent aux réflexes de mastication. Classiquement, le Pr5 et le Sp5I sont considérés comme des relais de la sensibilité tactile proprioceptive.

Lorsqu'elles entrent dans le complexe sensitif du trijumeau, certaines fibres émettent des collatérales vers le Pr5, d'autres en revanche projettent plus spécifiquement vers le Sp5 en émettant des prolongements vers une ou plusieurs sous-divisions. Cette somation, unique dans le complexe sensitif du trijumeau, pourrait être liée à l'intense représentation des territoires innervés par le nerf trigéminale du cortex somatosensoriel. La partie rostrale du trijumeau peut également être modulée par ses régions les plus caudales. En effet, la lésion chimique ou mécanique du Sp5C est capable de réduire l'excitabilité des neurones

trigéminaux rostraux après stimulation de la pulpe dentaire (Greenwood and Sessle, 1976 ; Chiang et al., 2002), de la dure-mère (Davis and Dostrovsky, 1988) et de la cornée (Hirata et al., 2003). A l'inverse, les réponses non nociceptives sont accentuées après stimulation de la peau (Greenwood and Sessle, 1976) ou des vibrisses (Hallas and Jacquin, 1990).

Le sous-noyau oral ou Sp5O, est impliqué dans la transmission des messages nociceptifs véhiculés par les fibres A $\delta$  de la région orale. En effet, chez l'animal, une tractotomie à l'obex (abouchement du canal de l'épendyme dans le quatrième ventricule), limite caudale du Sp5O, inhibe la réponse nociceptive véhiculée par les fibres C observée lors du test au formol alors que les réponses induites par la stimulation des fibres A $\delta$ , lors de la stimulation de la pulpe dentaire par exemple, restent inchangées (Dallel et al., 1989 ; Pajot et al., 2000). De plus, dans ces mêmes conditions, la réponse des neurones du thalamus ventrobasal suite à une stimulation nociceptive trigéminale n'est pas abolie (Raboisson et al., 1989). Chez l'homme, cette même tractotomie ne permet pas de soulager les douleurs buccales. Seules des lésions plus rostrales, voire une destruction du Sp5O, sont efficaces (Graham et al., 1988). Le sous-noyau oral est également impliqué dans la transmission des messages non-nociceptifs par l'intermédiaire de neurones à convergence ou « wide dynamic range » (WDR) et peut être ainsi considéré comme la couche V de la corne dorsale spinale (Dallel et al., 1999). Ces neurones, majoritaires en nombre dans ce sous-noyau, sont ainsi nommés en raison de leur excitabilité à la fois par des stimulations non-nociceptives mais également par des stimulations nociceptives d'origines mécanique, thermique, chimique ou électrique (Le Bars and Cadden, 2008).

Le sous-noyau caudal ou Sp5C, dont la structure laminaire prolonge la corne dorsale de la moelle épinière depuis l'obex jusqu'aux premiers segments cervicaux C1 et C2, est impliqué dans le traitement et le transfert des informations nociceptives et non

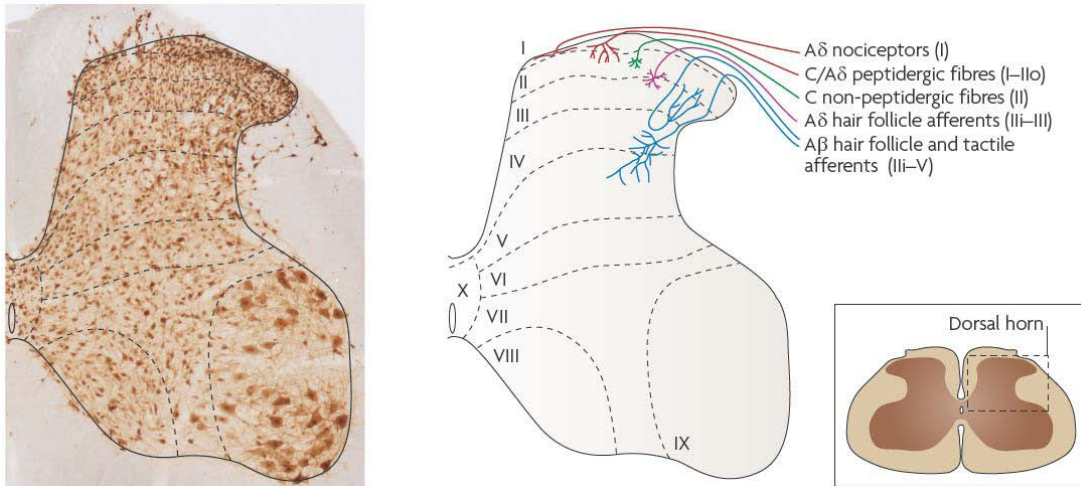


**Figure 6 : Organisation du complexe sensitif du trijumeau et ses connexions.** Les flèches rouges illustrent les voies ascendantes issues du complexe sensitif du trijumeau ou du thalamus, et les flèches vertes les voies descendantes issues du cortex. A: fibres A; C: fibres C; V1: nerf ophtalmique; V2: nerf maxillaire; V3: nerf mandibulaire. (adapté d'après Dallel et al., 2003).

nociceptives. Il est, par ailleurs, le seul sous-noyau recevant à la fois des connexions de fibres non nociceptives de type A ainsi que de fibres nociceptives de type C (Nishimori et al., 1986) (Figure 6). Ainsi, les patients ayant subi une lésion bulbaire ne touchant que la partie caudale du complexe trigéminal après occlusion de l'artère cérébelleuse postéro-inférieure, sclérose en plaques ou syringomyélie, présentent une réduction ou une perte de la sensibilité thermique et algique, sans perte de la sensibilité tactile (Gerard, 1923). De plus, la désafférentation du Sp5C par tractotomie à l'obex est également capable d'induire une anesthésie thermo-algique sans modification significative de la sensibilité tactile (Sjoqvist, 1938). Enfin, la micro-injection de morphine dans le Sp5C déprime les réponses des neurones à convergence du Sp5O lié à l'activation des fibres C, confirmant la fonction du Sp5C comme relais des informations véhiculées par les fibres C (Dallel et al., 1998). En raison de ces caractéristiques particulières que présentent le Sp5C, la majorité des travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés sur cette structure. De ce fait, il me semble pertinent de présenter plus en détails les composantes du Sp5C et les caractéristiques communes qu'il partage avec la corne dorsale de la moelle épinière.

### 2.2.2. LA CORNE DORSALE

Le Sp5C, à l'instar de la corne dorsale de la moelle épinière, est organisé de manière somatotopique et laminaire (Figure 7). Depuis la première représentation de la cytoarchitecture de la corne dorsale de la moelle épinière réalisée chez le chat par Rexed en 1952, de nombreux auteurs ont essayé de caractériser les neurones peuplant les différentes couches selon leurs propriétés morphologiques, anatomiques ou électrophysiologiques. Initialement, Rexed délimite la substance grise spinale en dix couches, la corne dorsale étant représentée par les six premières couches numérotées de I à VI. La couche VI cependant n'est retrouvée que dans les segments cervicaux et

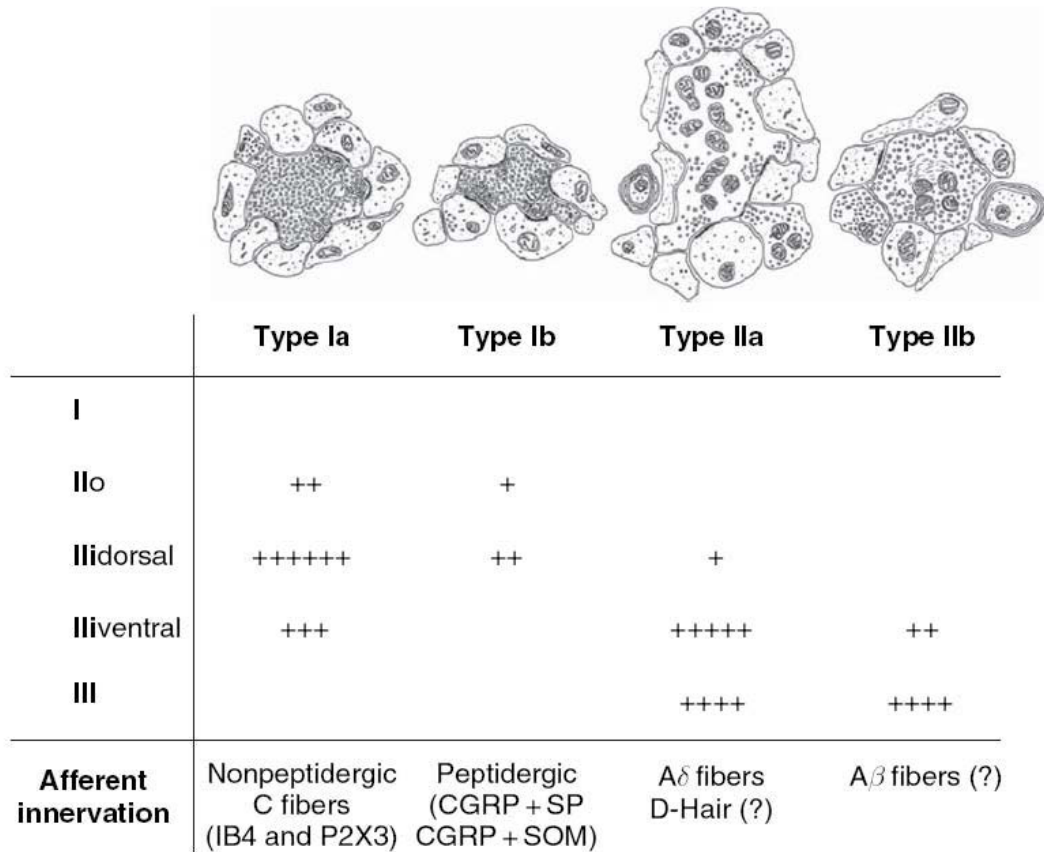


**Figure 7 : Organisation laminaire de la corne dorsale et afférences primaires.** a. Section transverse d'une moelle lombaire de rat immunomarkée par l'anticorps neurone-spécifique anti-NeuN. Les différentes couches de la corne dorsale sont indiquées en lignes pointillées et reflètent les différents changements de densité et de morphologies neuronales. b. Les fibres nociceptives peptidergiques C et les fibres A $\delta$  projettent sur les couches I et II. Les fibres C non peptidergiques se projettent sur la couche II. Les fibres non nociceptives A $\beta$  et A $\delta$  projettent sur les couches de II à V. (*adapté d'après Todd, 2010*).

lombaires de la moelle épinière et est absente dans le complexe sensitif du trijumeau. Les couches I et II les plus dorsales, autrement appelées « couches superficielles » ainsi que les plus profondes (principalement la couche V), sont généralement associées à la nociception car recevant des projections de fibres afférentes nociceptives C et A $\delta$  et répondant à des stimulations nociceptives (Rethelyi et al., 1982 ; Maxwell and Réthelyi, 1987 ; Rethelyi et al., 1989 ; Light and Willcockson, 1999 ; Lorenzo et al., 2008). Ces fibres périphériques réalisent de multiples synapses asymétriques (excitatrices) glutamatergiques au sein de glomérules de type I sensibles à la capsaïcine. A l'échelle de la microscopie électronique, ces glomérules se caractérisent par leur axoplasme dense en vésicules rondes ou arrondies, pauvres en mitochondries ainsi que de multiples synapses asymétriques mettant en jeu des dendrites postsynaptiques pouvant également contenir des vésicules présynaptiques (Ribeiro-da-Silva and Coimbra, 1982 ; Ribeiro-da-Silva and Coimbra, 1984 ; Ribeiro-da-Silva et al., 1985) (Figure 8). Dans les cas de terminaisons de fibres peptidergiques, l'axoplasme contient généralement des vésicules larges à cœur dense, immunopositives à la substance P ou au CGRP (Ribeiro-da-Silva et al., 1989).

La couche I, encore appelée substance spongieuse ou zone marginale, et la couche II, ou substance gélatineuse, apparaissent translucides sur tissus frais en raison de l'absence de fibres myélinisées dans ces structures (Light and Lee, 2008). D'après les travaux de Light chez le chat, 61% des neurones de la couche I répondent à des stimulations nociceptives (dont 43% sont purement nociceptifs spécifiques), 39% sont thermoréceptifs et une faible proportion mécanosensibles à des stimuli non nociceptifs. Parmi les neurones nociceptifs spécifiques, 80% sont polymodaux alors que 20% ne répondent qu'à des stimuli mécaniques. Certains neurones, par ailleurs, ne répondent qu'à l'application périphérique d'histamine (responsable des sensations de démangeaisons) (Andrew and





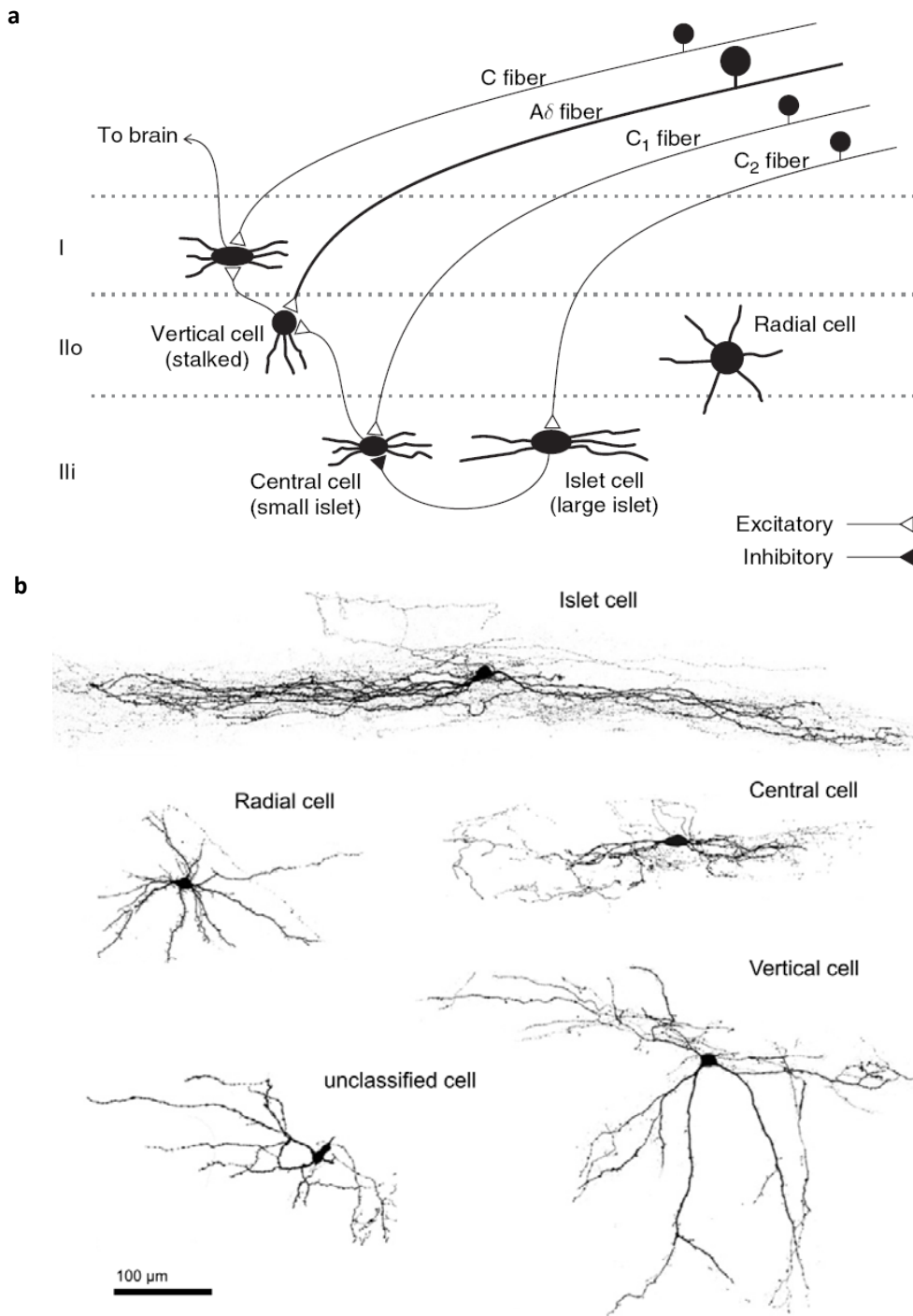
**Figure 8 : Glomérules retrouvés dans la corne dorsale spinale.** Les glomérules de type I sont retrouvés dans les couches superficielles et présentent un axoplasme dense et de nombreuses vésicules de neurotransmission. Les glomérules de types IIa et IIb sont caractéristiques des terminaisons de fibres myélinisées. L'axoplasme clair est dense en mitochondries et présente des vésicules plus dispersées. (*adapté d'après Ribeiro-da-Silva and De Koninck, 2008*).

Craig, 2001b) ou à la contraction de fibres musculaires (responsable de l'ergoréception) (Wilson et al., 2002), phénomènes nécessaires à l'homéostasie et au maintien de l'intégrité du corps (Craig, 1996; Craig, 2003a). Parmi les neurones de la couche I, 25% sont des interneurones inhibiteurs et coexpriment le plus souvent les deux principaux neuromédiateurs inhibiteurs du système nerveux central : le  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) et la glycine (Todd and Sullivan, 1990 ; Polgar et al., 2003). Environ 5% des neurones de la couche I sont des neurones de projection (Spike et al., 2003). Parmi ces neurones, 95% projettent vers l'aire parabrachiale latérale (LPb), 33% vers la substance grise périaqueducule (PAG), 25% vers le noyau du tractus solitaire (NTS) et moins de 5% vers le thalamus. Cependant, ces proportions évaluées à partir de neurones de couche I de la moelle lombaire chez le rat semblent être différentes de la moelle cervicale (Al Khater et al., 2008) ou au niveau trigéminal (Gauriau and Bernard, 2004 ; Guy et al., 2005). Parmi ces neurones de projection, environ 80% expriment le récepteur neurokinine 1 (NK1) à la substance P (Al Khater et al., 2008) et peuvent être fusiformes, pyramidaux ou multipolaires (Spike et al., 2003 ; Almarestani et al., 2007). Les neurones de la couche I arborisent localement dans la même couche, voire dans la couche II (Grudt and Perl, 2002). Les neurones de la couches II réalisent des contacts monosynaptiques sur les neurones de la couche I, la transmission synaptique entre ces deux couches se faisant exclusivement dans cette direction (Lu and Perl, 2005). Dans la couche I, trois types morphologiques ont été mis en évidence : neurones pyramidaux, fusiformes et multipolaires (Lima and Coimbra, 1986). D'une manière générale, les neurones fusiformes ont un mode de décharge tonique, les neurones pyramidaux un mode de décharge phasique et les neurones multipolaires un mode de décharge unique ou retardé (où le premier potentiel d'action n'apparaît que quelques centaines de millisecondes après que le seuil de décharge n'ait été atteint) (Prescott and De Koninck, 2002). Bien

qu'aucune relation entre morphologie et fonction neuronale n'ait été clairement établie, il semblerait que les neurones pyramidaux immunonégatifs au NK1 répondraient préférentiellement aux stimulations thermiques décroissantes et que les larges neurones immunopositifs au NK1 recevraient de nombreuses synapses glutamatergiques (quatre fois plus que les plus petits neurones immunonégatifs au NK1) (Todd, 2010). Une autre catégorie de neurones de la couche I exprimant l'isoforme gamma de la protéine kinase C (PKC $\gamma$ ) a également été identifiée comme projetant vers le thalamus. Dans cette étude, 37% des neurones PKC $\gamma$  de la couche I émettent des prolongements vers la région postéromédiale du noyau thalamique ventral, 45% vers les noyaux postérieurs du thalamus et 30% vers les noyaux médians et intralaminaires du thalamus. Parmi les neurones de la couche I immunopositifs pour le traceur rétrograde fluorogold injecté dans chacune de ces structures, plus de 90% sont également immunopositifs pour la PKC $\gamma$  (Li et al., 2001b). De manière intéressante, les neurones PKC $\gamma$  de la couche I représentent 22% des neurones exprimant le récepteur NK1 dans cette couche (Polgar et al., 1999a). Cependant, le rôle fonctionnel de ces neurones reste encore inconnu.

La couche II est la couche la plus dense en neurones de la corne dorsale et est majoritairement composée d'interneurones (Todd, 2010). Initialement, cette couche a été divisée en deux avec une partie dorsale, la couche IIe recevant des terminaisons d'afférences primaires nociceptives de type A $\delta$  et C (Light and Lee, 2008), et une plus ventrale, la couche Iii recevant des terminaisons de fibres non nociceptives de type A $\beta$ - (Neumann et al., 2008), A $\delta$ - (D-hair) (Rethelyi et al., 1982) et C- « Low threshold mechanoreceptor » (LTMR) (Seal et al., 2009). Cependant, de récentes publications semblent indiquer qu'une troisième couche se distinguerait, au moins chez la souris. Cette couche, dense en neurones exprimant la PKC $\gamma$ , est située dans la partie la plus ventrale de

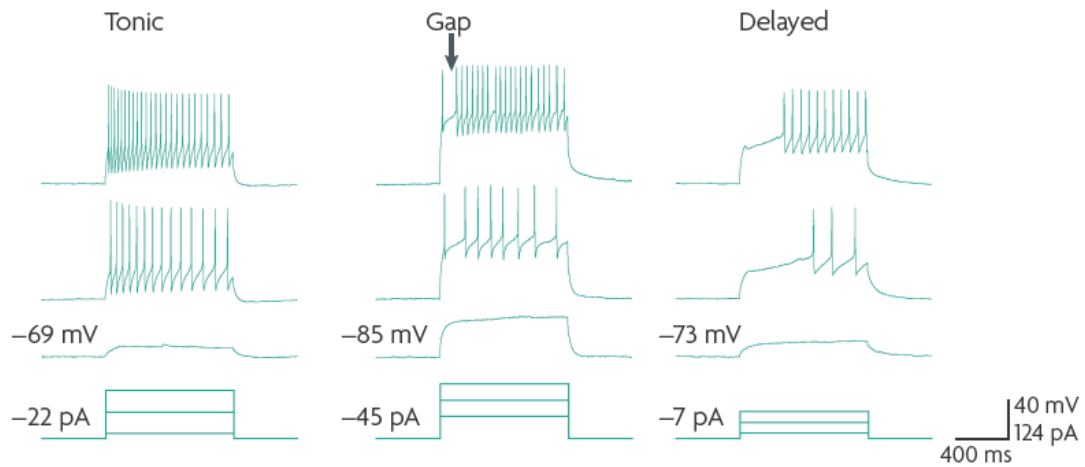
la couche II et apparaît pleinement distincte de la couche III IB4-positive chez la souris (Braz et al., 2005 ; Zylka et al., 2005 ; Neumann et al., 2008 ; Basbaum et al., 2009 ; Seal et al., 2009). Cette distinction entre couche III et « couche II PKC $\gamma$  » n'est cependant pas retrouvée chez le rat et reflète probablement une différence fonctionnelle entre ces deux espèces qu'il reste néanmoins à déterminer (Neumann et al., 2008). Les neurones de la couche IIe répondent majoritairement à des stimulations nociceptives (70%), 48% étant d'origine mécanique et 32% d'origines thermique et mécanique. Parmi les neurones restants, 20% répondent à des stimulations nociceptives et non nociceptives, 5% à des stimuli thermiques et 5% à des stimuli mécaniques non nociceptifs (Light and Lee, 2008). A l'inverse, les neurones de la couche III sont majoritairement sensibles à des stimulations non nociceptives, principalement mécaniques (Light and Perl, 1979 ; Price et al., 1979 ; Woolf and Fitzgerald, 1983 ; Light and Willcockson, 1999). Parmi les neurones de la couche II, 70% sont des neurones excitateurs, les 30% restant étant des neurones inhibiteurs. Ces neurones arborisent majoritairement au sein de leur propre couche ainsi que vers la couche I. De manière intéressante, il semble exister une corrélation entre le type morphologique et la fonction inhibitrice des interneurons de la couche II. En effet, plusieurs études morphologiques des neurones de la couche II démontrent que environ 30% des interneurons de la couche II ont une morphologie de type « islet cells » dont les arbres dendritiques sont allongés (>400 $\mu$ m) dans l'axe rostro-caudal et médio-latéral (Gobel, 1975 ; Gobel, 1978 ; Todd and Lewis, 1986) et synthétisent du GABA et de la glycine (Todd and McKenzie, 1989 ; Todd and Sullivan, 1990 ; Heinke et al., 2004 ; Yasaka et al., 2010). L'existence d'un morphotype majoritaire de neurones excitateurs semble par contre plus difficile à déterminer. En effet, parmi ces neurones se retrouvent les « radial cells » présentant une arborisation dendritique compacte irradiant dans toutes les directions, les « vertical cells » (autrefois appelées stalked cells ; Todd and Lewis,



**Figure 9 : Connectivités et localisations morphométriques des neurones de la substance gélatineuse.** **a.** Représentation schématique des neurones de la substance gélatineuse, de leurs afférences principales et de leurs interconnectivités en fonction de leurs morphologies. C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub> correspond ici aux deux types de fibres C selon Light. (adapté d'après Light and Lee, 2008). **b.** Principaux types neuronaux présents dans la substance gélatineuse. Les islet cells sont majoritairement des interneurons inhibiteurs, les autres types neuronaux étant présumés excitateurs. A noter la classe de neurones ne correspondant pas aux critères morphologiques usuels. (adapté d'après Yasaka et al., 2010).

1986) avec un corps cellulaire en position dorsale et des dendrites arborisant ventralement et les « central cells » dont la morphologie ressemble aux « islet cells » mais avec un arbre dendritique beaucoup plus court ( $>400\mu\text{m}$ ), ces dernières étant plutôt localisées dans la couche IIi (Grudt and Perl, 2002 ; Lu and Perl, 2005 ; Ribeiro-da-Silva and De Koninck, 2008 ; Yasaka et al., 2010) (Figure 9). Cependant, Yasaka et ses collaborateurs (2010) ont récemment étudié les propriétés électrophysiologiques de ces sous-types neuronaux dans la couche II et ont reporté certaines spécificités. En effet, les interneurons inhibiteurs semblent présenter un mode de décharge unique, tonique. A l'inverse, les interneurons excitateurs semblent être les seuls à présenter un mode de décharge retardé ou un mode « gap » (où le premier potentiel d'action est légèrement décalé du second par rapport au reste de la bouffée) (Figure 10).

Les neurones de la couche III ne reçoivent que des afférences primaires non nociceptives sensibles aux stimuli mécaniques (Price and Mayer, 1974 ; Wall et al., 1979 ; Light and Durkovic, 1984). Le rôle de cette couche dans la douleur est encore mal connu. Cependant, l'intense immunoréactivité pour le récepteur NK1 au sein de la couche III semblerait indiquer que ces neurones pourraient être activés par des fibres peptidergiques de type C (Naim et al., 1997). De plus, des contacts synaptiques ont été récemment caractérisés sur les neurones NK1 de la couche III, par des fibres nociceptives C et A $\delta$  positives au transporteur 2 du glutamate (VGLUT2) (Baseer et al., 2012). Une récente étude a également identifiée de nombreuses synapses GABAergiques contenant le neuropeptide Y (NPY) et/ou la nitric oxide synthase (nNOS) sur les neurones NK1 positifs de la couche III, présumées d'origine locale (Polgar et al., 1999b ; Polgar et al., 2011). Les neurones de la couche III possèdent une arborisation dendritique s'étendant selon un axe rostro-caudal ou ventro-dorsal (Maxwell et al., 1983; Polgar et al., 2004).



**Figure 10 : Caractéristiques électrophysiologiques des neurones inhibiteurs et excitateurs de la couche II.** Le mode de décharge tonique est retrouvé dans la plupart des interneurones inhibiteurs. Les modes de décharge « gap » ou « delayed » sont retrouvés dans la plupart des neurones excitateurs mais rarement dans les neurones inhibiteurs. Les valeurs indiquées sur la gauche correspondent au potentiel de repos observé ainsi qu'au courant requis pour atteindre le seuil de potentiel d'action pour chaque neurone enregistrés. (*adapté d'après Yasaka et al., 2010*).

Les neurones de la couche III, comme ceux de la couche IV, peuvent présenter un mode de décharge tonique, phasique ou retardé (Schneider, 2003).

La couche IV est composée à la fois de neurones répondant à des stimulations non nociceptives mais aussi de neurones WDR, ces derniers étant toutefois minoritaires (Light and Lee, 2008). Lors d'une étude chez le chat, Light et Durkovic (1984) ont reporté que les neurones de la couche IV répondaient, pour 56% d'entre eux, uniquement à des stimulations non nociceptives mécaniques. Seuls 6% des neurones seraient des neurones nociceptifs spécifiques. Le rôle de la couche IV dans la douleur est encore inconnu. Les neurones de la couche IV ont une arborisation dendritique dite en « antenne » et dont les prolongements peuvent remonter dans les couches I, II et III (Szentagothai, 1964).

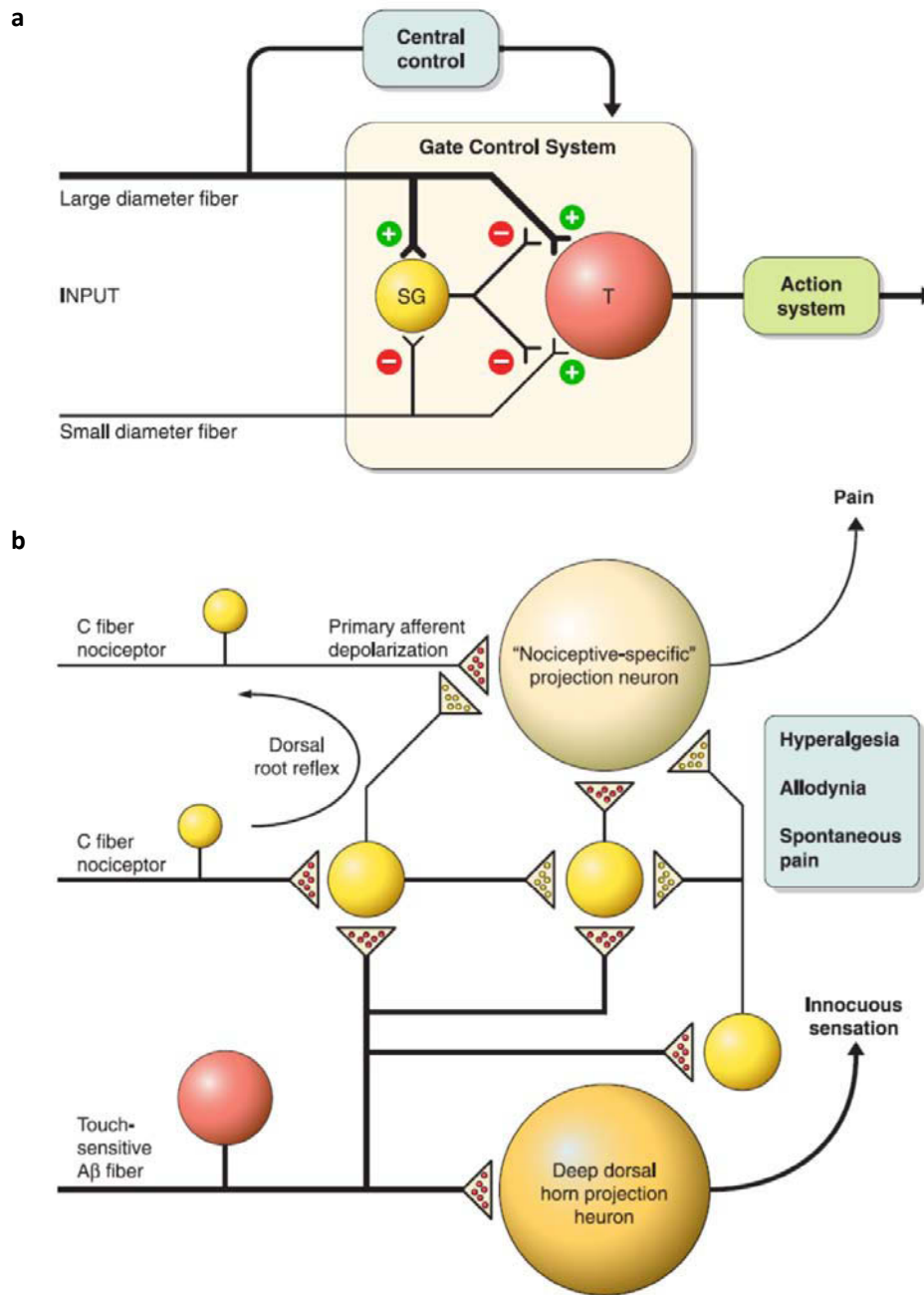
La couche V a été intensément étudiée depuis plus de cinquante ans pour plusieurs raisons. D'une part, les neurones qui la composent sont de taille importante en comparaison des neurones des autres couches, rendant plus facile les enregistrements électrophysiologiques *in vivo* et *in vitro*. D'autre part, ces neurones projettent massivement vers le thalamus et représentent donc une voie de sortie du réseau spinal vers les structures suprasegmentaires. Enfin, de nombreux neurones de la couche V sont des neurones WDR et peuvent donc répondre à la fois à des stimulations nociceptives et non nociceptives (Light and Lee, 2008). Parmi les neurones de la couche V, 20% sont des neurones nociceptifs spécifiques, 10% ne répondent qu'à des stimulations non nociceptives mécaniques et 60% sont des neurones WDR (Willis et al., 1974). Ces derniers répondent à tous les types de stimuli qu'ils soient chimiques, électriques, thermiques ou mécaniques, suggérant que ces neurones sont contactés à la fois par des fibres myélinisées et amyéliniques. Les neurones de la couche V ont un champ récepteur particulièrement étendu et ont un champ récepteur inhibiteur entourant le champ récepteur



excitateur, les deux champs ayant un seuil de réponse équivalent (Hillman and Wall, 1969). Ces neurones codent de façon remarquable l'intensité de la stimulation comme en témoigne la parfaite corrélation entre le ressenti douloureux mesuré chez des patients ayant subi une série de stimulations thermiques cutanées et les enregistrements électrophysiologiques de neurones WDR de la corne dorsale obtenus chez le chat dans des conditions similaires (Vierck, Jr. et al., 1997 ; Craig and Andrew, 2002). Les neurones de la couche V projettent vers le thalamus via le tract antérolatéral. Leur vitesse de conduction moyenne est de 40 m/s (Willis et al., 1974). De nombreux neurones WDR reçoivent des entrées nociceptives issues de structures viscérales ou musculaires. La convergence des entrées somatiques et viscérales sur les neurones WDR permet d'expliquer le phénomène de douleur projetée, au cours duquel une douleur d'origine viscérale est localisée de façon consistante par les patients dans un territoire cutané donné (Foreman, 2000). Par exemple, les patients souffrant d'un infarctus du myocarde se plaignent souvent de douleurs dans le bras gauche associées à leur douleur thoracique. L'explication de ce phénomène tient au fait qu'un même neurone de projection reçoit des entrées des deux territoires. Les neurones de la couche V ont une arborisation dendritique s'étendant dans l'axe dorso-ventral mais peuvent également s'étendre jusque dans les couches II et III (Brown, 1982). Les neurones de la couche V ont essentiellement un mode de décharge tonique (Derjean et al., 2003).

Le rôle des neurones WDR de la couche V, et particulièrement sa spécificité fonctionnelle par rapport aux neurones nociceptifs spécifiques de la couche I, est encore aujourd'hui largement débattue. En effet, depuis l'apparition de la « théorie du portillon », ou « gate-control », avancée par Melzack et Wall (1965), le rôle des neurones WDR dans la douleur a fait l'objet d'intenses débats, particulièrement au cours des dernières années,

confrontant la théorie de la convergence (Price et al., 2003) et celle considérant deux voies distinctes d'intéroception et d'extéroception (Craig, 2003b ; Craig, 2003c). Dans le modèle de Melzack et Wall, soutenu par Price, un même neurone à convergence est capable de recevoir des informations nociceptives et non nociceptives et de transmettre un message tactile ou douloureux vers les centres supérieurs. Un contrôle inhibiteur mis en jeu par une stimulation mécanique légère peut fermer la porte au transfert des informations issues des fibres nociceptives (Figure 11). Cette théorie permet d'expliquer qu'une douleur occasionnée par une lésion localisée diminue lors de la stimulation concomitante des fibres du toucher du dermatome concerné. Ainsi, Price considère ces deux voies comme convergentes et interconnectées que ce soit à l'étage segmentaire ou dans les centres supérieurs. Les fonctions biologiques de la douleur seraient à la fois extéroceptives, en rapport direct avec la perception sensorielle, par exemple pour localiser et fuir un danger externe, et intéroceptives, associée à une représentation corporelle de l'état physiologique du corps, dès que les fonctions homéostatiques d'un tissu seraient dérégées. A l'inverse, d'après Craig, les neurones WDR seraient impliqués dans la réponse intéroceptive afin de protéger celui-ci des dommages périphériques éventuels. Cette fonction homéostatique serait donc axée sur les composantes émotionnelles et motivationnelles de la douleur, donnant ainsi un élément de réponse aux larges champs récepteurs observés sur ces neurones. Les neurones WDR seraient donc dissociés des neurones nociceptifs spécifiques (NS) de la couche I, contactés uniquement par des fibres nociceptives, possédant des champs récepteurs beaucoup plus réduits. La fonction des neurones NS serait donc extéroceptive et permettrait de cibler de manière très précise le territoire lésé. Cependant, les résultats obtenus dans les récents travaux publiés par Miraucourt et ses collaborateurs (2007) séparent fonctionnellement les neurones NS de la couche I, des neurones WDR. En effet, dans cette étude s'intéressant à l'allodynie



**Figure 11 : Théorie du « gate control ».** **a.** Théorie énoncée par Melzack et Wall. Dans ce schéma, un neurone central reçoit à la fois des contacts de fibres nociceptives et non nociceptives. Un interneurone inhibiteur situé entre les deux dans la substance gélatineuse (SG), permet de réduire l'activité des neurones de transmission (T) par des stimulations non nociceptives, ou au contraire de faciliter l'excitation par des stimulations nociceptives. **b.** Théorie modifiée selon Zeilhofer. Ici, les voies du tact et de la nociception font intervenir des réseaux non plus convergents mais parallèles. Une stimulation tactile entraîne l'activation d'un réseau inhibiteur situé entre les neurones nociceptifs spécifiques des couches superficielles et les neurones de projections des couches profondes permettant de bloquer la transmission de messages nociceptifs au niveau des neurones de premier et second ordres. (adapté d'après Melzack and Wall, 1965 et Zeilhofer et al., 2012).

mécanique induite par désinhibition glycinergique segmentaire, seule une désinhibition localisée dans les couches superficielles *in vivo*, suivie d'une stimulation non nociceptive, permet de modifier la pression artérielle, reflet de l'intégration émotionnelle de la douleur, chez le rat. Aucune variation de pression artérielle n'a été observée lorsque cette désinhibition était effectuée sur les neurones WDR, bien que ces deux populations neuronales présentent une hyperexcitabilité après désinhibition glycinergique. Ainsi, les neurones NS de la couche I, aux champs récepteurs restreints, seraient responsables de l'intégration somatotopique et émotionnelle de la douleur, alors que les neurones WDR des couches profondes, aux champs récepteurs étendus et capables de coder l'intensité de la stimulation de manière extrêmement précise, seraient impliqués dans les réponses nocifensives motrices associées à la douleur. De futures investigations combinant des études comportementales couplées à une stimulation des neurones de la couche I ou de la couche V par électrophysiologie ou optogénétique *in vivo* ou un ciblage neuronal par méthodes génétiques pourraient enfin permettre de mettre fin à ce débat.

### 2.3. ETAGE SUPRASEGMENTAIRE

L'objectif des différents travaux présentés dans ce manuscrit est principalement focalisé sur de la mécanistique segmentaire. Cependant, l'en séparer de son intégration supraspinale n'aurait aucun sens. Par conséquent, cette section présente de manière succincte l'organisation et la fonction des principales voies ascendantes et descendantes impliquées dans la douleur.

#### 2.3.1. VOIES ASCENDANTES

Les neurones de projections des couches I et V de la corne dorsale émettent des axones vers les structures suprasegmentaires via plusieurs faisceaux. Parmi ces voies,

nous retiendrons les faisceaux spinothalamique, spinoréticulaire et spinomésencéphalique. La majorité de ces neurones croisent la commissure centrale de la substance grise et traversent le quadrant antérolatéral controlatéral avant de remonter par le cordon antérolatéral vers leurs structures cibles (Le Bars and Willer, 2004). Ce croisement a lieu au sein du même segment ou dans un segment adjacent. Certains neurones, comme les neurones de projections de la couche I, empruntent une voie parallèle en émettant des prolongements dans le cadran dorsolatéral et remontent par le funiculus dorsolatéral. La voie lemniscale des colonnes dorsales se distinguera de la voie extralemniscale par ses fibres projetant vers le thalamus latéral et le cortex somesthésique primaire (S1) via le lemnisque médian et véhiculant des informations responsables de la sensibilité tactile épicrotique et la proprioception (Millan, 1999).

Le faisceau spinothalamique projette sur le thalamus latéral (le noyau ventro-postéro-latéral (VPL), le noyau ventro-postéro-médial (VPM), le noyau ventro-postéro-inférieur (VPI)) et médian (la partie postérieure du noyau ventro-médial (VMpo), la portion ventro-caudale du noyau dorso-médial (MDvc) et le noyau central latéral (CL)). (Treede et al., 1999). Il est classiquement admis que la composante sensorielle discriminative de la douleur est médiée par le noyau ventro-postéro-médial pour la sphère orofaciale et ventro-postéro-latéral pour le reste du corps. Le rôle du thalamus médian est quant à lui plus difficile à déterminer. Sa fonction dans la composante sensori-discriminative de la douleur se confronte à des champs récepteurs diffus. En revanche, en raison de ses projections vers les noyaux gris centraux et les aires corticales motrices, prémotrices et frontoorbitaires, il pourrait intervenir dans la vigilance et l'élaboration des réactions motrices et émotionnelles liées à la douleur (Dostrovsky, 2000).

Il existe de nombreuses convergences entre les faisceaux spinothalamique et spinoréticulaire, élément pouvant être considéré comme une preuve anatomique de la complémentarité de ces deux voies. Les axones du faisceau spinoréticulaire, provenant majoritairement des neurones de couche V de la corne dorsale (Yeziarski, 1988 ; Andrew et al., 2003), projettent principalement vers le sous-noyau réticulaire dorsal. Ce noyau n'est activé que par des stimulations nociceptives, quelles que soient leur origine ou leur modalité (Villanueva et al., 1996), et coderait vraisemblablement pour l'intensité de la stimulation, sans discrimination spatiale. Les neurones de ce noyau projettent massivement vers le thalamus médian et constitue donc le relais de la voie spinoréticulothalamique.

Le faisceau spinomésencéphalique projette essentiellement vers la substance grise périaqueducule (PAG) et l'aire parabrachiale dans la région dorsolatérale du pont. La PAG est le principal site mésencéphalique d'intégration motrice pour les réponses de défense et de vocalisation (Gauriau and Bernard, 2002). L'aire parabrachiale est sensible aux stimulations nociceptives provenant de la couche I de la corne dorsale. Les neurones de l'aire parabrachiale ont un champ récepteur diffus et ne constituent donc pas un relais de l'information somatotopique (Le Bars and Willer, 2004). Ils projettent majoritairement vers le noyau central de l'amygdale et l'hypothalamus conférant donc à cette structure un rôle important dans les processus végétatifs, émotionnels et endocriniens liés à la douleur (Lovick, 1996 ; Benarroch, 2001).

Plusieurs travaux suggèrent également qu'une voie spinohypothalamique jouerait un rôle dans l'aspect émotionnel de la douleur. Cependant, des terminaisons nerveuses n'ont pu être clairement identifiées, suggérant plutôt la présence de fibres de passage dans cette structure. De plus, ces fibres sont partiellement retrouvées chez le chat et sont inexistantes

chez le primate, remettant en cause l'existence d'une voie directe spinothalamique (Burstein et al., 1991 ; Burstein et al., 1996 ; Dostrovsky and Craig, 2006).

Le cortex joue également un rôle majeur dans l'intégration et la modulation des messages douloureux. Le cortex somatosensoriel primaire (SI) et secondaire (SII) reçoit des projections du thalamus latéral (Treede et al., 1999). Il intervient dans les aspects sensori-discriminatifs de l'information nociceptive (Hofbauer et al., 2001). Le cortex insulaire (INS) reçoit des projections du thalamus ventromédian, en continuité avec la voie spinothalamique issue des neurones de couche I (Craig, 2003c), et intervient dans la représentation sensorielle intéroceptive et la condition physiologique corporelle (Tolle et al., 1999 ; Dostrovsky and Craig, 2006). Le cortex cingulaire antérieur (CAA) reçoit des projections thalamiques issues des noyaux dorso-médian et central latéral (Dostrovsky and Craig, 2006). Il intervient dans le contrôle de l'attention, l'anticipation, l'orientation et les réponses motrices et autonomiques (Hofbauer et al., 2001). Le cortex préfrontal reçoit des projections thalamiques issues du noyau submedius (Treede et al., 1999). Il intervient dans les aspects cognitifs de la perception douloureuse (Albe-Fessard et al., 1975 ; Tolle et al., 1999 ; Lorenz and Garcia-Larrea, 2003 ; Craig, 2003c) et l'expérience émotionnelle liée à la douleur (Hofbauer et al., 2001).

### 2.3.2. VOIES DESCENDANTES

L'activité des neurones de la corne dorsale, et donc la transmission des messages nociceptifs et non nociceptifs, est largement contrôlée au sein d'un même segment mais également par des fibres d'origine suprasegmentaire. Ce contrôle permet majoritairement d'atténuer un stimulus nociceptif afin de prévenir une douleur excessive. Cette voie inhibitrice a été découverte dans les années 1970 après stimulation électrique du tronc cérébral chez le rat (Reynolds, 1969 ; Mayer et al., 1971) et semble avoir une

prédominance ipsilatérale. De manière intéressante, en fonction de leur localisation superficielle ou profonde, les neurones de la corne dorsale ne semblent pas répondre de manière équivalente à la stimulation des structures suprasegmentaires (Rees and Roberts, 1993). Les contrôles descendants proviennent de nombreuses structures cérébrales (cortex, noyau réticulaire latéral, noyau du tractus solitaire, locus coeruleus, aire parabrachiale, hypothalamus latéral, noyau rouge, substance noire etc...) et font intervenir essentiellement la PAG, la région rostrale ventromédiale de la medulla (RVM), les systèmes sérotoninergiques et opioïdiques (Fields, 2004). Cependant, le locus coeruleus et les noyaux noradrénergiques A5 et A7 projettent directement vers la couche IIi de la corne dorsale (VanderHorst and Ulfhake, 2006), et jouent un rôle dans la modulation des messages nociceptifs dans les phénomènes d'hyperalgésie (Fields et al., 2006).

La PAG reçoit des projections directes du cortex cingulaire antérieur, du cortex insulaire, de l'hypothalamus et de l'amygdale (Fields et al., 2006). Son rôle est directement lié à la RVM et inversement. La PAG est composée de neurones synthétisant des enképhalines, des peptides (Substance P, CGRP) et du GABA (Beitz, 1982a). En revanche, la RVM reçoit principalement des afférences neurotensinergiques de la PAG et sérotoninergiques du raphé dorsal (Beitz, 1982b) et constitue le relais entre PAG et corne dorsale (Fields et al., 2006). La PAG et la RVM font intervenir les systèmes opioïdiques et peuvent être inhibées par microinjection locale de morphine (Yaksh and Rudy, 1978) via les récepteurs opioïdes mu- ( $\mu$ ), delta- ( $\delta$ ), kappa ( $\kappa$ ) et ORL1 (Fields, 2004). La RVM émet des prolongements directs vers la corne dorsale. Son action peut être postsynaptique sur les neurones de second ordre mais elle peut également influencer

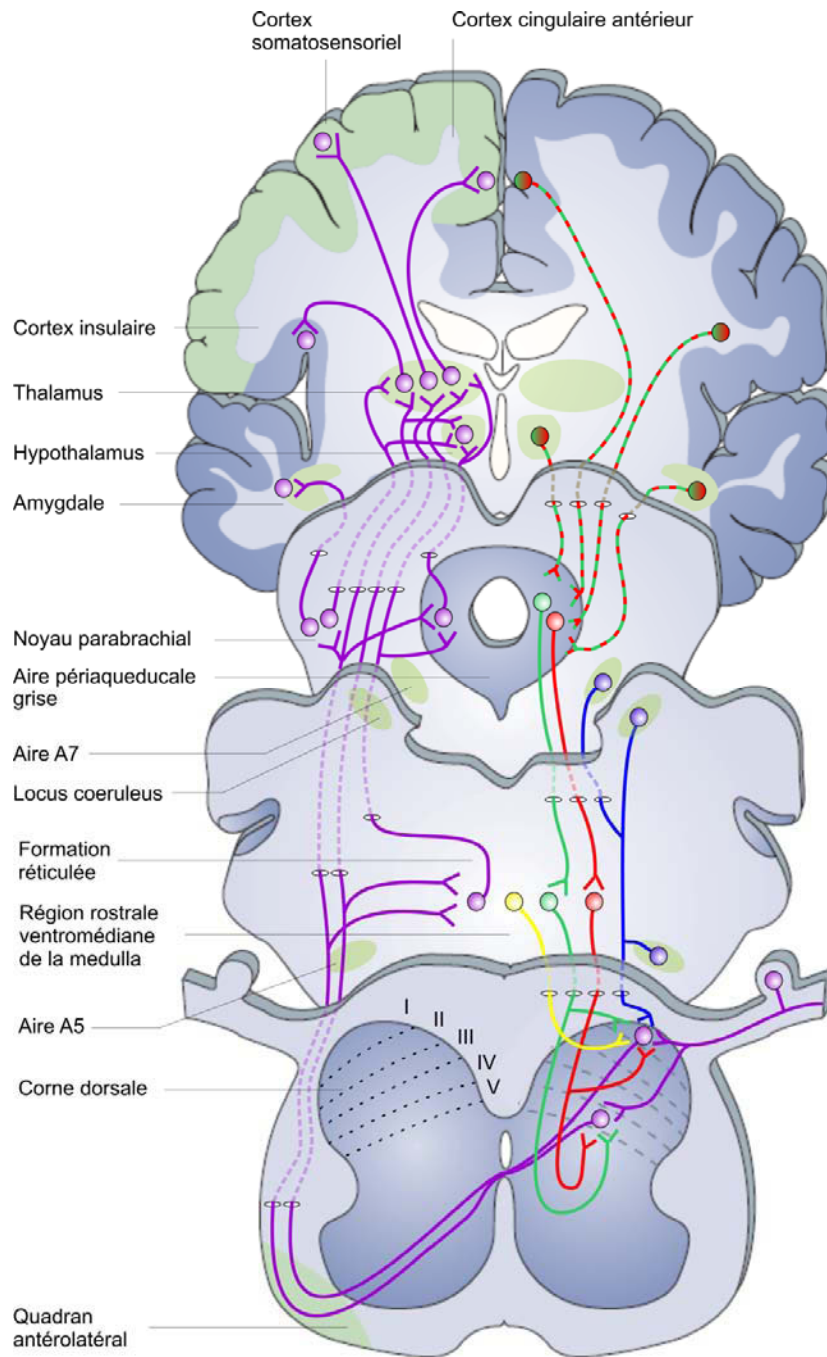


directement sur la transmission synaptique des afférences primaires (Suarez-Roca et al., 1992 ; Glaum et al., 1994 ; Grudt and Williams, 1994).

La RVM est composée de trois types neuronaux principaux : les neurones s'activant après stimulation nociceptive (cellules « ON »), ceux qui sont inhibés par une stimulation nociceptive (cellules « OFF ») et ceux ne modifiant pas leur activité électrique après stimulation nociceptive (cellules « NEUTRES ») (Fields, 2004). L'activation des cellules « OFF » produit un effet antinociceptif (Heinricher et al., 1994) alors que celle des cellules « ON » exerce un effet facilitateur de la nociception (Neubert et al., 2004). Les neurones « NEUTRES » semblent plus énigmatiques et sont encore mal connus. Cependant, une partie des cellules NEUTRES sont sérotoninergiques et représentent la seule source de sérotonine de la corne dorsale, argument en faveur d'un rôle important dans la nociception (Mason, 1997). Les terminaisons sérotoninergiques de la corne dorsale sont par ailleurs retrouvées dans les couches superficielles I et IIe (VanderHorst and Ulfhake, 2006). Les cellules ON et OFF projettent sur les couches I, II et V de la corne dorsale (Fields et al., 1995). Le mécanisme d'action de ces cellules sur les neurones de la corne dorsale est multiple. La stimulation de la RVM permet d'inhiber de manière monosynaptique les neurones de projection spinothalamiques par un mécanisme noradrénergique (Willis, Jr., 1988), ou de manière polysynaptique par l'activation intermédiaire de neurones opioïdrgiques (Fields et al., 2006). L'effet inhibiteur opioïdrgique observé dans la corne dorsale est cependant majoritaire dans la couche II (Duggan et al., 1976). Les prolongements issus de la RVM s'étendent du complexe sensitif du trijumeau jusqu'aux segments spinaux les plus caudaux et ont un champ récepteur immense, parfois couvrant la totalité du corps (Huisman et al., 1981), suggérant

un rôle de ces contrôles descendants dans la réponse globale corporelle aux stimulations périphériques nociceptives.

Les contrôles descendants peuvent être mis en jeu par des stimulations nociceptives ou contextuelles (émotions, attentions, stress, attentes, peurs) comme le montrent les modifications de perception de la douleur chez des sujets soumis ou non à des distractions (Tracey et al., 2002 ; Bantick et al., 2002). De plus, une stimulation nociceptive sur une partie donnée du corps est capable de moduler la douleur ressentie par une autre stimulation nociceptive effectuée sur une autre partie du corps (Le Bars and Willer, 2008). Ce phénomène, appelé « contrôle inhibiteur diffus induit par une stimulation nociceptive » (CIDN), est une boucle de régulation faisant nécessairement intervenir la corne dorsale de la moelle épinière (ou celle du complexe sensitif du trijumeau) et des centres supérieurs comme le sous-noyau réticulaire dorsal (SRD) (Villanueva et al., 1996), le noyau parabrachial (Lapirot et al., 2009) et le noyau hypothalamique A11 (Lapirot et al., 2011). Contrairement aux patients touchés par des lésions médullaires, les patients atteints de lésions thalamiques ne présentent pas de perturbation des CIDN, excluant donc la participation des voies spinothalamiques dans les CIDN (De Broucker et al., 1990) (Figure 12).



**Figure 12 : Voies ascendantes et descendantes de la nociception.** Les voies ascendantes sont constituées des faisceaux spinoréticulaires, spinomésencéphaliques et spinothalamiques (violet). Les neurones de projections de la couche I de la corne dorsale émettent des prolongements via le cordon antérolatéral vers la formation réticulée, le noyau parabrachial, la substance grise périaqueducale (PAG), le thalamus et l'hypothalamus. Les neurones de couche V émettent des prolongements vers la formation réticulée et le thalamus. Les voies descendantes facilitatrices (rouge) et inhibitrices (vert) mettent en jeu la PAG et la région rostrale ventromédiane de la medulla (RVM). Une voie sérotoninergique (jaune) provenant de la RVM et une voie noradrénergique (bleu) issue du tronc cérébral permettent également de contrôler l'activité des neurones des couches superficielles de la corne dorsale. (*adapté d'après Fields, 2004 et Millan, 1999*).

### 3. **PHYSIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DOULEUR**

#### 3.1. ACTIVATION DES FIBRES PERIPHERIQUES

Les fibres périphériques sont des neurones pseudo-unipolaires, possédant un corps cellulaire dans le ganglion de la racine dorsale spinale (ou le ganglion de Gasser pour les fibres trigéminales) et un axone dont les extrémités se situent en périphérie et dans la corne dorsale. Cette particularité anatomique permet donc à la cellule de distribuer les protéines synthétisées dans son corps cellulaire vers les deux extrémités de la fibre, celle-ci pouvant donc être activée au niveau périphérique et central. A l'inverse des neurones dont l'arbre dendritique se distingue biochimiquement des prolongements axonaux, les fibres afférentes expriment donc majoritairement les mêmes récepteurs à leurs deux extrémités (Basbaum et al., 2009). Les peptides comme la substance P ou le CGRP libérés par les fibres nociceptives permettent ainsi de moduler la transmission synaptique excitatrice par leur extrémité centrale, et de déclencher une vasodilatation ainsi qu'une extravasation des protéines plasmatiques par leur extrémité périphérique (Basbaum et al., 2009). Cependant, lors d'une inflammation périphérique, le récepteur thermosensible TRPV1 est surexprimé dans les DRG ainsi qu'au niveau des terminaisons périphériques, mais son niveau d'expression reste inchangé dans la corne dorsale, suggérant l'existence de mécanismes de transport protéiques complexes antérogrades vers l'une ou l'autre des extrémités des fibres afférentes (Ji et al., 2002b). La coexpression de récepteurs au niveau périphérique et central offre néanmoins une perspective intéressante, ces fibres pouvant être activées localement par différents ligands endogènes ou pharmacologiques.

##### 3.1.1. ACTIVATION MECANIQUE

Les fibres périphériques peuvent être activées par différents stimuli environnementaux, thermiques, mécaniques ou chimiques. L'activation mécanique des nocicepteurs est médiée par l'ouverture de canaux cationiques, vraisemblablement de la famille des « degenerin/epithelial Na<sup>+</sup> channel » (DEG/ENaC) (Chalfie, 2009). Parmi les candidats potentiels, les canaux ASICs sensibles aux protons ont longtemps été mis en avant comme étant responsables de la mécanosensation (Krishtal, 2003). Ces canaux sont exprimés par les fibres sensorielles spinales et trigéminales, incluant les fibres nociceptives de fin et moyen diamètres suggérant un rôle dans la nociception (Deval et al., 2010). Cependant, bien que l'implication des canaux ASICs dans la douleur soit parfaitement admise, le rôle de ces canaux dans la mécanosensation, au moins par une action directe, est controversé (Basbaum et al., 2009 ; Deval et al., 2010). Les récentes publications regroupant blocages pharmacologiques et délétions génétiques des canaux ASICs semblent indiquer un rôle indirect dans la mécanosensation, en lien avec des protéines partenaires comme les protéines de la famille des stomatines (Wetzel et al., 2007 ; Lingueglia, 2007) ou en combinaison de plusieurs isoformes (Geffeney and Goodman, 2012). Les canaux « transient receptor potential » (TRPs) ont également été proposés comme canaux responsables de la mécanosensation. Les canaux TRPV1, TRPV2, TRPV4 et TRPA1 répondent à des stimuli osmotiques ou à l'application mécanique d'une électrode (Liedtke and Friedman, 2003 ; Muraki et al., 2003 ; Rong et al., 2004 ; Kindt et al., 2007). Cependant, les résultats obtenus *in vivo* ou chez des animaux dont le gène codant pour chaque canal a été génétiquement supprimé semblent indiquer que les canaux TRPs ne seraient pas directement responsables de la mécanosensation mais joueraient un rôle important dans les voies de signalisations post-transductionnelles et l'hypersensibilité mécanique après lésion tissulaire (Geffeney and Goodman, 2012). Néanmoins, le rôle des récepteurs TRPV1 dans l'hypersensibilité mécanique reste controversé. Il est en effet

surprenant de constater que les souris dont le gène codant pour ce récepteur a été supprimé, ne présentent pas d'altération de leurs sensibilités mécaniques physiologique ou pathologique (Caterina et al., 2000) alors que l'application ou l'injection sous-cutanée de capsaïcine, agoniste spécifique de ce récepteur, induit une hypersensibilité mécanique chez l'homme et l'animal (Simone et al., 1989 ; LaMotte et al., 1991 ; Koltzenburg et al., 1992 ; Caterina et al., 2000 ; Joshi et al., 2006 ; Binshtok et al., 2007 ; Kim et al., 2007). De plus, d'autres travaux ont reporté une diminution de l'hypersensibilité mécanique chez des animaux n'exprimant plus le récepteur TRPV1 après lésion neuropathique périphérique (Kim et al., 2012b). Une des hypothèses possibles pouvant expliquer ces différences pourrait mettre en jeu des mécanismes de compensation moléculaire ou cellulaire, phénomène potentiellement observé lors de l'utilisation d'animaux transgéniques (Lariviere et al., 2001).

Une dernière famille de canaux a également été récemment découverte et pourrait représenter les premiers médiateurs de la mécanosensibilité. Ces canaux appelés « Piezo » (du Grec « πίεση » (píesi) signifiant « pression ») par l'équipe de Patapoutian sont des canaux cationiques non sélectifs dont l'ouverture du pore s'effectue par pression mécanique d'une  $P_{50}$  (pression permettant l'ouverture du canal de 50% par rapport à son ouverture maximale) d'environ 30 mm Hg (Coste et al., 2012). Ces canaux représentent par ailleurs le plus gros complexe protéique membranaire identifié à ce jour (Xiao and Xu, 2010 ; Coste et al., 2012). Bien que le rôle des canaux Piezo dans la mécanosensation et la nociception reste encore à déterminer, les récentes publications apparues au cours de l'année 2012 sont particulièrement encourageantes (Coste et al., 2012 ; Dubin et al., 2012 ; Kim et al., 2012a).

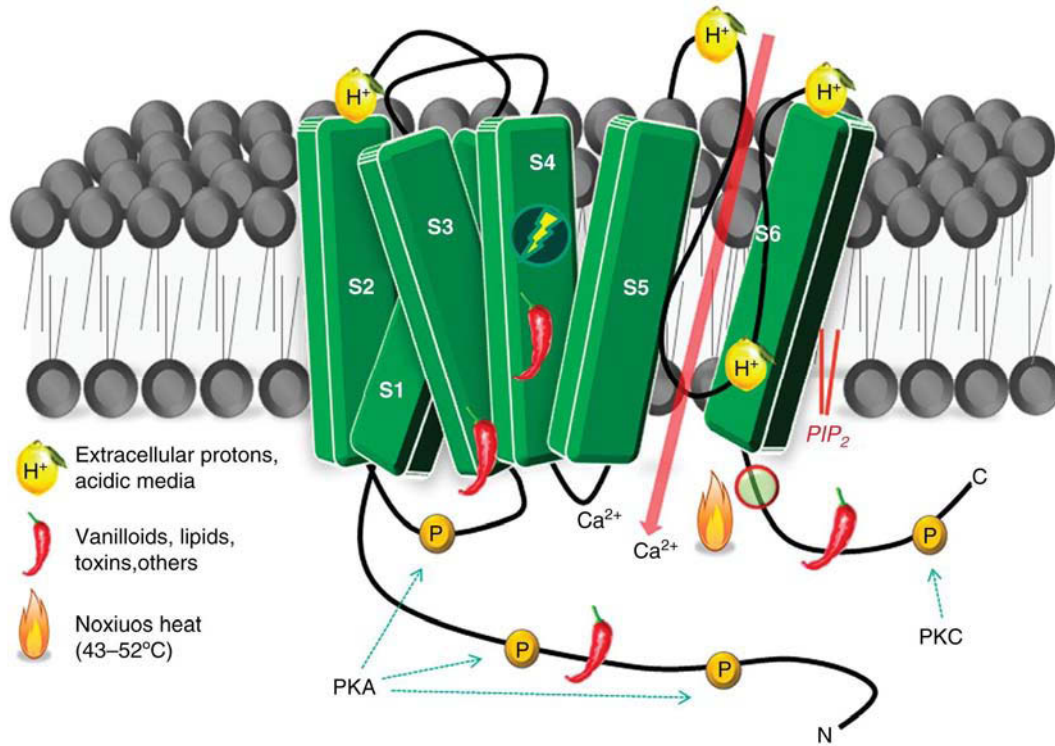
Toutefois, de nombreuses hypothèses quant à la participation ou non de canaux dans la mécanosensibilité ont été élaborées d'après des études *in vitro* ou d'après des résultats

obtenus chez des animaux transgéniques dont un seul gène a été supprimé. Il est donc envisageable de considérer que les résultats obtenus dans ces études ne sont pas représentatifs d'une réalité physiologique ou résultent de l'implication de systèmes de compensations, vraisemblablement complexes et performants. Une récente publication ouvre cependant une perspective encourageante, se basant sur des enregistrements intracellulaires de neurones ganglionnaires des racines dorsales spinales *in vivo*, et donc plus proche de la réalité physiologique (Ma et al., 2010). L'enregistrement de ces neurones suite à une stimulation périphérique mécanique après blocage pharmacologique d'un canal particulier pourrait apporter une meilleure compréhension des protéines responsables de la mécanosensation. Aucune étude utilisant cette approche n'a cependant été réalisée jusqu'à présent.

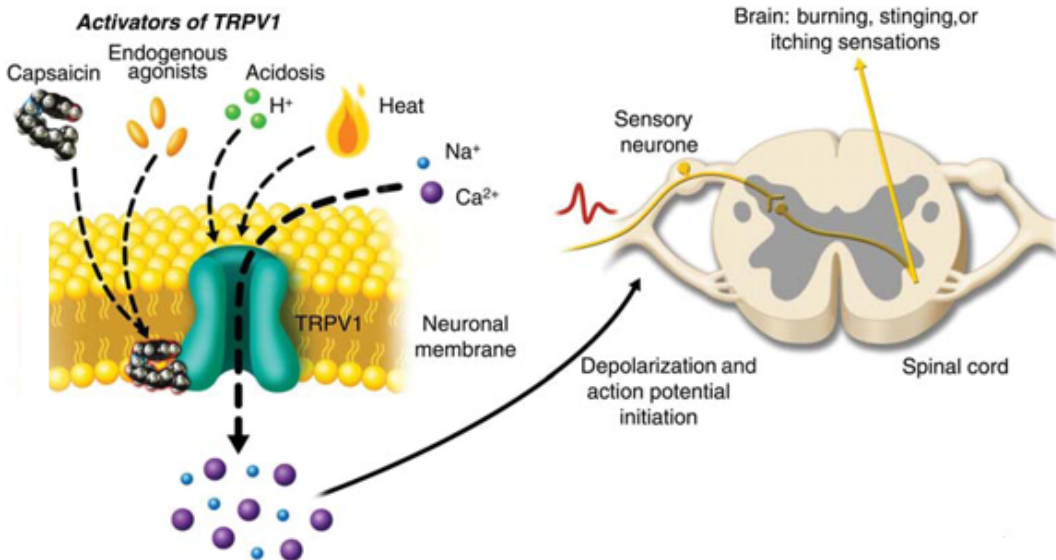
### 3.1.2. ACTIVATION THERMIQUE

La sensibilité des fibres périphériques aux stimulations thermiques a été largement étudiée et fait suite à l'activation de récepteurs de la superfamille des TRPs. En 2003, Patapoutian et ses collaborateurs publient une revue décrivant précisément les récepteurs impliqués dans la thermosensation, les récepteurs TRPA1, TRPM8, TRPV4, TRPV3, TRPV1 et TRPV2 répondant respectivement aux températures des plus froides aux plus chaudes (Patapoutian et al., 2003). Parmi ces récepteurs, le plus étudié est sans conteste le récepteur TRPV1, sensible aux températures supérieures à 43°C (seuil nociceptif des températures chaudes) et à la capsaïcine (molécule présente dans le piment rouge et responsable de la sensation de brûlure). Ce récepteur est un canal cationique non-sélectif (mais hautement perméable au calcium) pouvant être activé par des températures supérieures à 43°C ou une acidose (pH faible) et peut être potentialisé par de nombreux facteurs comme la bradykinine, les lipides et prostaglandines, les protéines kinases A et C

a



b



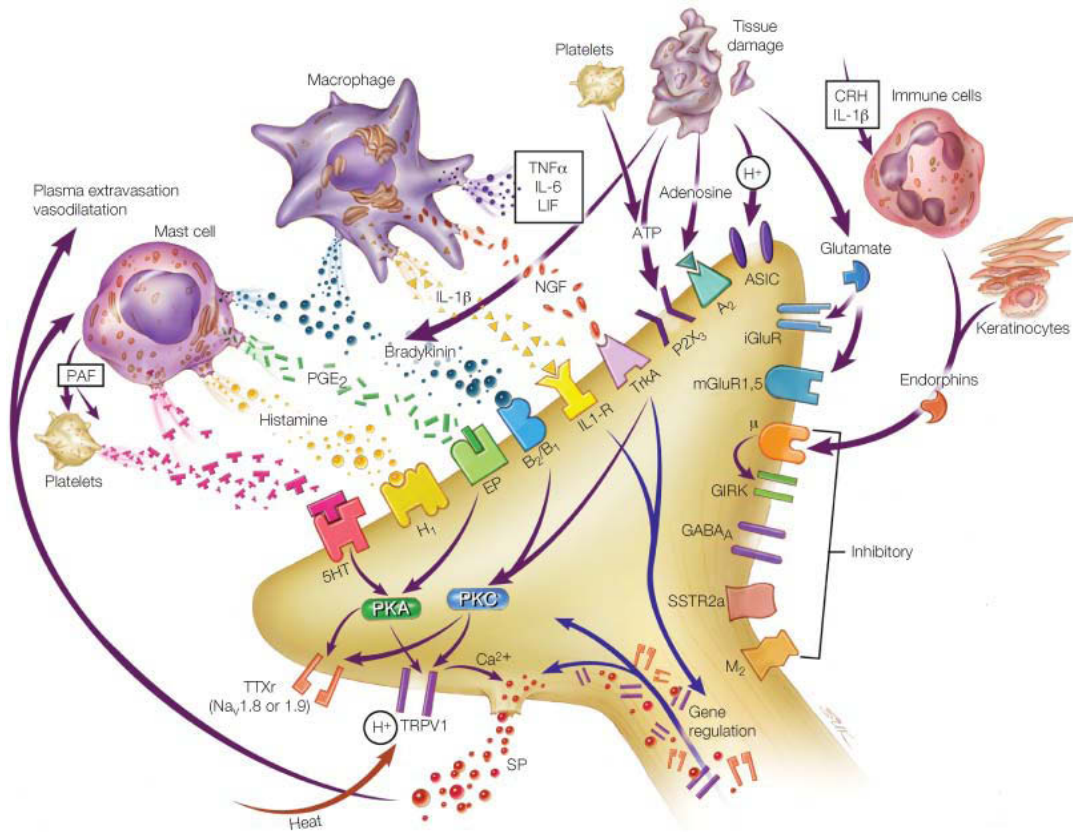
**Figure 13 : Le récepteur TRPV1.** a. Le récepteur TRPV1 est sensible aux protons, aux vanilloïdes et à la température. Il peut être modulé par les protéines kinases A ou C. (*adapté d'après Szallasi and Sheta, 2012*). b. Une fois le pore du canal ouvert, l'entrée de protons et l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire entraîne la génération d'un potentiel d'action se propageant tout au long de la fibre, et active la voie nociceptive. (*adapté d'après Anand and Bley, 2011*).



et l'ATP (Dhaka et al., 2006) (Figure 13). Dans la corne dorsale, il est retrouvé principalement dans les couches superficielles I, IIe et la partie médiane de la III, et presque exclusivement (90%) dans les fibres C peptidergiques (positives à la substance P et au CGRP) et non peptidergiques positives à l'IB4 (Caterina et al., 1997 ; Tominaga et al., 1998). Cette observation anatomique suggérant un rôle des récepteurs TRPV1 dans les voies de la nociception a été très largement confirmée par des études portant sur les douleurs inflammatoires induites par adjuvant complet de Freund (CFA), huile de moutarde ou caragénine (Dhaka et al., 2006).

### 3.1.3. ACTIVATION CHIMIQUE

Les fibres périphériques peuvent être activées par de nombreux médiateurs chimiques. Lors d'une inflammation par exemple, les mastocytes, macrophages et cellules immunitaires vont libérer une multitude de substances formant la « soupe inflammatoire » (Figure 14). Ces médiateurs, incluant bradykinine, prostaglandines, leucotriennes, sérotonine, histamine, substance P, thromboxanes, facteurs d'activation plaquettaire, ATP, protons, radicaux libres, cytokines et neurotrophines vont agir directement ou indirectement sur les récepteurs situés sur les terminaisons périphériques (Meyer et al., 2006). Cette inflammation peut entraîner une hyperalgésie et/ou une allodynie dans le territoire inflammé (hyperalgésie/allodynie primaire) ou dans un territoire sain à distance du site de lésion (hyperalgésie/allodynie secondaire), c'est-à-dire un décalage vers la gauche de la courbe stimulus/réponse relevant de la magnitude de la douleur en fonction de l'intensité du stimulus (Treede and Magerl, 2000). Les mécanismes sous-tendant l'hyperalgésie/allodynie primaire et secondaire sont très différents et font intervenir des étages périphériques, spinaux ou supraspinaux.



**Figure 14 : Médiateurs inflammatoires.** Lors d’une inflammation, de nombreux médiateurs sont libérés par les mastocytes, macrophages, plaquettes, kératinocytes et cellules immunitaires. Ces agents vont se fixer sur les récepteurs situés au niveau des terminaisons périphériques et jouer directement ou indirectement sur la sensibilité de la fibre. ASIC, acid-sensing ion channel; CRH, corticotrophin-releasing hormone; G<sub>IRK</sub>, G-protein-coupled inward rectifying potassium channel; iGluR, ionotropic glutamate receptor; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 $\beta$ ; IL-6, interleukin-6; mGluR, metabotropic glutamate receptor; NGF, nerve growth factor; PAF, platelet-activating factor; PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; SSTR2A, somatostatin receptor 2A; TNF- $\alpha$ , tumour necrosis factor- $\alpha$ ; TrkA, tyrosine kinase receptor A; TTXr, tetrodotoxin-resistant sodium channel;  $\mu$ , mu-opioid receptor; M<sub>2</sub> muscarinic receptor; 5HT, serotonin; LIF, leukemia inhibitory factor. (*adapté d’après Meyer et al., 2006*).

### 3.2. HYPERSENSIBILITE

#### 3.2.1. SENSIBILISATION DU NOCICEPTEUR

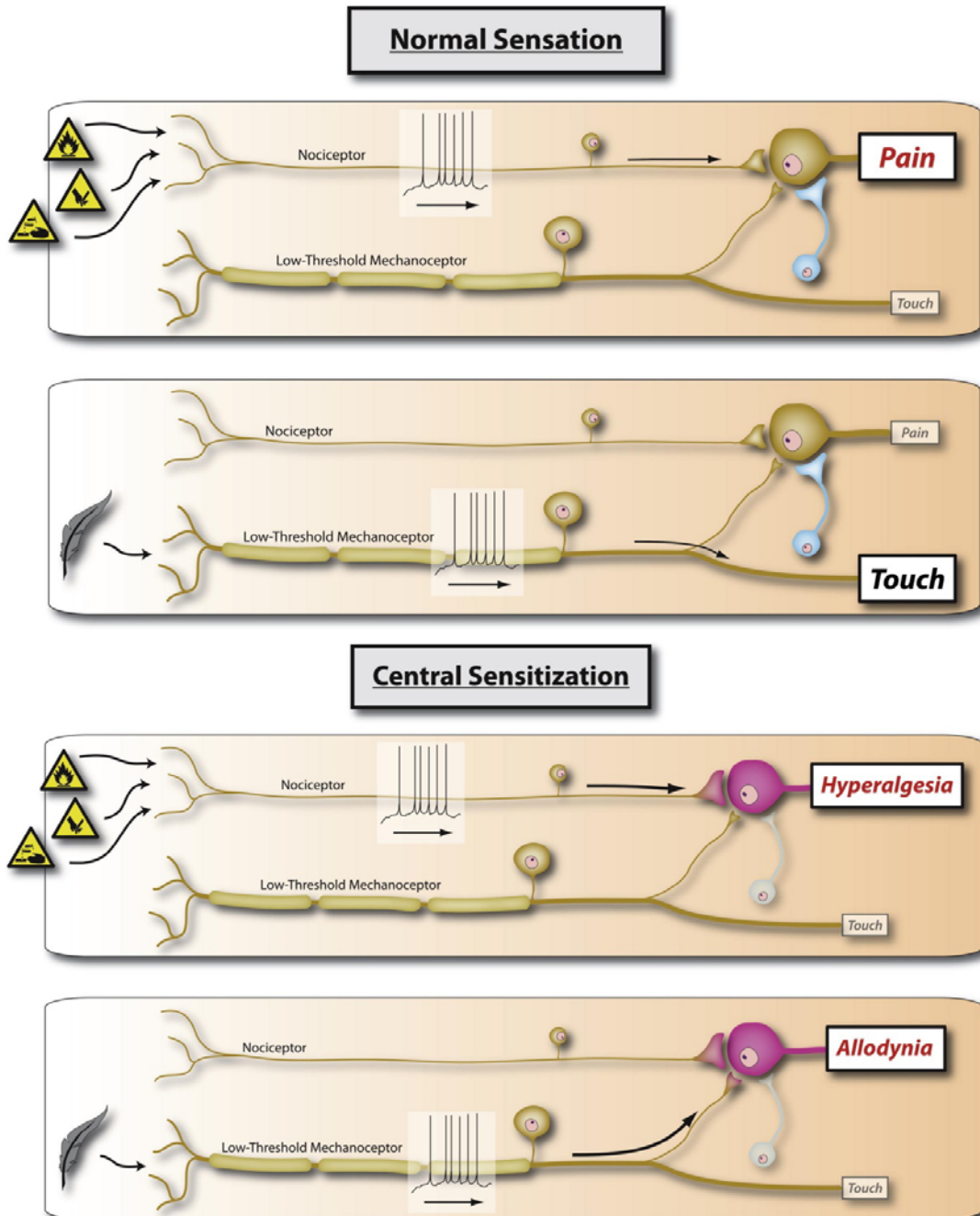
Il est communément admis que l'hyperalgésie/allodynie primaire résulte d'une sensibilisation périphérique des fibres de type A et C dont le seuil d'activation est considérablement réduit. Cependant, ce postulat réside sur le fait que cette sensibilisation périphérique seule permet d'expliquer les symptômes liés à l'hyperalgésie primaire, et n'exclut donc pas totalement le rôle potentiel d'une sensibilisation centrale. Chez le singe anesthésié, l'application d'une brûlure au niveau de la peau entraîne une augmentation des réponses à des stimuli thermiques médiés par les fibres A dans les territoires glabres (Meyer and Campbell, 1981) et C dans les territoires pileux (LaMotte et al., 1983). Dans le cas d'une allodynie mécanique, ce ne sont pas les fibres A et C mécanosensibles qui sont altérées, mais un contingent de fibres A $\delta$ , mécanoinsensibles dans des conditions physiologiques, dont le seuil d'activation est réduit après inflammation (Thalhammer and LaMotte, 1982 ; Campbell et al., 1988 ; Meyer et al., 2006). L'hyperalgésie mécanique primaire quant à elle, résulte d'une augmentation des réponses des fibres A et C mécanosensibles aux seuils nociceptifs, d'une activité spontanée des nocicepteurs et d'un élargissement du champ récepteur de ces fibres (Andrew and Greenspan, 1999).

#### 3.2.2. SENSIBILISATION CENTRALE

L'hyperalgésie/allodynie secondaire se distingue de l'hyperalgésie/allodynie primaire autant par sa symptomatologie que par sa mécanistique. En effet, dans les douleurs postopératoires, comme dans de nombreux autres types de douleur, apparaît une hyperalgésie et une allodynie secondaire uniquement mécanique, sans modification des réponses aux stimuli thermiques (Ali et al., 1996 ; Pogatzki et al., 2000). Les mécanismes

responsables de l'hyperalgésie/allodynie secondaire, communément liés au phénomène de sensibilisation centrale, illustrent la complexe plasticité du système nerveux central ainsi que ses capacités d'adaptation à une perturbation homéostatique (Figure 15). L'hyperalgésie/allodynie secondaire ne semble pas être la conséquence d'une hypersensibilité périphérique. Les fibres périphériques permettraient cependant de maintenir les neurones centraux dans un état sensibilisé, en émettant des potentiels d'action spontanés (Meyer et al., 2006). De plus, le champ récepteur de ces fibres est souvent plus restreint que le territoire d'hyperalgésie secondaire, suggérant une cause plus centrale que périphérique (LaMotte et al., 1991). Contrairement à l'hyperalgésie primaire, aucune hypersensibilité des nocicepteurs périphériques n'a pu être démontrée dans le territoire d'hyperalgésie secondaire. Ainsi, une inflammation réalisée sur une partie du champs récepteur d'une fibre nociceptive ne modifie pas la sensibilité thermique ou mécanique de l'autre partie du champs récepteur de cette même fibre (Schmelz et al., 1996).

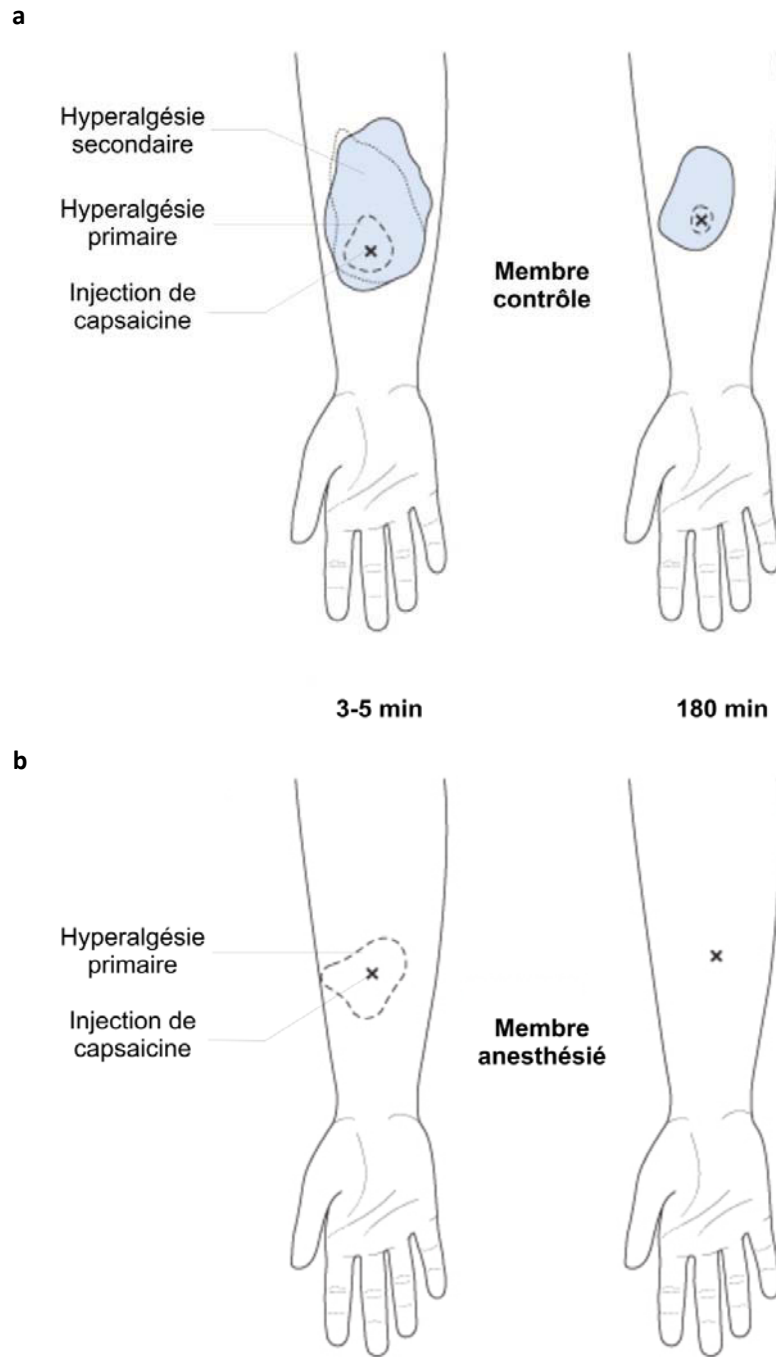
De nombreux mécanismes conduisant à l'hyperalgésie/allodynie secondaire ont été mis en évidence grâce à l'utilisation de la capsaïcine. En effet, cette molécule utilisable autant chez l'homme que l'animal, reproduit de manière surprenante les symptômes observés lors de l'hyperalgésie/allodynie (Treede and Magerl, 2000). Ainsi, sans lésion tissulaire invasive (LaMotte et al., 1991), la capsaïcine provoque l'apparition d'une hyperalgésie primaire thermique et mécanique au niveau du site d'injection, et une large zone d'hyperalgésie secondaire, uniquement mécanique, à distance du site d'injection (Simone et al., 1989 ; Ali et al., 1996). De plus, l'hyperalgésie secondaire induite par la capsaïcine entraîne une sensibilisation des neurones centraux sans modification de la sensibilité des fibres périphériques (Sang et al., 1996 ; Treede and Magerl, 2000). Enfin, les expériences réalisées par l'équipe de LaMotte (1991) chez l'homme, illustrent



**Figure 15 : Sensibilisation centrale.** a. Sensations normales : la douleur et le tact sont médiés par deux voies parallèles faisant intervenir des fibres afférentes activées soit à haut seuil, soit à bas seuil. Un contrôle inhibiteur (interneurone bleu) activé lors de la stimulation de fibres non nociceptives permet de prévenir l'activation de neurones nociceptifs et de ne conserver qu'une sensation tactile. b. Sensations anormales : lors d'une sensibilisation centrale, les contrôles inhibiteurs (interneurone gris) s'exerçant sur les neurones nociceptifs sont perturbés. Une stimulation nociceptive entraîne une activation exarçerbée des neurones nociceptifs (hyperalgésie). En l'absence de contrôles inhibiteurs adéquats (interneurone gris), une stimulation non nociceptive entraîne l'activation de neurones nociceptifs, réalisant un court-circuit entre la voie de la douleur et celle du toucher (allodynie) (*adapté d'après Woolf, 2011*).

particulièrement bien le caractère central de l'hyperalgésie/allodynie secondaire, et l'importance des fibres périphériques lors de l'hyperalgésie primaire. En effet, dans cette étude, la capsaïcine (100µg / 10 µl) était injectée en sous-cutanée dans la partie ventrale de l'avant bras, prétraitée ou non dans sa partie proximale avec un anesthésique local (1% lidocaïne) épargnant l'activation de neurones centraux. L'apparition d'une rougeur et la sensation douloureuse mécanique était alors mesurée 5 minutes (hyperalgésie primaire) et 180 minutes (hyperalgésie secondaire) après injection de capsaïcine. Dans le groupe de sujet contrôles, l'injection de capsaïcine provoquait immédiatement une rougeur « en tâche d'huile » dans le territoire d'hyperalgésie primaire ainsi qu'une hyperalgésie secondaire s'étendant au-delà de cette région. De manière intéressante, le territoire cutané correspondant au site d'injection présentait une hyposensibilité mécanique, traduisant une hausse du seuil d'activation des fibres périphériques à cet endroit. A l'inverse de l'hyperalgésie primaire, l'hyperalgésie secondaire perdurait au-delà de 180 minutes. Dans le groupe de patients prétraités avec l'anesthésique local, seule l'hyperalgésie primaire a pu être observée, caractérisant ainsi le rôle majeur d'une sensibilisation centrale dans les phénomènes d'hyperalgésie/allodynie secondaire (Figure 16).

Le type d'hypersensibilité mécanique observée dans la zone d'hyperalgésie secondaire peut être caractérisé en fonction du stimulus appliqué. En effet, une stimulation mécanique dynamique réalisée par un léger frottement peut entraîner une allodynie mécanique dynamique alors qu'une pression légère est susceptible d'entraîner une allodynie mécanique statique. Cette distinction prend son importance lorsque l'on s'intéresse aux mécanismes mis en jeu lors de ces deux symptômes. En effet, les fibres périphériques et les réseaux neuronaux activés lors de l'allodynie mécanique statique ou dynamique sont vraisemblablement différents. Par ailleurs, l'allodynie dynamique induite par injection de capsaïcine s'étend entre une et deux heures alors que l'allodynie statique



**Figure 16 : Rôle de la sensibilisation centrale dans l'hyperalgésie secondaire. a.** La capsaïcine injectée en sous-cutanée induit une hyperalgésie primaire (zone transparente, trait pointillé grossier) et secondaire (zone bleue). Seule l'hyperalgésie secondaire statique (trait plein) et dynamique (trait pointillé fin) perdure au-delà de 180 minutes. **b.** Lorsque la transmission nerveuse entre les fibres périphériques et les neurones centraux est inhibée, l'hyperalgésie secondaire est absente, traduisant un rôle majeur de la sensibilisation centrale dans les phénomènes d'hyperalgésie secondaire. (adapté d'après Meyer et al., 2006).

dans ces mêmes conditions perdure au-delà de douze heures (LaMotte et al., 1991). Ces deux types d'allodynie semblent être véhiculées par des fibres non-nociceptives, myélinisées de gros calibres pour l'allodynie mécanique dynamique, et faiblement myélinisées ou amyéliniques pour l'allodynie mécanique statique (LaMotte et al., 1991 ; Koltzenburg et al., 1992 ; Torebjork et al., 1992 ; Field et al., 1999a ; Field et al., 1999b ; Seal et al., 2009). Un blocage par compression de la transmission nerveuse des fibres myélinisées (touchant préférentiellement les fibres A $\beta$ ) chez l'homme permet de supprimer l'allodynie mécanique dynamique alors que l'allodynie mécanique statique reste inchangée (Ochoa and Yarnitsky, 1993). Par ailleurs, les patients souffrant de neuropathie sévère des fibres de gros calibre ne développent qu'une allodynie de type statique après injection de capsaïcine (Treede and Cole, 1993). Enfin, la destruction des fibres sensibles à la capsaïcine ne supprime pas l'hypersensibilité mécanique statique (Fuchs et al., 2000), confirmant l'hypothèse d'une innervation de type A $\delta$  ou C insensibles à la capsaïcine liée à l'allodynie mécanique de type statique. Les récents résultats obtenus chez la souris confirment également l'importance des fibres C non nociceptives dans l'allodynie mécanique statique (Seal et al., 2009). En effet, la délétion du gène codant pour le transporteur VGLUT3 spécifique des fibres C non nociceptives permet de réduire de manière significative, mais pas totale, l'hypersensibilité mécanique dans des modèles de douleur inflammatoires et neuropathiques. L'allodynie mécanique statique semble donc être dépendante à la fois des fibres A $\delta$  non nociceptives mais aussi des fibres C non nociceptives.

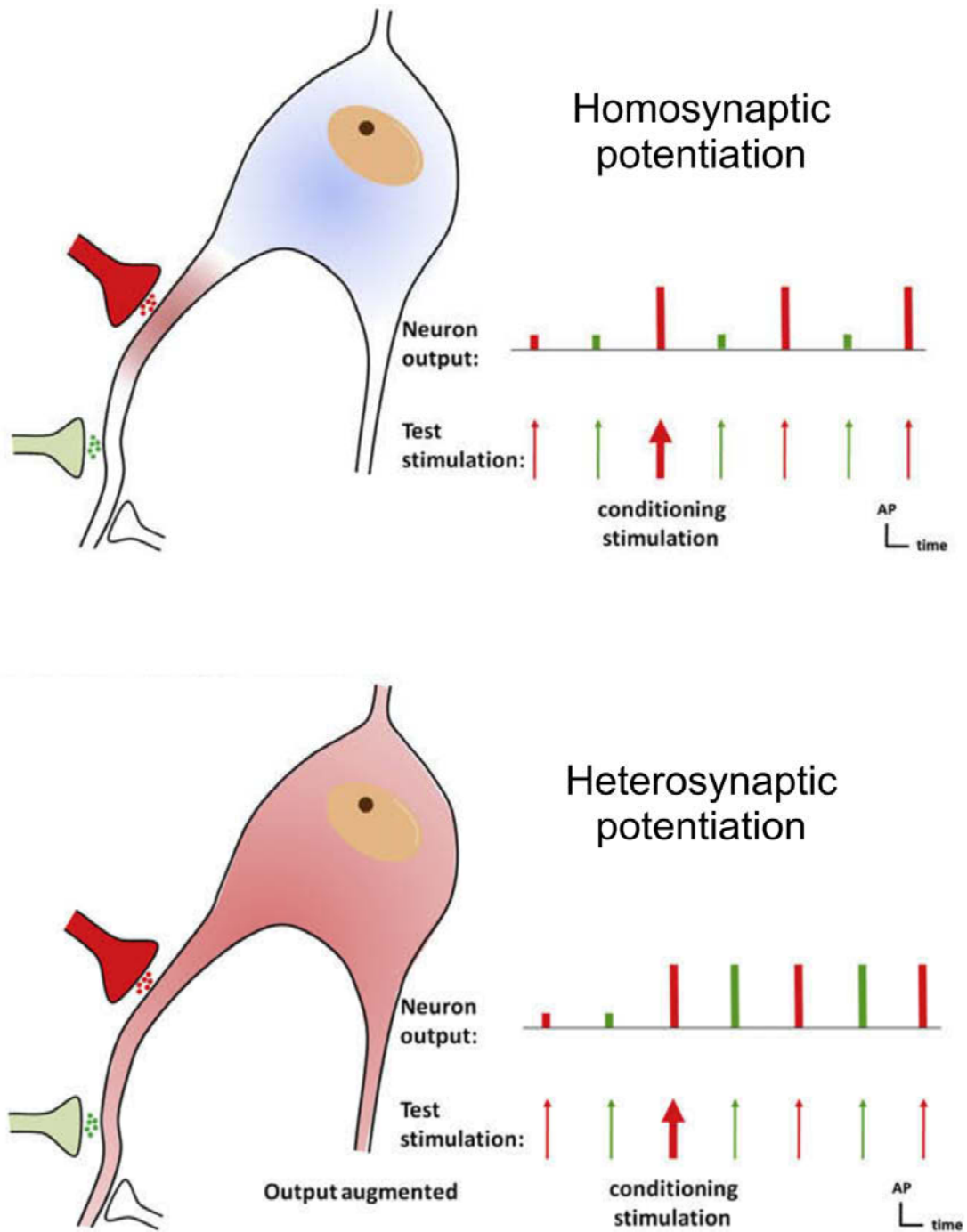
De manière intéressante, lorsque le territoire d'hyperalgésie primaire est anesthésié ou refroidi, l'hypersensibilité mécanique dynamique disparaît alors que sa composante statique perdure (LaMotte et al., 1991). Cette dernière observation suggère un fait intéressant : l'allodynie mécanique statique, à l'inverse de l'allodynie mécanique



dynamique, semble indépendante des décharges ectopiques d'origine périphérique, lui conférant ainsi un mécanisme essentiellement central.

### 3.3. MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES SEGMENTAIRES

Le mécanisme de sensibilisation centrale évoqué en 1983 par Woolf est aujourd'hui considéré comme la principale cause de l'hyperalgésie secondaire (Woolf, 2011). Cette forme de plasticité synaptique à long terme (LTP) permet aux neurones centraux de la corne dorsale de transmettre un message non nociceptif en message douloureux vers les centres supérieurs du cerveau. De nombreuses questions se posent alors. Comment peut-on expliquer l'apparition d'une zone d'hyperalgésie secondaire dans un territoire périphérique sain ? Comment une stimulation non nociceptive peut-elle entraîner une douleur, alors que les voies tactiles et nociceptives font intervenir des fibres périphériques et des réseaux neuronaux distincts ? Pourquoi des stimulations répétées d'intensité fixe augmente peut à peu la douleur (phénomène de Wind-Up) ? Comment une douleur peut-elle perdurer même après réparation du tissu lésé ? De nombreuses hypothèses ont été élaborées afin d'expliquer les mécanismes d'apparition et de maintien de cette sensibilisation centrale. Ces mécanismes font intervenir nécessairement une augmentation du calcium intracellulaire d'un neurone de deuxième ordre (par influx calcique via des récepteurs ionotropiques ou des canaux calciques voltage-dépendants, libération des stocks intracellulaires après activation de récepteurs métabotropiques ou récepteurs à tyrosine kinase) et de nombreuses protéines comme les récepteurs N-méthyl-D-aspartic acid (NMDA), amino-3-hydroxyl-5-méthyl-4-isoxazole (AMPA), les récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR), les récepteurs NK1 à la substance P, le BDNF et son récepteur TrkB, la « calcium/calmodulin-dependent kinase II » (CaMKII), les protéines kinases A et C, le proto-oncogène tyrosine kinase src, les « extracellular signal-

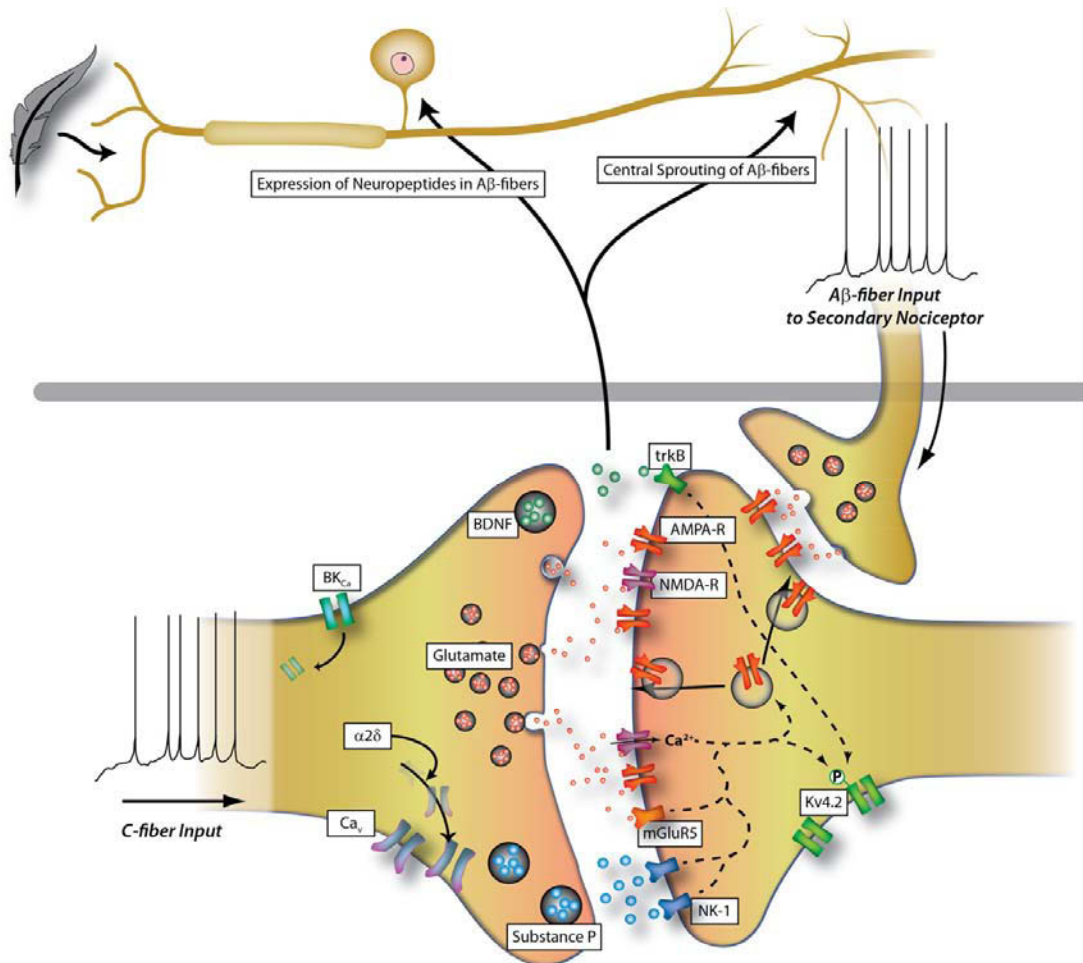


**Figure 17 : Mécanismes de la sensibilisation centrale. a. Potentialisation homosynaptique.** Un stimulus conditionnant réalisé sur une synapse (rouge) entraîne une hyperexcitabilité de cette même synapse sans modifier les synapses avoisinantes (vert). **b. Potentialisation hétérosynaptique.** Un stimulus conditionnant sur une synapse (rouge) modifie l'excitabilité de cette même synapse et d'autres synapses situées à distance (vert). (adapté d'après Latremoliere and Woolf, 2009).

regulated protein kinase » (ERK), les « cAMP-response-element-binding protein » (CREB) et de nombreux canaux ioniques comme le canal potassique voltage-dépendant Kv4.2 ou le canal calcique voltage dépendant Cav1.2 (von Hehn et al., 2012). Selon les schémas proposés, la sensibilisation centrale observée dans la corne dorsale résulte d'une potentialisation homosynaptique ou hétérosynaptique. Dans le premier cas (potentialisation homosynaptique), les mécanismes mis en jeu font intervenir la plasticité intrinsèque du neurone postsynaptique entraînant une hyperexcitabilité d'une même synapse après un stimulus conditionnant. Cette plasticité est communément appelée LTP et serait plutôt liée à l'hyperalgésie primaire (Latremoliere and Woolf, 2009). Dans la deuxième situation (potentialisation hétérosynaptique), l'activation d'une synapse donnée par un stimulus conditionnant va être capable de modifier l'excitabilité d'une autre synapse se situant à distance de la première. Ici, la plasticité synaptique mis en jeu ne concerne plus exclusivement un neurone postsynaptique, mais peut modifier l'ensemble d'une ou de plusieurs voies polysynaptiques (Latremoliere and Woolf, 2009) (Figure 17).

### 3.3.1. MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES– THEORIE DU « SPROUTING »

Cette hypothèse, farouchement défendue par Woolf, repose sur une plasticité des fibres non nociceptives au niveau de leurs terminaisons centrales, après lésion nerveuse périphérique. Dans ce modèle, les fibres A $\beta$ , normalement localisées dans les couches profondes de la corne dorsale, émettraient des prolongements sur l'ensemble des couches superficielles et profondes, réalisant ainsi une potentialisation hétérosynaptique (Figure 18). Cette théorie reposant sur une analyse anatomique des fibres myélinisées en condition neuropathique (Woolf et al., 1992) est cependant remis en cause notamment par les travaux de l'équipe de Todd suggérant que les fibres observées par Woolf après lésion



**Figure 18 : Hypothèse du « sprouting ».** Dans ce schéma, les fibres A $\beta$  émettent des prolongements vers les neurones nociceptifs de la couche I après atteinte nerveuse périphérique et réalisent ainsi une potentialisation hétérosynaptique. Une potentialisation homosynaptique permettrait également à ces fibres d'exprimer des neuropeptides permettant ainsi d'activer les voies de la nociception. (*adapté d'après von Hehn et al., 2012*).

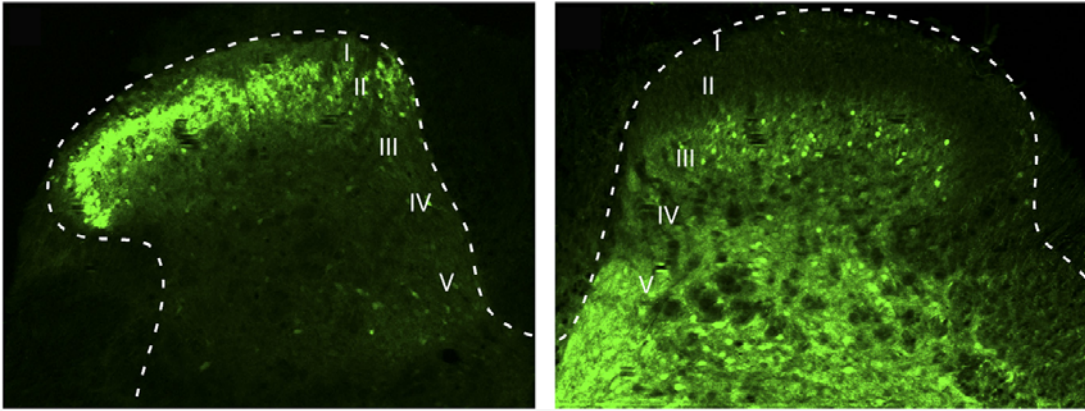
nerveuses pourraient être amyéliniques (Shehab et al., 2003). De plus, l'analyse des terminaisons centrales des

fibres myélinisées observées après injection intraaxonale d'un traceur rétrograde après lésion nerveuse périphérique démontre l'absence de marquage dans les couches situées plus dorsalement que la couche IIi (Hughes et al., 2003). Il a également été suggéré que les fibres A $\beta$  ne synthétisant pas de neuropeptides à l'état physiologique, exprimeraient la substance P (Neumann et al., 1996 ; Malcangio et al., 2000) et le CGRP (Nitzan-Luques et al., 2011) après inflammation ou lésion nerveuse périphérique. Cependant, cette hypothèse de potentialisation homosynaptique fut à nouveau remise en question par les travaux de l'équipe de Todd démontrant que la substance P ne serait pas impliquée dans l'hypersensibilité tactile dans des modèles de douleur neuropathiques (Hughes et al., 2007). L'implication des fibres A $\beta$  dans les mécanismes de sensibilisation centrale ne semble donc pas résulter d'un accès monosynaptique de ces fibres vers les neurones nociceptifs de la couche I ou les neurones exprimant le récepteur NK1 de la couche III, mais serait plutôt polysynaptique faisant suite à une perturbation des contrôles inhibiteurs segmentaires. En effet, les neurones de la couche I ne répondent pas à des stimulations électriques des fibres A $\beta$  dans les conditions physiologiques, mais se mettent à émettre des potentiels d'action et à exprimer le marqueur d'activité Fos lorsque les contrôles inhibiteurs GABAergiques et/ou glycinergiques sont bloqués par la bicuculline et/ou la strychnine (Torsney and MacDermott, 2006 ; Miraucourt et al., 2007 ; Miraucourt et al., 2009).

### 3.3.2. DESINHIBITION SEGMENTAIRE

L'hypothèse d'une désinhibition comme mécanisme pouvant expliquer la sensibilisation centrale est liée à une perturbation de la balance entre courants excitateurs

et inhibiteurs s'exerçant au niveau segmentaire. La transmission du message véhiculé par les fibres périphériques, qu'il soit nociceptif ou non, est effectué au niveau de la corne dorsale sur des neurones de second ordre. Le principal et indispensable neuromédiateur mis en jeu, le glutamate, active des récepteurs canaux postsynaptiques de type AMPA et kainate, entraînant l'apparition d'un potentiel postsynaptique excitateur (PPSE) rapide et ne durant que quelques millisecondes (Yoshimura and Jessell, 1990 ; Li et al., 1999b). Les récepteurs ionotropiques glutamatergiques NMDA également localisés au niveau de ces synapses, ne participent que peu à la transmission monosynaptique car leur canal est bloqué de manière tonique par du magnésium  $Mg^{2+}$  extracellulaire (Mayer et al., 1984). De manière intéressante, les neurones de la corne dorsale activés monosynaptiquement par les fibres afférentes, reçoivent immédiatement un rétrocontrôle négatif disynaptique (Yoshimura and Nishi, 1995). Le rapide potentiel postsynaptique inhibiteur (PPSI) qui en résulte peut être dû à une libération vésiculaire de GABA ou de glycine sur les récepteurs ionotropiques postsynaptiques de type  $GABA_A$  ou GlyR. L'activation de ces récepteurs canaux entraîne l'entrée d'ions chlorure dans l'espace intracellulaire et donc une hyperpolarisation de la membrane du neurone. Il est intéressant de remarquer que la localisation des interneurones GABAergiques et glycinergiques au sein de la corne dorsale est sensiblement différente. En effet, les neurones GABAergiques sont principalement localisés dans les couches II et III alors que les neurones glycinergiques se retrouvent dans les couches plus profondes III à V ainsi que dans la couche I (Figure 19). Le rôle de cette dichotomie anatomique n'a jamais été mis à jour, bien qu'il ait été suggéré que l'inhibition GABAergique serait impliquée dans l'allodynie mécanique statique alors que l'inhibition glycinergique serait impliquée dans l'allodynie mécanique dynamique (Miraucourt et al., 2009). Les récepteurs métabotropiques de type  $GABA_B$  permettent également un rétrocontrôle négatif, avec un PPSI plus lent et plus long, par

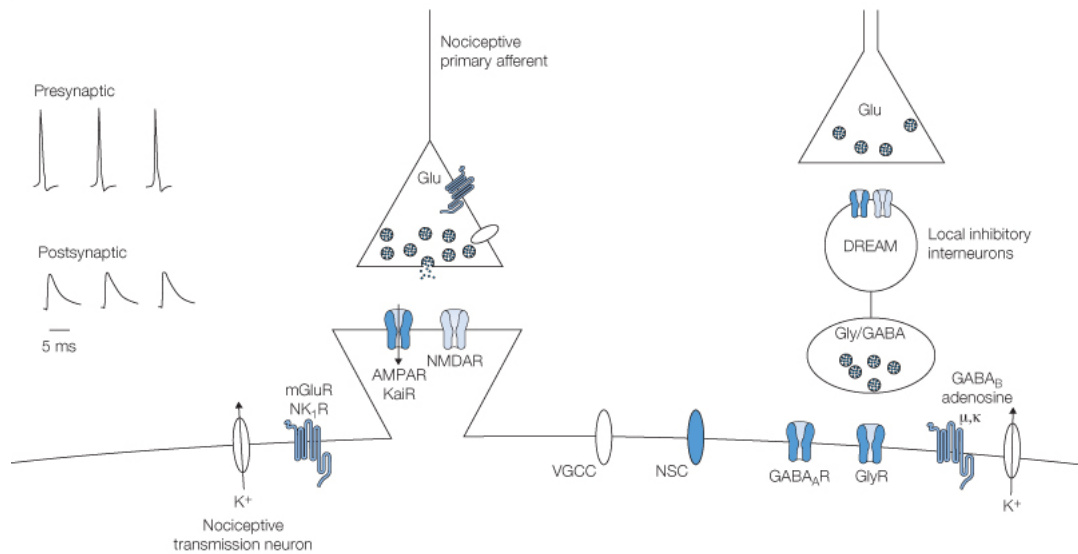


**Figure 19 : Localisation des interneurons inhibiteurs GABAergiques et glycinergiques dans la corne dorsale. a.** Distribution des interneurons GABAergiques exprimant le fluorochrome EGFP sous le contrôle du promoteur GAD67. **b.** Distribution des interneurons inhibiteurs glycinergiques exprimant le fluorochrome EGFP sous le contrôle du promoteur GlyT2. (*adapté d'après Zeilhofer et al., 2012*).

sortie de potassium principalement sur les terminaisons présynaptiques (Yoshimura and Nishi, 1995 ; Towers et al., 2000). D'autres récepteurs métabotropiques (de type opioïdérique, cholinergique ou adénosinergique) assurent également une inhibition puissante de l'activité des neurones des cornes dorsales (Woolf and Salter, 2006) (Figure 20). Il est aujourd'hui admis que cet ensemble de mécanismes inhibiteurs est indispensable au contrôle et à la segmentation des signaux périphériques dans le système plurimodal sensoriel.

Depuis la publication de la théorie du « gate control » par Melzack et Wall (1965) dans laquelle les systèmes inhibiteurs joueraient un rôle pivot entre toucher et nociception, de nombreux travaux ont mis en avant l'importance de ces contrôles et les mécanismes mis en jeu aboutissant à la perturbation de la balance excitation/inhibition au sein de la corne dorsale (Zeilhofer et al., 2009b) (Figure 11). Bien que le phénomène de sensibilisation centrale fut d'abord alloué à une facilitation de la transmission synaptique excitatrice, il est aujourd'hui clair que la perturbation des contrôles inhibiteurs s'exerçant dans la corne dorsale joue un rôle primordial dans l'hypersensibilité mécanique (von Hehn et al., 2012). En effet, l'inhibition segmentaire des contrôles GABAergiques et/ou glycinergiques permet de produire une facilitation de la transmission excitatrice médiée par les fibres A dans les couches superficielles de la corne dorsale (Baba et al., 2003 ; Torsney and MacDermott, 2006 ; Miraucourt et al., 2007) ainsi qu'une hypersensibilité mécanique *in vivo* (Beyer et al., 1985 ; Roberts et al., 1986 ; Yaksh, 1989 ; Sivilotti and Woolf, 1994 ; Malan et al., 2002 ; Miraucourt et al., 2007 ; Cao et al., 2011). De nombreux mécanismes permettent de provoquer une diminution de l'inhibition segmentaire GABAergique ou glycinergique incluant une diminution des contrôles





**Figure 20 : Transmission synaptique sur les neurones de second ordre.** Sous l'effet d'un potentiel excitateur pré-synaptique, les fibres afférentes primaires libèrent du glutamate dans la fente synaptique et activent les récepteurs post-synaptiques de type  $\alpha$ -amino-3-hydroxyl-5-méthyl-4-isoxazole (AMPA) et kainate entraînant un influx cationique intracellulaire et l'apparition d'une potentiel post-synaptique excitateur (PPSE). Ces neurones subissent également un contrôle inhibiteur provenant d'interneurones locaux par l'activation de récepteurs post-synaptiques GABA<sub>A</sub> ou GlyR responsables d'une hyperpolarisation membranaire. AMPAR, AMPA receptor; GABA<sub>A</sub>R, GABAA receptor; Glu, glutamate; Gly, glycine; GlyR, glycine receptor; KaiR, kainate receptor;  $\kappa$ , kappa opiate receptor; mGluR, metabotropic glutamate receptor;  $\mu$ , mu opiate receptor; NK<sub>1</sub>R, neurokinin-1 receptor; NMDAR, N-méthyl-d-aspartic acid receptor; NSC, non-selective cation channel; VGCC, voltage-gated calcium channel (*adapté d'après Woolf and Salter, 2006*).

descendants inhibiteurs, une apoptose des neurones inhibiteurs segmentaires, une modulation des courants inhibiteurs par activation gliale, une modification des propriétés intrinsèques des neurones inhibiteurs ou des modifications postsynaptiques des cibles contactées par les neurones GABAergiques ou glycinergiques de la corne dorsale.

### *3.3.2.1. DESHINIBITION PAR LES CONTROLES DESCENDANTS*

Le rôle de contrôles descendants dans la désinhibition segmentaire peut être envisagé selon différents schémas. L'activité des fibres descendantes, que ce soit par libération directe de GABA (Antal et al., 1996) ou par modulation noradrénergique, dopaminergique ou sérotoninergique (Millan, 2002), pourrait être modifiée lors d'une inflammation ou d'une lésion périphérique, et ainsi entraîner une modification de l'excitabilité des neurones de la corne dorsale par diminution d'un contrôle inhibiteur tonique (action directe) ou par inhibition d'interneurones inhibiteurs segmentaires (action indirecte). Dans un autre cas, ces fibres descendantes pourraient induire une plasticité postsynaptique des neurones segmentaires et une diminution du pouvoir hyperpolarisant des neuromédiateurs inhibiteurs. Bien que la fonction modulatrice de ces contrôles descendants ait été démontrée (Kuner, 2010), la RVM ne semble pas être impliquée dans l'initiation de la sensibilisation centrale (Burgess et al., 2002), mais pourrait jouer un rôle important dans la chronicisation des douleurs neuropathiques (Zhang et al., 2009 ; De Felice et al., 2011).

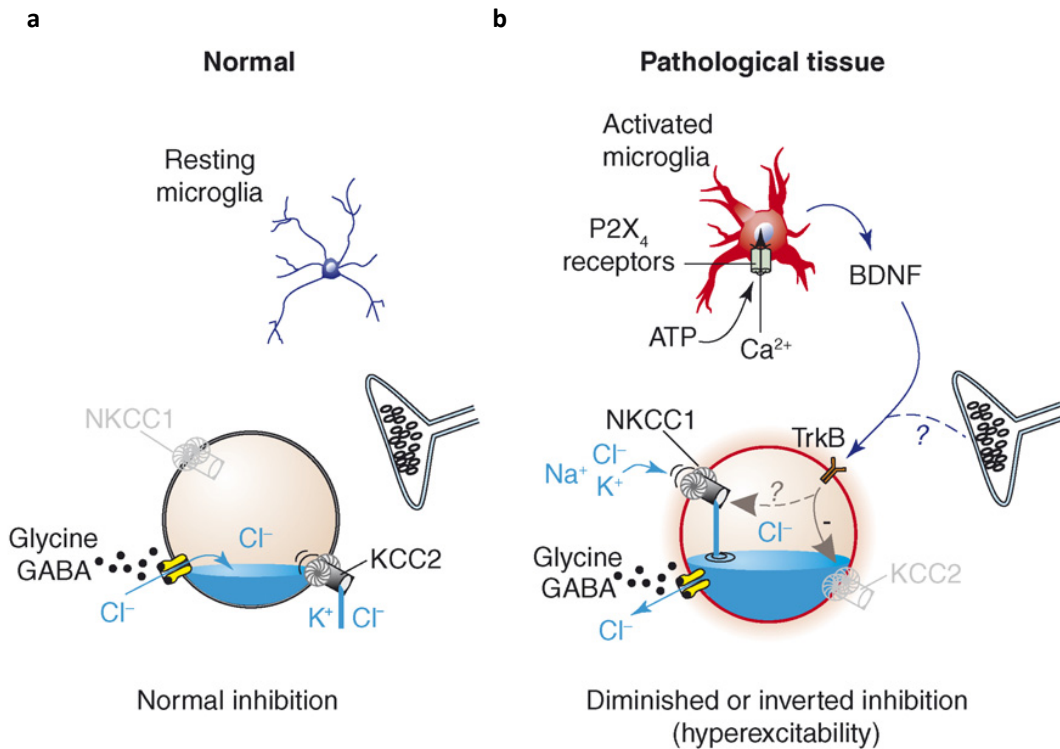
### *3.3.2.2. DESHINIBITION PAR PERTE NEURONALE*

Une autre théorie visant à expliquer le phénomène de désinhibition se base sur une perte neuronale au sein de la population d'interneurones inhibiteurs (Moore et al., 2002 ; Scholz et al., 2005). Cependant, les travaux de Todd semblent discréditer cette hypothèse, montrant que le nombre de neurones inhibiteurs ne varierait pas après lésion nerveuse

périphérique, mais que ce serait l'expression du GABA et de son enzyme de synthèse, la glutamate décarboxylase (GAD), qui serait réduite (Ibuki et al., 1997 ; Eaton et al., 1998 ; Polgar et al., 2003 ; Polgar et al., 2004 ; Polgar et al., 2005). De plus, Martin et ses collaborateurs (2010) ont récemment reporté une diminution de l'expression de la GAD<sub>65</sub> dans les couches I et II de la MDH sans perte neuronale, après ligature du nerf infra-orbitaire. De manière intéressante, cette désinhibition par diminution de la voie de signalisation GABAergique semble être exclusivement d'origine présynaptique, sans modification de l'expression des récepteurs GABAergiques postsynaptiques (Polgar and Todd, 2008).

### *3.3.2.3. DESINHIBITION PAR MODIFICATION DU GRADIENT CHLORE*

Au début des années 2000, l'équipe de De Koninck a proposé un nouveau mécanisme tendant à expliquer la perte d'inhibition observée lors de la sensibilisation centrale (Coull et al., 2003 ; Coull et al., 2005 ; Prescott et al., 2006). Selon lui, l'activation microgliale qui fait suite à une lésion périphérique, serait capable de diminuer, voire d'inverser dans des cas extrêmes, le gradient de chlore existant entre le milieu intracellulaire et extracellulaire des neurones ciblés par les interneurons inhibiteurs. Cette perturbation ferait suite à une activation des récepteurs microgliaux P<sub>2</sub>X<sub>4</sub> par l'ATP, puis une libération de BDNF activant ainsi les récepteurs trkB des neurones cibles. Cette activation entrainerait une diminution d'expression de co-transporteurs « potassium-chloride exporter » KCC2 permettant normalement de conserver une concentration faible en chlore intracellulaire et donc un pouvoir hyperpolarisant des canaux ionotropiques inhibiteurs. En parallèle, les co-transporteurs NKCC1, dont l'action est contraire aux KCC2, seraient surexprimés. La conséquence de cette perturbation résulte en une baisse du pouvoir hyperpolarisant du GABA et de la glycine, pouvant aller jusqu'à un pouvoir dépolarisant,



**Figure 21 : Perturbation de l'homéostasie du chlore en condition pathologique.** **a.** Dans des conditions physiologiques, les cotransporteurs KCC2 expulsent le chlore de la cellule afin de garder une concentration intracellulaire faible. Le gradient transmembranaire est tel, que l'ouverture de récepteurs-canaux GABAergique ou glycinergique entraîne une entrée de chlore et ainsi une hyperpolarisation membranaire. **b.** En condition pathologique, l'activation microgliale des récepteurs P2X<sub>4</sub> par l'ATP entraîne une libération de BDNF, venant se fixer sur les récepteurs neuronaux TrkB. L'activation de ces récepteurs entraîne une diminution de l'expression des co-transporteurs KCC2 et une augmentation de celle des co-transporteurs NKCC1 d'action contraire, entraînant une forte concentration intracellulaire en chlore. Ainsi, le gradient chlorure transmembranaire est inversé, entraînant une sortie de chlore et une dépolarisation membranaire lors de l'ouverture des récepteurs-canaux GABA<sub>A</sub> ou à la glycine. (adapté d'après De Koninck, 2007).

et donc excitateur. Les neurones de couche I seraient particulièrement sensibles à cette plasticité en raison de leur faible capacité d'extrusion du chlore (Cordero-Erausquin et al., 2005) (Figure 21). L'inversion complète du gradient de chlore est cependant très improbable *in vivo*. En effet, les traitements pharmacologiques permettant une augmentation de la voie de signalisation du GABA sont efficaces dans de nombreux modèles de douleurs. Par exemple, l'administration intrathécale de GABA permet de réduire l'allodynie et l'hyperexcitabilité neuronale chez des animaux neuropathiques (Gwak and Hulsebosch, 2011). De plus, l'utilisation d'agonistes des récepteurs GABA<sub>A</sub> provoque un effet antalgique dans des modèles de douleurs neuropathiques et inflammatoires, dépendant notamment des sous-unités  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  de ce récepteur (Hwang and Yaksh, 1997 ; Malan et al., 2002 ; Knabl et al., 2008 ; Zeilhofer et al., 2009a). La bicuculline, antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub>, reste par ailleurs pronociceptive après lésion nerveuse périphérique (Malan et al., 2002). Enfin, l'utilisation de virus codant pour les enzymes de synthèse du GABA, la GAD<sub>65</sub> et la GAD<sub>67</sub>, dans une approche de thérapie génique, permet de réduire l'hypersensibilité thermique et mécanique dans des modèles de douleurs neuropathiques (New and Rabkin, 1998 ; Liu et al., 2004 ; Liu et al., 2008b).

#### *3.3.2.4. DESINHIBITION PAR LES ESPECES DERIVES DE L'OXYGENE*

Récemment, une autre hypothèse a été mise en avant permettant d'expliquer la perte d'inhibition lors de la sensibilisation centrale. Dans ce cas de figure, une surproduction d'espèces dérivées de l'oxygène (ROS) d'origine mitochondriale serait la cause d'une diminution de la libération de GABA, et donc une désinhibition (Kim et al., 2011 ; Yowtak et al., 2011). Les ROS regroupent le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), les radicaux hydroxyyles ( $\cdot$ OH) et hydroperoxydes (HO<sub>2</sub> $\cdot$ ), les anions superoxydes (O<sub>2</sub> $\cdot^-$ ), ainsi que leurs

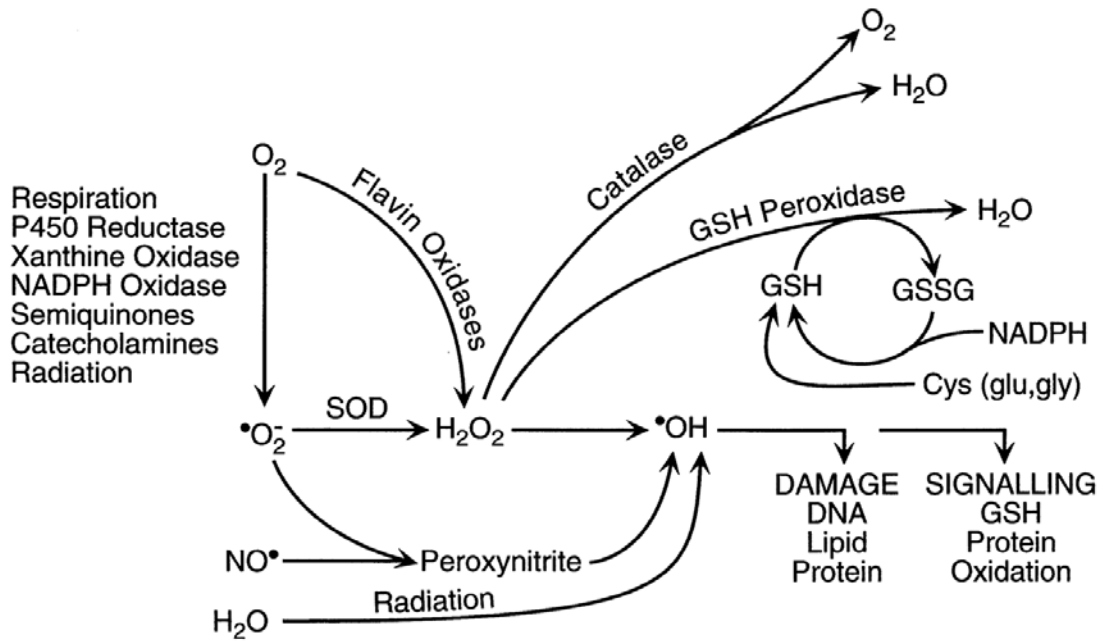
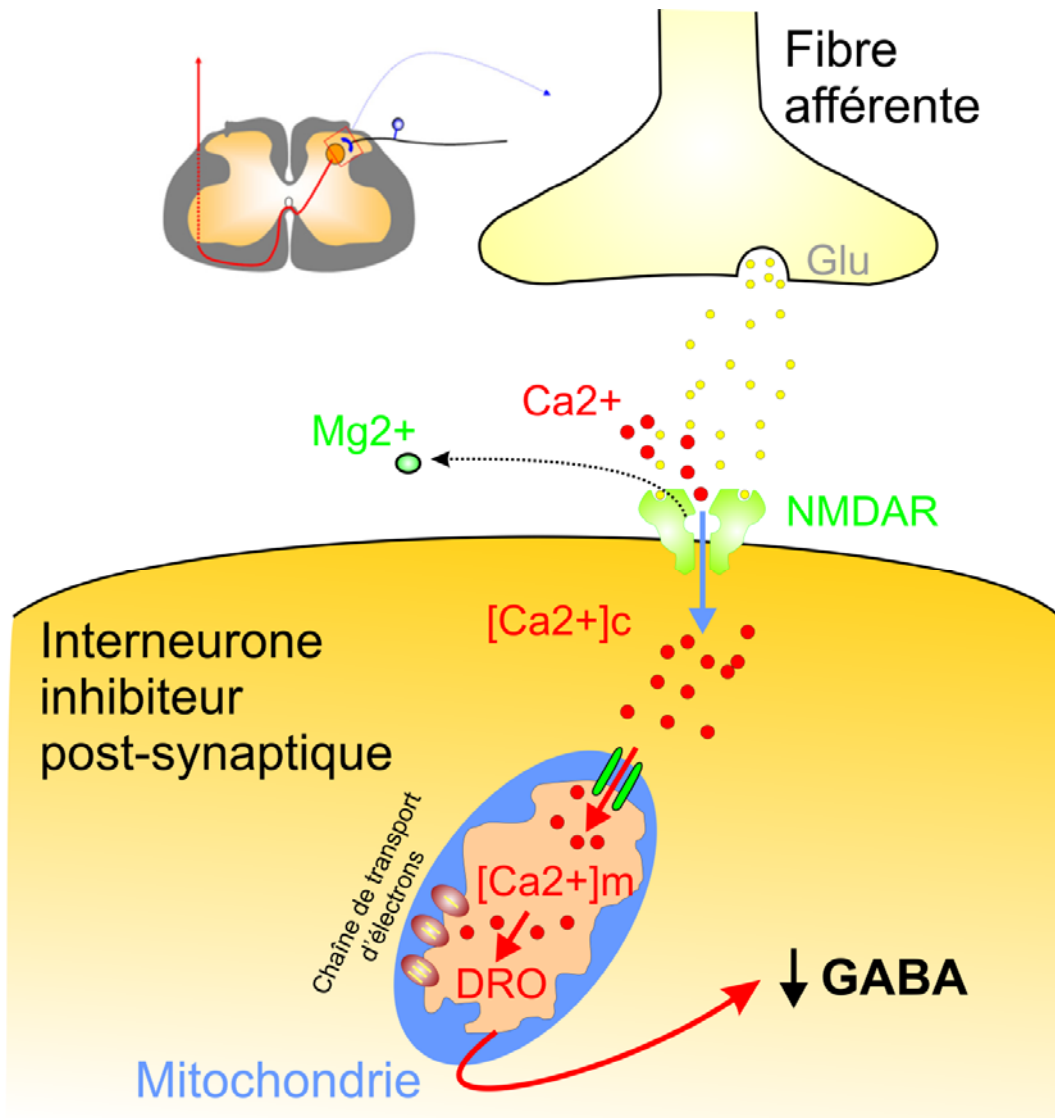


Figure 22 : Sources de ROS et leurs effets cellulaires. (adapté d'après Maher and Schubert, 2000).

enzymes de synthèse comme la superoxide dysmutase (SOD) et la glutathione peroxydase (GPx). Cette famille inclut aussi les radicaux oxygénés dérivés du carbone et de l'azote comme les radicaux alkoxyles ( $\text{RO}\cdot$ ) et peroxyles ( $\text{RO}_2\cdot$ ), les peroxy-nitrites ( $\text{ONOO}^-$ ) et l'oxide d'azote (NO) (Maher and Schubert, 2000). Les ROS résultent du produit des réactions métaboliques de la chaîne respiratoire mitochondriale et de la réduction de l'oxygène en eau. Les électrons libres présents réagissent avec l'oxygène et produisent des ROS. Ces molécules, ubiquitaires dans l'organisme, participent à de nombreux mécanismes physiologiques allant du rôle de second messenger aux facteurs pro-apoptotiques (Lander, 1997) (Figure 22). La concentration de ROS intracellulaire, critique pour son intégrité, est hautement régulée par de nombreuses enzymes (Maher and Schubert, 2000). Cependant, lorsque leurs niveaux deviennent trop élevés, les machineries intracellulaires responsables du contrôle des ROS ne parviennent plus à les maintenir à un niveau stable, ayant pour conséquence une dérégulation des voies de signalisations intracellulaires et une cytotoxicité pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire. Ces ROS ont en effet été impliqués dans de nombreuses pathologies (Lewen et al., 2000) ainsi que dans l'hypersensibilité cutanée d'origine inflammatoire et neuropathique (Kim et al., 2004 ; Muscoli et al., 2004 ; Wang et al., 2004c ; Park et al., 2006 ; Gao et al., 2007 ; Lee et al., 2007 ; Ibi et al., 2008 ; Schwartz et al., 2008 ; Schwartz et al., 2009 ; Kim et al., 2011). Dans un modèle de douleur inflammatoire, la capsaïcine entraîne une diminution de l'activité enzymatique de la SOD ayant pour conséquence une surproduction de ROS (Schwartz et al., 2009). Le mécanisme par lequel les ROS induisent une diminution de la transmission inhibitrice est cependant encore inconnu. Néanmoins, de récentes publications (Yowtak et al., 2011 ; Im et al., 2012) suggèrent que les ROS agiraient sur la transmission inhibitrice de la corne dorsale par un mécanisme présynaptique (Figure 23). De manière intéressante, l'application de donneurs de ROS sur des tranches de moelle



**Figure 23 : Désinhibition induite par les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS).** Les fibres afférentes primaires libérant du glutamate activent les récepteurs NMDA postsynaptiques des interneurons inhibiteurs entraînant une augmentation de calcium intracellulaire. Ce calcium entre dans les mitochondries par des canaux uniporteurs de calcium et active la chaîne respiratoire. Cette activation entraîne une augmentation de la production de ROS ayant pour conséquence une diminution de libération de GABA. (adapté d'après Kim et al., 2011 et Yowtak et al. 2011).



épineière ne modifie pas la transmission monosynaptique excitatrice, mais touche seulement la transmission inhibitrice GABAergique (la composante glycinergique n'étant pas affectée) (Yowtak et al., 2011). L'origine de cette diminution présynaptique de GABA peut cependant être liée à plusieurs mécanismes. En effet, la concentration de GABA dans la fente synaptique peut être une conséquence d'une diminution de la libération de GABA par les interneurons inhibiteurs ou une recapture de GABA par les terminaisons présynaptiques ou par des cellules gliales.

### 3.3.3. ROLE DE LA GLIE

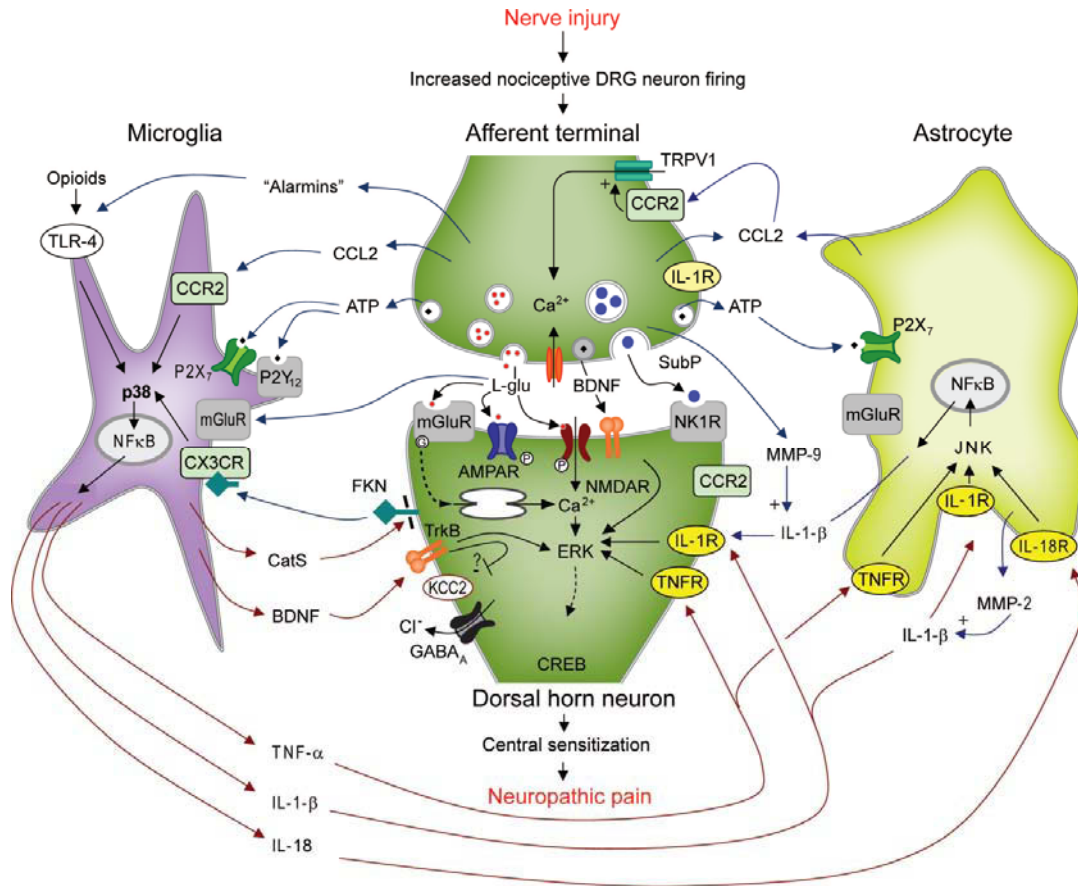
Il est aujourd'hui communément accepté que les synapses ne comportent pas deux, mais trois éléments : la terminaison présynaptique, l'élément postsynaptique et l'environnement glial. La glie de la corne dorsale est en état quiescent à l'état basal, mais peut être activée lors d'une lésion ou d'une inflammation (Woolf and Mannion, 1999). Les cellules gliales, tous types confondus, dépassent de très loin en nombre les neurones du système nerveux central. La glie recouvre les astrocytes, la microglie et les oligodendrocytes dont les fonctions varient dans les voies de la nociception (Milligan and Watkins, 2009).

Les astrocytes sont les plus abondantes des cellules gliales dans le système nerveux central et expriment spécifiquement certains marqueurs comme le « glial fibrillary acidic protein » (GFAP) (Kimelberg, 2004). Ils interagissent directement et indirectement avec la transmission synaptique par différents mécanismes en encapsulant totalement l'espace synaptique (Haydon, 2001). Ils expriment de nombreux récepteurs similaires de ceux exprimés par les neurones incluant les récepteurs ionotropiques AMPA et NMDA, des récepteurs métabotropiques (mGluR3 et mGluR4), purinergiques, les récepteurs à la

substance P ainsi que des transporteurs comme le transporteur glial 1 du glutamate (GLT1), le transporteur 2 de la glycine (GlyT2) et le cotransporteur glutamate/aspartate (GLAST) (Zeilhofer, 2005 ; Milligan and Watkins, 2009). Les voies de signalisation intracellulaires impliquées lors de l'activation astrocytaire sont multiples et impliquent entre autres la voie des « mitogen activated protein kinases » (MAPKs) et celle des « c-Jun N-terminal kinases » (JNKs) (Gosselin et al., 2010). Les astrocytes synthétisent de nombreux facteurs inflammatoires comme l'interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), l'IL-6, le « tumor necrosis factor  $\alpha$  » (TNF- $\alpha$ ), la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), le NO et des gliotransmetteurs comme la D-sérine ou le glutamate (McMahon et al., 2005 ; Gosselin et al., 2010 ; Bardoni et al., 2010 ; Benison et al., 2011). Le rôle des astrocytes est multiple, intervenant dans l'homéostasie ionique extracellulaire, la libération ou la recapture de neurotransmetteurs, l'excitabilité neuronale, le contrôle de la barrière hématoencéphalique et la régulation des voies métaboliques (Gosselin et al., 2010). Leur implication a été démontrée dans de nombreux modèles de douleurs neuropathiques (Coyle, 1998 ; Honore et al., 2000 ; Stuesse et al., 2001 ; Vega-Avelaira et al., 2007) et inflammatoires (Sweitzer et al., 1999 ; Sun et al., 2005). L'activation des astrocytes peut se faire par activation microgliale ou neuronale par l'intermédiaire de nombreux médiateurs, mais les mécanismes sous-tendus sont encore débattus aujourd'hui (Benarroch, 2010). La protéine centrale permettant l'activation des astrocytes et de la microglie est cependant commune : le « nuclear factor  $\kappa$  B » (NF $\kappa$ B).

La microglie représente les macrophages du système nerveux central générant les réponses immunitaires innées. Les cellules de la microglie étendent de nombreux processus ramifiés exprimant des immunorécepteurs réalisant ainsi une constante surveillance immunitaire (Gosselin et al., 2010). Lorsqu'elles sont activées, ces

ramifications se réduisent, expriment de nombreuses protéines du complexe d'histocompatibilité et libèrent des facteurs pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  (Hanisch, 2002), des neurotransmetteurs excitateurs et des ROS (Watkins and Maier, 2002 ; Ledebøer et al., 2005). Comme les astrocytes, le rôle de la microglie a pu être identifié dans de nombreux modèles de douleur chroniques (Tsuda et al., 2005 ; Beggs and Salter, 2007 ; Ji and Suter, 2007 ; Chang et al., 2010). Le principal effet de l'activation microgliale, dépendant du récepteur purinergique P2X<sub>4</sub>, s'exprime dans la modification du gradient de chlore des neurones postsynaptiques du à la modification d'expression des co-transporteurs NKCC1 et KCC2 (Coull et al., 2003 ; Coull et al., 2005 ; De Koninck, 2007) (Figure 24). Il est intéressant de noter que l'inhibition de la microglie, à l'inverse des astrocytes, permet de prévenir mais pas de renverser certaines douleurs chroniques (Raghavendra et al., 2003 ; Ledebøer et al., 2005 ; Piao et al., 2006 ; Ji et al., 2006 ; Gosselin et al., 2010 ; Tsuda et al., 2012). La microglie serait donc impliquée dans l'initiation des douleurs chroniques et les astrocytes, en outre par libération de la D-serine, cofacteur des récepteurs NMDA, dans leur initiation et leur maintien (Romero-Sandoval et al., 2008 ; Mirauccourt et al., 2011).



**Figure 24 : Le rôle de la glie dans la douleur.** Après lésion nerveuse, les fibres afférentes primaires libèrent différents neuromédiateurs comme le glutamate, la substance P, l'ATP et le BDNF. En plus de l'activation de récepteurs postsynaptiques, ces substances libérées activent les astrocytes (par les récepteurs P2X<sub>7</sub>) et la microglie (par les récepteurs P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>7</sub> et P2Y<sub>12</sub>) entraînant l'activation du facteur NFκB et la libération de facteurs proinflammatoires. L'IL-1β et le TNFα augmentent l'excitabilité du neurone postsynaptique par l'intermédiaire des récepteurs IL-1R et TNFR. La libération de BDNF par la microglie modifie le gradient de chlore du neurone postsynaptique et donc le pouvoir hyperpolarisant des récepteurs GABA<sub>A</sub>. Les fibres afférentes primaires libèrent également du CCL2 et des alarmines activant les récepteurs CCR2 et TLR-4 permettant une libération de facteurs inflammatoires et une diminution de l'effet analgésique induit par les récepteurs opioïdes. IL, Interleukin. NF, nuclear factor. TNF, tumor necrosis factor. CCL, cystéine-cystéine chemokine ligand. BDNF, brain-derived neurotrophic factor. GABA<sub>A</sub>, γ-aminobutyric acid receptor A. (adapté d'après Benarroch, 2010).

#### 4. SENSIBILISATION CENTRALE ET PLASTICITE

L'allodynie/hyperalgésie secondaire résulte d'une sensibilisation centrale incluant de multiples mécanismes de plasticité neuronale. Cette sensibilisation centrale fait suite à une stimulation intense, répétée et soutenue des fibres périphériques, et plus particulièrement des nocicepteurs, que ce soit par stimulation thermique (Woolf, 1983), électrique (Wall and Woolf, 1984), ou chimique (Woolf and King, 1990 ; LaMotte et al., 1991) faisant intervenir des récepteurs TRPA1 ou TRPV1 (Woolf and King, 1990 ; Jordt et al., 2004 ; McNamara et al., 2007). Une stimulation non répétée, même intense comme un pincement fort, n'est pas suffisante pour induire une sensibilisation centrale (Latremoliere and Woolf, 2009).

Un des acteurs indispensable à cette plasticité est le récepteur NMDA (Woolf and Thompson, 1991). L'induction de la sensibilisation centrale est indépendante de la transcription *de novo*, mais nécessite de rapides modifications des récepteurs au glutamate, notamment par des mécanismes de phosphorylation (Woolf and Salter, 2000). La phase de maintenance qui s'en suit est quant à elle dépendante de la transcription et de la synthèse de nombreuses protéines.

##### 4.1. LE GLUTAMATE

Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur majoritaire du système nerveux central. Son action est médiée par des récepteurs ionotropiques et métabotropiques, pré et postsynaptiques, permettant l'entrée de calcium intracellulaire responsable de la génération d'un potentiel d'action et l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaires (Kandel and Siegelbaum, 2000). Les récepteurs au glutamate incluent les récepteurs ionotropiques AMPA, NMDA et kainate ainsi que les récepteurs métabotropiques mGluR. Les récepteurs AMPA et NMDA sont vraisemblablement

présents dans toutes les synapses excitatrices alors que les récepteurs mGluR sont localisés autour de l'espace synaptique (Alvarez et al., 2000 ; Azkue et al., 2000 ; Pitcher et al., 2007 ; Antal et al., 2008). Les récepteurs AMPA sont des tétramères perméables au calcium essentiellement composés de sous-unités GluR1 et GluR3 ainsi que de sous-unités GluR2 non perméable au calcium (Polgar et al., 2008). Les récepteurs NMDA sont des tétramères contenant deux sous-unités NR1 sensibles à la glycine et à la D-sérine, et deux sous-unités NR2<sub>A-D</sub> ou NR3<sub>A/B</sub>. Les principaux types de récepteurs NMDA dans la corne dorsale sont composés de sous-unités NR1 et NR2<sub>A/B</sub> (Mi et al., 2004 ; Nagy et al., 2004). Les mGluRs peuvent être séparés en 3 groupes en fonction de leur lien avec l'une ou l'autre protéine Gα (Conn and Pin, 1997). Les récepteurs mGluR1 et 5 (groupe I) sont couplés avec des protéines Gαq (dont l'activation provoque une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire) alors que les récepteurs mGluR2 et 3 (groupe II) ainsi que mGluR4 et 7 (groupe III) sont couplés avec des protéines Gai/o. La localisation de ces récepteurs au sein de la corne dorsale est hétérogène. Les récepteurs mGluR1 sont localisés préférentiellement dans la couche V, les mGluR5 dans les couches I et II et les mGluR2/3 dans la couche IIi (Alvarez et al., 2000; Aronica et al., 2001; Pitcher et al., 2007). Le rôle fonctionnel de cette disparité reste encore à déterminer.

Les récepteurs NMDA sont indispensables à l'induction comme à la maintenance de la sensibilisation centrale. En effet, le blocage pharmacologique de ces récepteurs par le MK801 ou le D-CPP prévient et renverse l'hyperexcitabilité des neurones de la corne dorsale induit par stimulations nociceptives (Woolf and Thompson, 1991 ; Ma and Woolf, 1995). Dans des conditions normales, le récepteur NMDA ne participe que peu à la transmission synaptique car son canal est bloqué par un bouchon magnésium (Mg<sup>2+</sup>) (Mayer et al., 1984). Cependant, lors d'une activation suffisante, par libération de glutamate, substance P et CGRP, le potentiel de membrane atteint un seuil capable de

déplacer le  $Mg^{2+}$ , libérer le pore du canal et entraîner une entrée massive de calcium dans la cellule activant ainsi différentes voies de signalisation intracellulaires et permettant de maintenir le neurone dans un état sensibilisé (Latremoliere and Woolf, 2009). Les récepteurs mGluRs semblent également liés à la sensibilisation centrale médiée par les fibres C. Les récepteurs mGluRs du groupe I semblent nécessaire à la manifestation de la sensibilisation centrale alors que les récepteurs des groupes II et III semblent au contraire diminuer cette sensibilisation lorsqu'elle est induite par la capsaïcine (Soliman et al., 2005 ; Bleakman et al., 2006). La conséquence majeure de l'activation de ces différents récepteurs est l'augmentation du calcium intracellulaire. Les conséquences de ce phénomène sont multiples. En effet, les récepteurs AMPA et NMDA possèdent chacun des sites de phosphorylation liés à leur activité ainsi qu'à leur trafic intracellulaire et membranaire (Carvalho et al., 2000 ; Lau and Zukin, 2007), cette dynamique des récepteurs étant caractéristique de la sensibilisation centrale et permettant d'expliquer en partie l'hypersensibilité neuronale observée dans la corne dorsale (Latremoliere and Woolf, 2009). Lorsqu'ils sont phosphorylés par la PKA, la PKC ou la CamKII, ces récepteurs entraînent l'activation de nombreuses cascades protéiques incluant les voies phospholipase C (PLC)/PKC, phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), CREB et MAPK, cette dernière étant constituée des protéines ERK1 et ERK2 (Ji et al., 1999 ; Karim et al., 2001 ; Kawasaki et al., 2004 ; Walker et al., 2007).

#### 4.2. LA VOIE « EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASE » (ERK)

L'activation de ERK est régulée par une cascade de protéine kinases est a été impliquée dans de nombreux mécanismes comme la mitose, la prolifération et différenciation cellulaire, la plasticité synaptique et l'inflammation (Impey et al., 1999 ; Ji et al., 2009). ERK peut être activé par le BDNF après liaison sur son récepteur TrkB via la

voie canonique ras/raf. Le glutamate, par activation des récepteurs NMDA ou mGluR, ou la substance P par les récepteurs NK1, permettent également d'induire une activation de ERK par l'intermédiaire des protéines kinases A et C répondant à une augmentation du calcium intracellulaire (Ji et al., 2009). Bien qu'une activation de ERK puisse être induite par une activation de la PKA ou de la PKC, le niveau le plus élevé de ERK a pu être observé par une combinaison de l'activation de ces deux kinases (Kawasaki et al., 2004). De manière intéressante, la CAMKII dont le rôle a largement été démontré dans la plasticité synaptique de nombreuses structures cérébrales (Lynch, 2004), ne semble pas être impliquée dans l'activation de ERK des neurones de la corne dorsale (Kawasaki et al., 2004). Les cibles de ERK sont multiples et englobent des molécules d'adhésion cellulaire, des protéines du cytosquelette, des récepteurs ionotropiques et des facteurs de transcription, notamment CREB, pouvant entraîner la transcription de nombreux gènes, et donc la synthèse de multiples protéines (Impey et al., 1999). Ces changements complexes sont responsables d'une plasticité neuronale importante, notamment dans les phénomènes de sensibilisation centrale (Ji et al., 2009) (Figure 25).

L'activation de ERK par phosphorylation dans la corne dorsale est dépendante de la modalité du stimulus qui l'induit. En effet, ERK n'est activé que lors de stimulations induisant une douleur, et plus particulièrement lors de profonds changements de l'excitabilité neuronale (Ji et al., 1999). Les animaux naïfs ou stimulés par un stimulus mécanique ou thermique non nociceptif, ne présente pas ou peu de phosphorylation de ERK dans la corne dorsale. A l'inverse, l'activation des fibres nociceptives par injection sous-cutanée de capsaïcine, par stimulation thermique ( $>50^{\circ}\text{C}$  ou  $>4^{\circ}\text{C}$ ) ou mécanique intense induit immédiatement une importante phosphorylation de ERK dans les couches superficielles de la corne dorsale, précisément dans la zone où se terminent ces fibres (Ji et al., 1999). La durée du stimulus nécessaire à l'induction de ERK est également



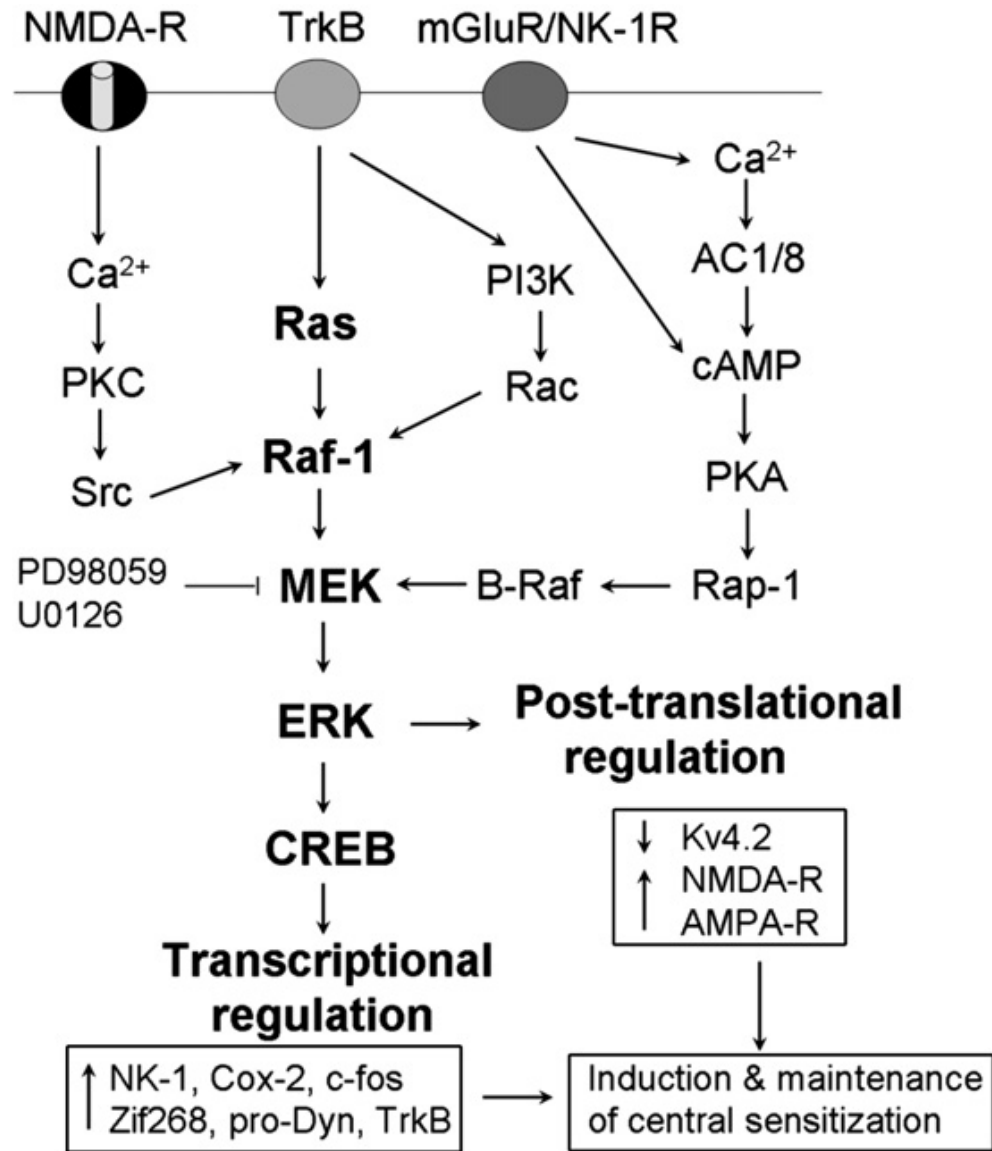


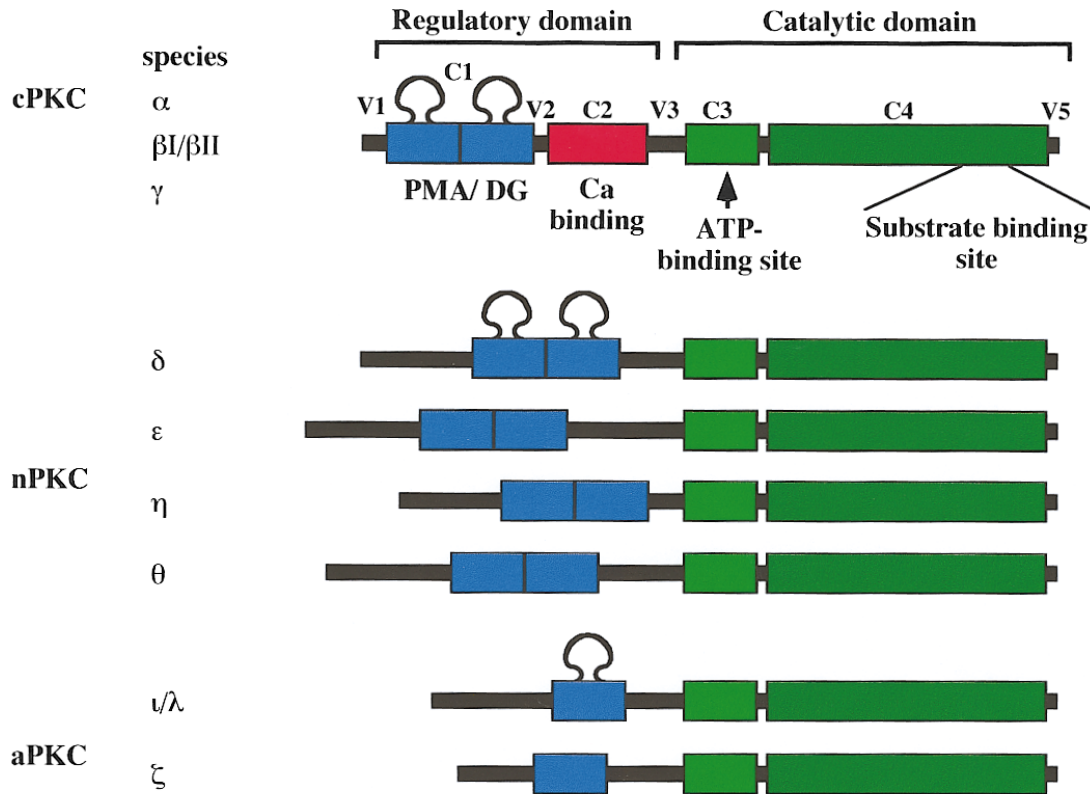
Figure 25 : Les voies de signalisation de ERK dans la corne dorsale par différents récepteurs postsynaptiques et protéine kinases. Une fois activé, ERK est capable d'induire une intense plasticité neuronale. L'induction et la maintenance de la sensibilisation centrale fait suite à des modifications post-transcriptionnelles ou transcriptionnelles respectivement. (adapté d'après Ji et al., 2009).

importante. Seule une stimulation soutenue ou répétée est capable de provoquer une phosphorylation de ERK, même lorsque le stimulus est intense (Ji et al., 1999), alors que ce même stimulus est suffisant pour provoquer une expression de Fos (Hunt et al., 1987). L'activation de ERK a pu être identifiée dans de nombreux modèles de douleur inflammatoires et neuropathiques (Ji et al., 2002a ; Adwanikar et al., 2004 ; Wang et al., 2004a ; Hao et al., 2005 ; Cruz et al., 2005a ; Cruz et al., 2005b ; Karim et al., 2006 ; Pang et al., 2008 ; Lai et al., 2011). De plus, bien que ERK ne puisse être phosphorylé que lors d'une stimulation nociceptive en condition physiologique, ce n'est plus le cas lorsqu'une hypersensibilité mécanique est visible. Ainsi, dans cette situation, une stimulation électrique (Wang et al., 2004a) ou mécanique (Hao et al., 2005 ; Miraucourt et al., 2009) à bas seuil induit une phosphorylation de ERK dans les neurones de la corne dorsale. Ces spécificités moléculaires concernant la phosphorylation de ERK en fait un outil fonctionnel particulièrement intéressant, lié vraisemblablement aux phénomènes de plasticité neuronale et à l'hypersensibilité mécanique (Ji et al., 2009). De manière intéressante, ERK ne semble être activé que dans des neurones excitateurs dans le cortex visuel (Cancedda et al., 2003). L'existence d'une telle spécificité dans la corne dorsale n'a cependant jamais été démontrée.

## 5. LES PROTEINES KINASES C

### 5.1. LOCALISATION ANATOMIQUE

Les protéines kinases C (PKC) font parties des sérine/thréonine kinases, divisées en trois groupes selon leur dépendance au calcium et au diacylglycérol (DAG). Les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II et  $\gamma$  dépendent à la fois du calcium et du DAG et sont donc appelées « PKCs conventionnelles (c) ». Les isoformes  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  et  $\theta$  dépendent du DAG mais pas du calcium et sont appelées « nouvelles (n) PKCs ». Enfin, les isoformes  $\zeta$  et  $\lambda$ /1 ne dépendent ni du calcium ni du DAG et sont appelées « PKCs atypiques (a) » (Figure 26). Ces isoenzymes sont impliquées dans une multitude de mécanismes incluant différenciation, prolifération, migration, apoptose, conductance des canaux ioniques, neurotransmission, régulation du trafic de récepteurs et potentialisation synaptique (Akinori, 1998 ; Siegelbaum et al., 2000). Les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$  (cPKCs),  $\epsilon$ ,  $\delta$  (nPKCs) et  $\zeta$  (aPKC) ont été retrouvées dans le système nerveux central (Mochly-Rosen et al., 1987 ; Hashimoto et al., 1988 ; Huang et al., 1990 ; Tanaka and Saito, 1992 ; Wetsel et al., 1992) mais seules les cPKCs sont présentes dans la corne dorsale (Mori et al., 1990 ; Nagashima et al., 1991 ; Tanaka and Saito, 1992 ; Akinori, 1998). Cependant, autant la localisation de l'isoforme  $\alpha$  de la PKC dans la corne dorsale est relativement conservée dans ces études (préférentiellement dans les cellules gliales et les fibres périphériques (Nagashima et al., 1991 ; Tanaka and Saito, 1992 ; Akinori, 1998 ; Ma et al., 2001 ; Olah et al., 2002), autant la localisation des autres isoformes a fait l'objet de controverses. Néanmoins, l'amélioration de la spécificité des anticorps utilisés contre les différentes isoformes de PKCs dans des études récentes, notamment par l'équipe de Todd, a pu donner raison à l'équipe de Tanaka (Mori et al., 1990 ; Tanaka and Saito, 1992). Ainsi, les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$ I de la PKC se trouvent dispersées dans les couches I et II et de manières



**Figure 26 : Représentation schématique des isoformes de protéines kinases C (PKC).** Les PKC conventionnelles (cPKC) regroupent les PKCs  $\alpha$ ,  $\beta I$ ,  $\beta II$  et  $\gamma$  et dépendent du diacylglycérol et du calcium. Les nouvelles PKCs (nPKC) regroupent les PKCs  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  et  $\theta$  et dépendent du diacylglycérol mais pas du calcium. Les PKCs atypiques (aPKC) regroupent les PKCs  $\zeta$  et  $\iota/\lambda$  et ne dépendent ni du diacylglycérol ni du calcium. Les régions C1, C2, C3 et C4 sont séparés par des régions variables V1-5 qui déterminent la spécificité de l'isoenzyme. (adapté d'après Mochly-Rosen and Gordon, 1998).

plus diffuses dans les couches plus profondes, l'isoforme  $\beta$ II dans la couche II externe et l'isoforme  $\gamma$  dans la couche II interne. De manière intéressante, les PKC $\beta$ II et PKC $\gamma$  ne sont pas colocalisées dans les mêmes neurones (Mori et al., 1990). Leur répartition laminaire suggère également que ces deux PKCs sont impliquées dans des mécanismes différents, la PKC $\beta$ II liée à des stimulations nociceptives, la PKC $\gamma$  liée à des stimulations tactiles non nociceptives (Mori et al., 1990). Hormis la PKC $\alpha$ , aucune isoforme de cPKC n'a pu être identifiée dans des cellules gliales. Au contraire, ces dernières sont retrouvées dans les neurones et sont exclusivement postsynaptiques (Mori et al., 1990).

## 5.2. LES PROTEINES KINASES C ET LA NOCICEPTION

Le rôle des PKCs a pu être identifié grâce à l'apparition de différents inhibiteurs pharmacologiques ciblant des isoformes spécifiques de PKCs ainsi qu'à la génération d'animaux dont le gène correspondant à une isoforme de PKC a été génétiquement supprimé. A l'heure actuelle des souris knock-out (KO) pour 8 des 10 isoformes de PKCs ont été générées, ciblant la PKC $\alpha$  (Leitges et al., 2002), PKC $\beta$  ( $\beta$ I et  $\beta$ II) (Leitges et al., 1996), PKC $\gamma$  (Abeliovich et al., 1993a ; Abeliovich et al., 1993b), PKC $\delta$  (Leitges et al., 2001a), PKC $\theta$  (Sun et al., 2000), PKC $\zeta$  (Leitges et al., 2001b) et PKC $\epsilon$  (Khasar et al., 1999). Parmi ces lignées, certaines isoformes de PKCs ont été impliquées dans la nociception, comme les PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ , PKC $\epsilon$  et PKC $\gamma$  (Choi and Messing, 2003 ; Velazquez et al., 2007 ; Zhao et al., 2011).

Le rôle de la PKC $\alpha$  et de la PKC $\epsilon$  a pu être identifié en tant que modulateur de l'activité des fibres périphériques (Olah et al., 2002 ; Shirai et al., 2008). La PKC $\alpha$  permet de potentialiser le récepteur TRPV1 dans les ganglions rachidiens (Olah et al., 2002). De même, la PKC $\epsilon$ , lorsqu'elle est activée par des facteurs inflammatoires comme la PGE2 (Aley et al., 2000) ou le TNF- $\alpha$  (Parada et al., 2003), phosphoryle et potentialise les

récepteurs TRPV1 au niveau des terminaisons des fibres périphériques (Khasar et al., 1999 ; Cesare et al., 1999 ; Numazaki et al., 2002 ; Mandadi et al., 2006). De plus, l'inhibition de la PKC $\epsilon$  entraîne une diminution de la libération de glutamate et de CGRP dans la corne dorsale dans des modèles de douleurs inflammatoires (Sweitzer et al., 2004a) et une diminution de l'activité des canaux calciques voltage-dépendants de type L (Yang et al., 2005). De manière intéressante, la PKC $\epsilon$  semble nécessaire aux deux phases du test au formol, la première étant considérée comme étant d'origine principalement périphérique, et la deuxième liée à la sensibilisation centrale (Sweitzer et al., 2004a). L'implication de la PKC $\beta$  dans la douleur est quant à elle plus incertaine. Bien qu'il ait été suggéré que l'activation de cette isoforme serait responsable d'une diminution des courants GABAergique par liaison du « receptor for activated protein kinase C » (RACK1) à la sous-unité  $\beta$  du récepteur GABA $_A$  (Song and Messing, 2005), ce rôle dans la corne dorsale n'a jamais été démontré. Cependant, deux études démontrent une surexpression de la PKC $\beta$ II dans la corne dorsale dans un modèle de douleur inflammatoire (Igwe and Chronwall, 2001) et neuropathique (Miletic et al., 2000).

L'isoforme la plus étudiée dans la douleur est la PKC $\gamma$ , principalement en raison de sa localisation neuronale particulière (Tanaka and Saito, 1992) et des effets de sa délétion observés chez la souris (Abeliovich et al., 1993a ; Abeliovich et al., 1993b ; Malmberg et al., 1997a ; Malmberg et al., 1997b).

### 5.3. LA PROTEINE KINASE C GAMMA (PKC $\gamma$ )

#### 5.3.1. PROPRIETES STRUCTURALES ET ANATOMIQUES

Le gène de la PKC $\gamma$ , PRKCG, fut séquencé en 1986 (Parker et al., 1986 ; Coussens et al., 1986) et est localisé sur le bras long du chromosome 19 (19q13.4) chez l'homme. Ce gène d'environ 24,4 kilobases est composé de 18 exons compris entre 32 et 406 paires de

bases et 17 introns compris entre 94 et 5387 paires de bases (Kofler et al., 2002). Il code pour les domaines C1 et C2 pour la liaison au DAG et au calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) respectivement, deux domaines catalytiques C3 et C4 à activité sérine/thréonine kinase pour la liaison à l'ATP et au substrat à proprement parlé. Chacun de ces domaines est séparé par des régions variables (V1-V5) qui confèrent la spécificité de l'isoenzyme (Mochly-Rosen and Gordon, 1998). La PKC $\gamma$  est la seule isoforme de PKC exclusivement neuronale (Hashimoto et al., 1988 ; Wetsel et al., 1992 ; Narita et al., 2004). Elle est retrouvée majoritairement dans l'hippocampe (CA1-CA3) (Kose et al., 1990 ; Tanaka and Saito, 1992 ; Saito et al., 1994), le néocortex (couches II-VI) (Tsujino et al., 1990 ; Tanaka and Saito, 1992 ; Van Der Zee et al., 1993), le cervelet (cellules de Purkinje) (Kose et al., 1988 ; Tanaka and Saito, 1992 ; Barmack et al., 2000) et dans la couche Iii de la corne dorsale de la moelle épinière (ou du MDH pour le complexe sensitif du trijumeau) (Mori et al., 1990 ; Tanaka and Saito, 1992). Comme les autres isoformes de cPKCs, la PKC $\gamma$  est exclusivement postsynaptique (Mori et al., 1990).

### 5.3.2. FONCTION DE LA PKC $\gamma$

Grâce à la génération de souris génétiquement modifiées, la PKC $\gamma$  a été impliquée dans plusieurs fonctions neuronales comme la LTP dans les mécanismes liés à la mémoire dans l'hippocampe (Abeliovich et al., 1993a ; Abeliovich et al., 1993b), la dépression à long terme (LTD) des synapses formées par les fibres grimpantes sur les cellules de Purkinje du cervelet liée à la coordination des mouvements (Kano et al., 1995 ; Chen et al., 1995), les effets liés à la consommation d'éthanol (Bowers and Wehner, 2001 ; Li et al., 2005 ; Shumilla et al., 2005 ; Rex et al., 2010), l'anxiété (Bowers et al., 2000 ; Bowers et al., 2001), les phénomènes de tolérance à la morphine (Mao et al., 1995c ; Granados-Soto et al., 2000 ; Zeitz et al., 2001 ; Nie et al., 2004 ; Lim et al., 2005 ; Galeotti et al.,

2006 ; Smith et al., 2007 ; Cui et al., 2009 ; Song et al., 2010 ; Huang et al., 2012) et la douleur (Malmberg et al., 1997a ; Malmberg et al., 1997b). La PKC $\gamma$  a également été impliquée dans l'ataxie de type 14 chez l'homme (Stevanin et al., 2004 ; Verbeek et al., 2008 ; Sakai et al., 2011). De manière intéressante, il a été montré que l'ataxie de type 14 résulte d'une mutation d'un des domaines catalytiques de la PKC $\gamma$  rendant cette protéine non fonctionnelle ou cytotoxique (Sakai et al., 2011). A ce jour, aucune étude clinique s'intéressant à l'apparition de douleurs chroniques chez ces patients n'a été reportée. Cette étude translationnelle permettrait de confirmer, ou d'infirmer, le rôle de la PKC $\gamma$  dans la sensibilisation centrale et l'apparition de douleurs chroniques, et nécessiterait une attention particulière dans de futures études.

### 5.3.3. NEUROCHIMIE DES NEURONES PKC $\gamma$ DANS LA CORNE DORSALE

Dans la corne dorsale, la PKC $\gamma$  est exprimée exclusivement dans les neurones (Mori et al., 1990 ; Narita et al., 2004), majoritairement dans les couches IIi et IIIe au niveau spinal (Martin et al., 1999 ; Polgar et al., 1999a) et médullaire (Li et al., 2001a ; Miraucourt et al., 2007). Bien que la couche IIi soit dense en neurones PKC $\gamma$ , la proportion exacte de ces cellules dans cette couche n'a cependant jamais été reportée. Des neurones exprimant la PKC $\gamma$  ont également été reportés dans la couche IIe et dans la couche I mais l'immunoréactivité observée est beaucoup plus faible que dans la couche IIi (Polgar et al., 1999a). Ces neurones sont majoritairement excitateurs, 8% d'entre eux seulement exprimant également le GABA mais jamais la glycine (Polgar et al., 1999a). Les neurones exprimant la préprotrakinin B (PPTB), correspondant à 16% des neurones de la couche IIi, expriment également la PKC $\gamma$  et la calbindin pour 76% et 84% d'entre eux respectivement, mais pas la neurotensine (Polgar et al., 2006). A l'inverse, 76% des neurones positifs à la neurotensine expriment également la PKC $\gamma$  (Polgar et al., 1999a). Il



est cependant intéressant de noter que les cellules PPTB et GABA sont très modérément immunoréactives pour la PKC $\gamma$  à l'inverse de celles immunopositives pour la neurotensine (Polgar et al., 1999c ; Polgar et al., 2006). Les neurones PKC $\gamma$  n'expriment pas le récepteur  $\mu$  (Polgar et al., 1999a ; Huang et al., 2005 ; Hughes et al., 2008), la dynorphine (Gardell et al., 2004), la sous-unité GluR1 (Hughes et al., 2008), le récepteur à l'adénosine A1 (Schulte et al., 2003), la « prostatic acid phosphatase » (PAP) (Taylor-Blake and Zylka, 2010), le canal Kv4.3 (Huang et al., 2005), la NOS (Martin et al., 1999 ; Hughes et al., 2008) ou la parvalbumine (Martin et al., 1999). A l'inverse, ils expriment le récepteur NK1 dans la couche I (22% des neurones NK1), et la couche III (37% des neurones NK1) (Polgar et al., 1999a ; Hughes et al., 2008), la  $\alpha$ -CAMKII (Zeitz et al., 2004) et le récepteur à la glycine (Miraucourt et al., 2007). De plus, presque la moitié des neurones positifs à la somatostatine (45%) expriment également la PKC $\gamma$  (Polgar et al., 1999a). Parmi les neurones PKC $\gamma$ , 100% expriment le canal Kv4.2, 55% expriment le GluR2-3 et 25% la calbindin (Hughes et al., 2008 ; Hu and Gereau, 2011). Il a également été suggéré que la majorité des neurones PKC $\gamma$  de la couche I émettaient des prolongement vers les centres supérieurs, notamment le thalamus (Li et al., 2001b). Enfin, les neurones PKC $\gamma$  de la couche III reçoivent des connexions monosynaptiques de fibres afférentes de type A $\beta$  exprimant le transporteur VGLUT1 (Neumann et al., 2008). Il a récemment été suggéré que les fibres C-LTMRs exprimant le transporteur VGLUT3 contacteraient les neurones PKC $\gamma$  mais aucune analyse en microscopie électronique n'a été réalisée jusqu'à présent pour confirmer ou infirmer cette hypothèse (Seal et al., 2009). Il a également été suggéré que les fibres C positives à la substance P ou à l'IB4 contacteraient directement les neurones PKC $\gamma$  des couches I et IIe mais cette information n'a jamais été confirmée (Li et al., 2001a). De plus, les fibres C non peptidergiques exprimant le *mrgprd* ne contactent pas les neurones PKC $\gamma$  chez la souris (Zylka et al., 2005).

**5.3.4. MECANISMES D'ACTION DE LA PKC $\gamma$  DANS LA CORNE DORSALE**

En tant que PKC conventionnelle, la PKC $\gamma$  est dépendante du DAG et du calcium pour être active. Le DAG peut être induit indirectement par des récepteurs métabotropiques ou directement par un influx de calcium. En effet, une concentration suffisante de calcium intracellulaire, permet l'activation de la phospholipase C (PLC) et donc la production de DAG (Codazzi et al., 2006). Ce calcium peut être apporté par l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendant ou de canaux NMDA (Codazzi et al., 2006). L'activation de la PLC permet également la libération des stocks de calcium intracellulaire par l'intermédiaire de l'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>), permettant l'activation de la PKC $\gamma$ , bien que le caractère indispensable des stocks de calcium intracellulaire ait récemment été mis en doute (Codazzi et al., 2006). De manière intéressante, les isoformes  $\delta$ ,  $\beta$ 2 et  $\beta$ 4 de la PLC ont été corrélées avec l'activation de la PKC $\gamma$  dans l'hippocampe (Codazzi et al., 2006 ; Liu et al., 2008a). La spécificité d'une isoenzyme de PLC liée à l'activation de la PKC $\gamma$  dans la corne dorsale, comme la PLC $\beta$ 1 spécifiquement localisée dans la couche II (Montana et al., 2012), par exemple, n'a cependant pas été explorée.

A ce jour, les mécanismes d'action de la PKC $\gamma$  dans la corne dorsale et les voies de signalisation qui en découlent sont largement méconnus. De nombreux mécanismes d'action liés à la PKC $\gamma$  ont cependant été suggérés à partir d'études évaluant l'implication des PKCs, sans distinction d'une isoenzyme particulière. Ainsi, il est fréquent de retrouver dans la littérature certains mécanismes d'action attribués à la PKC $\gamma$ , comme son activation par les récepteurs NMDA (Xiaoping et al., 2010 : « The activation of NMDA receptors increases the generation of calcium ions and diacylglycerol (DAG) signals, subsequently activates the neuron specific PKC $\gamma$  isoform (Nishizuka, 1986 ; Chen and Huang, 1991)») ou par les récepteurs à la morphine  $\mu$  (Sanchez-Blazquez et al., 2010 : NMDAR-

permeated zinc takes control over the recruitment of PKC $\gamma$  to the MOR, (Chen and Huang, 1991) where the action of morphine on PLC $\delta$  (Bleakman et al., 2006) promotes PKC $\gamma$  activation (Kissin et al., 2000)), bien qu'aucun des travaux cités en références n'étudie spécifiquement la PKC $\gamma$ . Pourtant, il apparait clairement que les mécanismes d'action impliquant les PKCs sont différents d'une isoenzyme à l'autre, ou d'un tissu à l'autre (Velazquez et al., 2007). Par exemple, la PKC $\epsilon$  peut être activée directement par une augmentation de DAG alors que l'activation de la PKC $\gamma$  nécessite un apport de calcium (Barnett et al., 2007). De plus, la PKC $\gamma$  semble être impliquée dans les phénomènes de LTP dans l'hippocampe, et les phénomènes de LTD dans le cervelet (Saito and Shirai, 2002). De ce fait, une précaution particulière se doit d'être appliquée lors de l'interprétation des résultats obtenus avec des inhibiteurs non sélectifs de PKCs, souvent négligée dans de nombreuses publications. Ainsi, les résultats énoncés dans cette section ne seront tirés que d'études ciblant spécifiquement la PKC $\gamma$  dans la corne dorsale.

L'étude moléculaire *in vitro* de la PKC $\gamma$  dans la corne dorsale, à l'inverse de la PKC $\gamma$  du cervelet ou de l'hippocampe, se heurte à l'incapacité de produire une PKC $\gamma$  inductible à l'état adulte, qui permettrait de repérer anatomiquement ces cellules et d'en étudier les fonctions (Sakai et al., 1997 ; Sakai et al., 2004 ; Ding et al., 2005). Cette particularité de la PKC $\gamma$  dans la corne dorsale est encore inexplicée aujourd'hui mais soulève l'importance de la spécificité tissulaire de la PKC $\gamma$ . Une technique alternative a cependant été mise à contribution récemment, ouvrant des perspectives très intéressantes. Dans cette étude, les auteurs réalisent une inhibition de la PKC $\gamma$  par shRNA *in vivo* couplée à une analyse protéomique différentielle chez des animaux contrôles ou neuropathiques (Zou et al., 2012). Parmi les cibles principales modulées, se retrouvent des protéines impliquées dans la transmission et la modulation des neuromédiateurs, l'homéostasie cellulaire et le métabolisme, des protéines chaperonnes et antioxydantes, des protéines impliquées dans le

trafic synaptique de récepteurs et des protéines du cytosquelette. Le lien exact existant entre ces protéines et la PKC $\gamma$  n'est cependant pas encore élucidé.

Il a été suggéré que les mécanismes sous-tendant la sensibilisation centrale des neurones de la corne dorsale et ceux liés aux phénomènes de tolérance à la morphine seraient étroitement liés, et dépendants de la PKC $\gamma$  (Mayer et al., 1995 ; Mao et al., 1995a ; Mao et al., 1995b ; Mao et al., 1995c ; Mayer et al., 1999 ; Mao and Mayer, 2001). Il a par ailleurs été proposé qu'un traitement chronique de morphine impliquerait une voie PSD-95/NR1/PKC $\gamma$  (Huang et al., 2012). Dans ce schéma, l'activation des récepteurs NMDA augmenterait le calcium intracellulaire entraînant l'activation de la PKC $\gamma$  avec pour conséquence un recrutement accru des récepteurs NMDA à la membrane s'opposant aux effets de l'activation des récepteurs opioïdes. Cette hypothèse est en accord avec la nécessité de la PSD-95, protéine indispensable au trafic synaptique des récepteurs NMDA (Kornau et al., 1995), dans la tolérance à la morphine démontrée par traitement avec un oligonucléotide antisens contre la PSD-95 (Liaw et al., 2004). De plus, la PKC $\gamma$ , surexprimée lors d'injections chroniques de morphine (Mao et al., 1995c ; Granados-Soto et al., 2000), est nécessaire à l'hypersensibilité cutanée induite par la morphine (Zeitze et al., 2001 ; Narita et al., 2001 ; Sweitzer et al., 2004b ; Song et al., 2010), notamment liée à une activation astrocytaire (Narita et al., 2004). Cependant, il n'existe aucune évidence de l'existence d'un tel mécanisme lors de la sensibilisation centrale dans la corne dorsale. De plus, les neurones PKC $\gamma$  n'expriment pas le récepteur  $\mu$  (Polgar et al., 1999a) ni la prodynorphine (Marvizon et al., 2009). Cependant, il a récemment été montré que les récepteurs opioïdes  $\delta$  se trouvent majoritairement dans la couche IIi (Scherrer et al., 2009), mais la présence de ce récepteur ou des récepteurs opioïdes  $\kappa$  sur les neurones PKC $\gamma$  n'a jamais été testée.

### 5.3.5. LA PKC $\gamma$ ET LA DOULEUR

L'implication des PKCs dans la nociception a été démontrée dans différents modèles de douleurs. Cependant, la plupart de ces études ont utilisés des inhibiteurs non sélectifs de PKCs comme la Chelerythine ou le GF109203X, sans prendre en compte la spécificité fonctionnelle qui existe au sein des isoformes de PKCs (Velazquez et al., 2007). En effet, les résultats obtenus dans plusieurs études à l'aide d'animaux génétiquement modifiés dont le gène spécifique d'une isoforme unique de PKC a été supprimé, de vecteurs viraux antisens ou d'inhibiteurs sélectifs ont permis de mettre en évidence des fonctions spécifiques de certaines isoformes de PKCs dans la douleur (Velazquez et al., 2007). Ainsi, à nouveau, les résultats énoncés dans cette section ne proviennent que d'études étudiant spécifiquement la PKC $\gamma$ .

#### 5.3.5.1. ARGUMENTS BIOCHIMIQUES

La PKC $\gamma$  a été impliquée dans la douleur neuropathique et inflammatoire par l'analyse de son expression protéique, de l'expression de son ARNm, de sa phosphorylation ou de son adressage à la membrane (considérés comme le reflet de l'activation de cette kinase, Sossin, 2007). Ainsi, il a été montré que la PKC $\gamma$  est surexprimée dans des modèles de douleurs neuropathiques induit par section (SNT), ligature lâche (SNL) ou constriction (CCI) du nerf sciatique (Mao et al., 1995b ; Miletic et al., 2000 ; Wang et al., 2004b ; Labombarda et al., 2008 ; Di Cesare et al., 2010 ; Zou et al., 2011), infra-orbitaire (Nakajima et al., 2011) ou vagal (Furuta et al., 2009), chez le rat et du nerf sciatique (Honore et al., 2000 ; Narita et al., 2000 ; Inoue et al., 2004 ; Wang et al., 2004b ; Rashid and Ueda, 2005 ; Kerr and David, 2007) chez la souris. Son expression est également augmentée dans des modèles de douleurs inflammatoires induites par injections de CFA chez le rat (Martin et al., 1999) et la souris (Honore et al., 2000 ; Cheng et al., 2008).

Cependant une étude similaire de Igwe et Chronwall (2001) chez le rat ne confirme pas ce résultat. Enfin, la PKC $\gamma$  est surexprimée après traitement chronique à la morphine chez le rat (Granados-Soto et al., 2000 ; Lim et al., 2005 ; Cui et al., 2009 ; Song et al., 2010 ; Huang et al., 2012) et la souris (Narita et al., 2001 ; Narita et al., 2004), par oxyde nitrique (Matsushita et al., 2007), par traitement avec la pertussis toxin (Wen et al., 2003) ou par l'éthanol (Shumilla et al., 2005). De manière intéressante, aucune surexpression protéique de la PKC $\gamma$  n'a pu être identifiée après injection intrathécale d'un antagoniste de Rho-kinase responsable d'une hypersensibilité au froid (Ramer et al., 2004) ou dans des modèles de douleur cancéreuse (Schwei et al., 1999; Honore et al., 2000) bien qu'une surexpression de l'ARNm de la PKC $\gamma$  ait été relevée pour cette dernière (Xiaoping et al., 2010).

#### *5.3.5.2. ARGUMENTS GENETIQUES*

Depuis la génération d'une souris PKC $\gamma^{-/-}$  par Abeliovich et ses collaborateurs (1993a), de nombreux travaux utilisant ce modèle d'animal transgénique ont pu confirmer l'importance de la PKC $\gamma$  dans l'hypersensibilité douloureuse. Il a ainsi été montré que la PKC $\gamma$  ne joue pas de rôle majeur dans la douleur aiguë mais, au contraire, est nécessaire dans l'hypersensibilité thermique et mécanique, statique et dynamique, dans des modèles de douleur neuropathique (Malmberg et al., 1997b ; Ohsawa et al., 2001 ; Gardell et al., 2004 ; Wang et al., 2004b ; Zhao et al., 2011), inflammatoire (Martin et al., 2001 ; Zhao et al., 2011), après traitement chronique aux opioïdes (Zeitz et al., 2001 ; Celerier et al., 2004) ou à l'éthanol (Harris et al., 1995). En accord avec son rôle central, la délétion de la PKC $\gamma$  diminue la deuxième phase du test au formol, considérée comme le reflet d'une sensibilisation centrale (Dubuisson and Dennis, 1977 ; Wu et al., 2004), sans modifier la première phase, considérée comme résultant de l'activation directe des fibres nociceptives périphériques (Malmberg et al., 1997b ; Zeitz et al., 2001). De manière intéressante, les

souris PKC $\gamma$ <sup>-/-</sup> ne présentent plus de douleur spontanée ni d'hypersensibilité thermique après injection intrathécale d'un activateur non sélectif des PKCs, le phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu), suggérant que l'activation de la PKC $\gamma$  seule, contrairement aux autres isoformes, est nécessaire et suffisante pour induire une douleur (Niikura et al., 2008). Cependant, une publication récente comparant plusieurs lignées de souris génétiquement modifiées pour chaque isoforme de cPKCs démontre des résultats sensiblement différents de ceux obtenus jusqu'à présent (Zhao et al., 2011). Pour ce groupe, la PKC $\gamma$  n'interviendrait ni dans la douleur aiguë, ni dans la douleur observée lors du test au formol, mais seulement dans l'hypersensibilité thermique (pas mécanique) induite par injection de CFA et dans l'allodynie mécanique d'origine neuropathique, la composante thermique de cette dernière n'ayant pas été testé. La raison expliquant les différences observées dans la publication de Zhao (2011) par rapport au reste de la littérature n'est pas connue. Cependant, l'existence d'une variabilité génétique entre les lignées utilisées, connue pour influencer sur les tests à la douleur utilisés en recherche préclinique, pourrait expliquer ces différences (Lariviere et al., 2001 ; Bon et al., 2002).

#### *5.3.5.3. ARGUMENTS PHARMACOLOGIQUES*

Que ce soit par l'étude de l'expression de la PKC $\gamma$ , qui constitue une simple corrélation, ou par celle des souris KO PKC $\gamma$  non conditionnelles qui entraînent probablement une série des mécanismes de compensation, il serait inexact de conclure quant au rôle ou même à l'implication réelle de cette kinase dans la douleur. Cependant, plusieurs études visant à inhiber la PKC $\gamma$  dans différents modèles animaux ont pu renforcer le rôle de la PKC $\gamma$  dans la douleur. Ainsi, il a été montré que la deuxième phase du test au formol pouvait être prévenue par injection intrathécale d'un antagoniste sélectif pour la PKC $\gamma$ , le  $\gamma$ V5-3, chez le rat (Sweitzer et al., 2004a). La première phase du test au

formol n'étant pas modifiée, ce résultat confirme l'importance de la PKC $\gamma$  dans les phénomènes de sensibilisation centrale. De plus, dans un modèle de douleur neuropathique, l'hypersensibilité thermique et mécanique peut être réduite par prétraitement avec un lentivirus codant pour des shRNA spécifiques de la PKC $\gamma$  injecté en intrathécal (Zou et al., 2011). L'hypersensibilité thermique observée après traitement chronique à la morphine peut également être prévenue par injection intracérébroventriculaire (i.c.v.) d'oligonucléotides antisens dirigés contre la PKC $\gamma$  (Galeotti et al., 2006) ou par l'antagoniste  $\gamma$ V5-3 (Smith et al., 2007). En parallèle, la diminution de l'analgésie induite par le dioxyde nitrique observée après injections répétées peut être prévenue par injections i.c.v. d'oligonucléotides antisens contre la PKC $\gamma$ . Enfin, le  $\gamma$ V5-3 permet d'inhiber l'hypersensibilité mécanique, mais pas l'hypersensibilité thermique (Shumilla et al., 2005), ainsi que l'hyperexcitabilité des neurones spinaux (Li et al., 2005) observée après traitement à l'éthanol.

L'ensemble de ces études confirment le rôle de la PKC $\gamma$  dans l'hypersensibilité mécanique. Les résultats observés concernant les tests thermiques sont quant à eux controversés. Ainsi, lors d'un traitement localisé par injection intrathécale, Shumilla et ses collaborateurs (2005) démontre l'absence d'effet du  $\gamma$ V5-3 sur l'hypersensibilité thermique induite par l'éthanol, alors que d'autres études reportent un effet de l'injection intrathécale d'oligonucléotides antisens dirigés contre l'ARNm de la PKC $\gamma$  sur l'hypersensibilité thermique après traitement chronique à la morphine et en condition neuropathique respectivement (Song et al., 2010; Zou et al., 2011). La raison de cette différence n'est pas connue à l'heure actuelle mais pourrait refléter des différences concernant l'implication de la PKC $\gamma$  en fonction de l'étiologie de la douleur. Cependant, il est surprenant de constater que la PKC $\gamma$  de la corne dorsale puisse avoir un effet sur l'hypersensibilité thermique alors que les neurones qui l'expriment se trouvent



principalement dans la couche IIi (Polgar et al., 1999a) et ne répondent en majorité qu'à des stimulations uniquement mécaniques (Light and Lee, 2008). De plus, les neurones impliqués dans la thermosensation sont principalement situés dans les couches superficielles, et particulièrement dans la couche I (Patapoutian et al., 2003). De ce fait, il est possible que la diminution de l'hypersensibilité thermique observée après l'inhibition de la PKC $\gamma$  soit due aux neurones PKC $\gamma$  spinothalamiques de la couche I (Polgar et al., 1999a ; Li et al., 2001b) connus pour jouer un rôle important dans la thermosensibilité (Han et al., 1998 ; Craig et al., 2001 ; Craig and Dostrovsky, 2001 ; Andrew and Craig, 2001a ; Andrew et al., 2003). Cependant, cette hypothèse ne permet pas d'expliquer l'absence d'effet de l'inhibition de la PKC $\gamma$  sur l'hypersensibilité thermique observée par Shumilla et ses collaborateurs (2005). Néanmoins, seule cette dernière étude démontre la spécificité moléculaire du  $\gamma$ V5-3, et s'affranchit donc d'un effet isoenzyme-non-sélectif de cet inhibiteur de PKC $\gamma$ . Il est donc envisageable que l'effet analgésique des antisens contre la PKC $\gamma$  sur l'hypersensibilité thermique observé par Song (2010), Zou (2011) et leurs collaborateurs ne soit pas spécifique de l'inhibition de la PKC $\gamma$  (Singh et al., 2011).

#### *5.3.5.4. ARGUMENTS IMMUNOHISTOCHEMISTIQUES*

Outre les arguments génétiques et pharmacologiques, les neurones de la corne dorsale exprimant la PKC $\gamma$  semble participer au réseau neuronal sous-tendant la sensibilisation centrale. En effet, lors de l'hypersensibilité mécanique observée après désinhibition segmentaire glycinergique, les neurones PKC $\gamma$  de la couche IIi expriment le marqueur d'activité Fos, uniquement du côté ipsilatéral à la stimulation (Miraucourt et al., 2007). Dans un modèle de douleur neuropathique, il a également été montré que les neurones de la corne dorsale expriment le marqueur CREB avec une prédominance ipsilatérale, et colocalisent avec la PKC $\gamma$  dans la couche IIi (Ma and Quirion, 2001). Enfin, lors d'une

stimulation intense non nociceptive réalisée par une marche prolongée de 90 minutes, les neurones PKC $\gamma$  de la couche IIi expriment également la marqueur Fos (Neumann et al., 2008). Cependant, une récente étude ne reporte pas de colocalisation du marqueur p-ERK et de la PKC $\gamma$  dans les neurones de la couche IIi après stimulation mécanique dans le modèle de douleur inflammatoire induit par injection sous-cutanée de CFA (Gao and Ji, 2010). Cependant, il est surprenant de constater que les neurones p-ERK positifs observés par Gao et Ji (2010) sont localisés exclusivement dans les couches superficielles I et IIe alors qu'ils sont répartis dans les couches I-III dans une étude similaire (Cruz et al., 2005b). A la vue de ces différences, il semble que l'étude de l'implication de la PKC $\gamma$  dans le modèle de douleur inflammatoire induite par injection de CFA nécessite de futures investigations. A l'heure actuelle, il n'existe aucune autre publication montrant l'activation des neurones PKC $\gamma$  par analyse immunohistochimique dans des modèles animaux physiologiques ou pathologiques. Cependant, une étude réalisant une inhibition des contrôles descendant issus de la RVM par injection locale de kétamine montre une expression importante de Fos dans les neurones de la couche IIi de la corne dorsale, mais le phénotype de ces cellules n'a jamais été étudié (Bett and Sandkuhler, 1995). De plus, la localisation des récepteurs sérotoninergiques, et particulièrement les récepteurs 5-HT<sub>2A</sub>, sont majoritairement retrouvés dans la couche IIi dans la corne dorsale (Doly et al., 2004). Il serait donc intéressant d'étudier la localisation des récepteurs sérotoninergiques sur les neurones PKC $\gamma$  ainsi que l'activation de ces neurones par inhibition des voies descendantes issues de la RVM.

Dans la corne dorsale, il est intéressant de constater que les neurones PKC $\gamma$  sont parfaitement situés entre les couches superficielles répondant à des stimulations nociceptives et les couches profondes répondant à des stimulations mécaniques non nociceptives (Polgar et al., 1999a). Par ailleurs, ces neurones ne sont activés que lors de

situations particulières comme lors de l'allodynie mécanique dynamique induite par désinhibition glycinergique segmentaire (Miraucourt et al., 2007), ou lors d'une stimulation non nociceptive prolongée, comme une marche de 90 minutes (Neumann et al., 2008). De plus, ces neurones n'expriment pas le marqueur d'activité Fos après stimulation non nociceptive induite par un frottement réalisé à l'aide d'un pinceau doux (Miraucourt et al., 2007), ou nociceptive par injection sous-cutanée de formol chez le rat ou la souris (Basbaum, 1999 ; Neumann et al., 2008) ou dans un modèle de douleur neuropathique (Hughes et al., 2008). Ainsi, il semblerait que, dans des conditions bien particulières, les neurones PKC $\gamma$  participent au transfert des informations tactiles non nociceptives aboutissant dans la couche III vers les neurones nociceptifs des couches superficielles et seraient donc étroitement liés aux mécanismes sous-tendant l'allodynie mécanique. Leur localisation particulière dans la corne dorsale servirait donc de barrière entre informations nociceptives des couches superficielles et informations non nociceptives des couches profondes, celle-ci pouvant s'ouvrir dans des conditions pathologiques afin de protéger l'organisme.

En conclusion, il apparaît clairement aujourd'hui que la PKC $\gamma$  joue un rôle majeur dans les mécanismes de la sensibilisation centrale et les douleurs qui y sont associées. Ainsi, à la fin de l'année 2011, l'entreprise pharmaceutique BENITECH BIOPHARMA énonce la PKC $\gamma$  comme cible thérapeutique prioritaire et certifie clairement son engagement envers l'étude de la PKC $\gamma$  en recherche préclinique et clinique. Une étude de marché conduit par la Campbell Alliance serait actuellement en cours.

**6. LES QUESTIONS POSEES :**

L'objectif général de ce travail a été d'étudier l'implication des interneurons PKC $\gamma$  dans l'apparition de l'allodynie mécanique statique trigéminal et les mécanismes cellulaires associés. J'ai réalisé 3 projets distincts mais complémentaires. Le premier a été consacré à l'étude des mécanismes responsables de l'apparition d'une allodynie mécanique statique induit par injection sous-cutanée de capsaïcine. Le second a consisté à réaliser une étude anatomique des interneurons PKC $\gamma$  par une analyse en microscopies électronique et confocale et enfin le dernier projet a pour objectif d'étudier les propriétés morphologiques et électrophysiologiques des interneurons PKC $\gamma$ . Les deux premières études feront l'objet d'un chapitre indépendant tandis que la dernière, qui ne comporte que des résultats préliminaires, sera intégrée dans la discussion générale de ce manuscrit.

Projet 1 : Afin de déterminer les mécanismes segmentaires liés à l'allodynie mécanique statique, le modèle de douleur induit par injection sous-cutanée de capsaïcine a été choisi pour plusieurs raisons. D'une part, le fait que le modèle capsaïcine ai déjà été testé chez l'homme, permettra de mettre en relation les résultats obtenus dans une approche préclinique, avec une réalité clinique (LaMotte et al., 1983). D'autre part les symptômes observés chez l'homme lors de l'hyperalgésie secondaire provoquée par la capsaïcine sont principalement caractérisés par une brève douleur spontanée suivie d'une allodynie mécanique rapide et transitoire (LaMotte et al., 1991), permettant ainsi d'étudier précisément les mécanismes d'apparition et de disparition de ces symptômes. Dans un premier temps, il était donc essentiel de déterminer si cette spécificité symptomatique était également observée chez l'animal. J'ai donc caractérisé la réponse comportementale liée à

la douleur spontanée et celle liée à l'allodynie mécanique statique et dynamique après injection sous-cutanée de capsaïcine chez le rat.

Le réseau neuronal impliqué dans l'allodynie mécanique dynamique après désinhibition segmentaire glycinergique fait intervenir les couches I, IIe, III et IIIe de la corne dorsale (Miraucourt et al., 2007). Dans ce réseau activé après désinhibition segmentaire glycinergique et stimulation mécanique légère, les interneurons PKC $\gamma$  qui ne participent ni à la douleur spontanée, ni au transfert des informations tactiles dans des conditions physiologiques (Malmberg et al., 1997b), jouent un rôle fondamental (Miraucourt et al., 2007). Qu'en est-il lors de l'allodynie mécanique statique induite par injection sous-cutanée de capsaïcine ? J'ai alors cherché à identifier le réseau neuronal de la corne dorsale impliqué dans la douleur spontanée et celui impliqué dans l'allodynie mécanique statique après injection sous-cutanée de capsaïcine. Plusieurs techniques ont été utilisées : des techniques d'analyse comportementale, de neuroanatomie fonctionnelle, de biologie moléculaire et enfin de pharmacologie *in vivo*.

Une perturbation des contrôles inhibiteurs segmentaires GABAergiques permet d'induire sélectivement une allodynie mécanique statique (Miraucourt et al., 2009). L'allodynie mécanique statique observée après injection sous-cutanée de capsaïcine résulte-t-elle également d'une désinhibition GABAergique ? Après avoir caractérisé la réponse comportementale observée après désinhibition segmentaire GABAergique et le réseau neuronal activé dans la corne dorsale, l'implication des interneurons PKC $\gamma$  a été évaluée. J'ai ensuite étudié l'effet d'une augmentation des contrôles inhibiteurs segmentaires GABAergique sur la réponse comportementale observée après injection sous-cutanée de capsaïcine. Une approche électrophysiologique a également été utilisée afin de déterminer l'existence d'une désinhibition sur les interneurons PKC $\gamma$ . Les

résultats préliminaires de cette dernière étude seront intégrés dans la discussion générale de ce manuscrit.

Enfin, nous savons que les ROS ont une influence sur les contrôles inhibiteurs GABAergiques. En effet, l'augmentation de la concentration en ROS dans la corne dorsale permet de réduire sélectivement les contrôles segmentaires GABAergiques (Yowtak et al., 2011). Les ROS de la corne dorsale sont-ils impliqués dans l'allodynie mécanique statique induite par injection sous-cutanée de capsaïcine ? Pour répondre à cette question j'ai caractérisé la réponse comportementale observée après une surproduction de ROS et le réseau neuronal activé dans la corne dorsale. L'implication des interneurones PKC $\gamma$  a également été évaluée. J'ai ensuite étudié les effets d'une diminution de la concentration intracellulaire de ROS sur la réponse comportementale induite par l'injection sous-cutanée de capsaïcine.

Projet 2 : Lors de l'allodynie mécanique induite par désinhibition glycinergique, de nombreux neurones sont activés dans la couche Ili (Miraucourt et al., 2007). Parmi les différents types de neurones de la couche Ili (Polgar et al., 1999a), nous savons que les interneurones PKC $\gamma$  sont connus pour jouer un rôle fondamental dans les mécanismes responsables de l'allodynie mécanique (Malmberg et al., 1997b). Nous nous sommes donc intéressés plus particulièrement à cette population et avons tenté de déterminer la proportion de ces interneurones dans la couche Ili de la corne dorsale médullaire ? Pour ce faire, j'ai analysé leur répartition dans le noyau spinal du trijumeau, leur répartition laminaire ainsi que leur proportion au sein des couches superficielles.

Lors de l'allodynie mécanique dynamique induite par désinhibition segmentaire glycinergique, le transfert de l'information tactile véhiculée par les fibres A $\beta$  vers les neurones nociceptifs spécifiques des couches superficielles de la corne dorsale nécessite

l'activation des interneurons PKC $\gamma$  de la couche Iii (Miraucourt et al., 2007). Ces interneurons sont directement contactés par des fibres A $\beta$  réalisant des synapses asymétriques sur leur dendrites (Neumann et al., 2008). L'allodynie mécanique statique est principalement véhiculée par les fibres A $\delta$  et C non nociceptives (Treede and Cole, 1993). Les interneurons PKC $\gamma$  sont-ils également susceptibles d'être activés directement par les fibres A $\delta$  et C non nociceptives ? Pour répondre à cette question, j'ai analysé le type de synapses que reçoivent les interneurons PKC $\gamma$ , les conformations glomérulaires auxquelles ils participent et la présence éventuelle de synapses asymétriques VGLUT3-positives (caractéristiques des fibres C non nociceptives) sur ces neurones, par microscopies électronique et confocale.

Enfin, le rôle fonctionnel de la PKC $\gamma$  dans la corne dorsale est largement méconnu. Cette protéine, majoritairement membranaire au niveau postsynaptique dans la corne dorsale (Mori et al., 1990), semble néanmoins être liée au trafic membranaire des récepteurs NMDA (Huang et al., 2012). De plus, la localisation subcellulaire de la PKC $\gamma$  dans la corne dorsale semble différer de celle exprimée dans d'autres structures cérébrales (Kose et al., 1988). Quelle est la localisation synaptique de la PKC $\gamma$  dans la corne dorsale du sous noyau caudal du trijumeau ? Pour répondre à cette question, j'ai réalisé une analyse ultrastructurale de la PKC $\gamma$  au sein des synapses asymétriques de la corne dorsale et une analyse différentielle entre les neurones PKC $\gamma$  de la corne dorsale et ceux du cervelet, par une approche en microscopies électronique et confocale.

Projet 3 : Les neurones de la couche Iii de la corne dorsale sont hétérogènes à la fois morphologiquement et électrophysiologiquement (Graham et al., 2007). Cependant, certaines sous-populations neuronales dans la corne dorsale possèdent des caractéristiques morphologiques et électrophysiologiques. Ainsi, les neurones de la couche I projetant vers

le noyau parabrachial possèdent un mode de décharge décalé (Ruscheweyh et al., 2004). Ce type de décharge serait lié à la présence de canaux ioniques spécifiques comme les canaux Kv4.2 (canaux potassiques voltage-dépendant aux capacités d'activation et de désactivation rapide) responsables d'un courant  $I_A$  (Ruscheweyh and Sandkuhler, 2002 ; Hu and Gereau, 2011). Au niveau de la couche Iii, plusieurs études ont permis de distinguer les caractéristiques morphologiques et électrophysiologiques des neurones des couches superficielles (Grudt and Perl, 2002 ; Davies and North, 2009 ; Yasaka et al., 2010). Des travaux réalisés sur des neurones exprimant une GFP sous le contrôle du promoteur de la GAD chez la souris ont notamment déterminé les propriétés membranaires et de décharges de ces neurones inhibiteurs (Heinke et al., 2004). Mais qu'en est-il des neurones PKC $\gamma$  ? Pour répondre à cette question, j'ai effectué des enregistrements en patch-clamp des neurones PKC $\gamma$  localisés dans la couche Iii et caractérisé leurs propriétés passives. J'ai également étudié leur morphologie ainsi que leur arborisation dendritique. L'étude de la localisation laminaire de l'arborisation dendritique neuronale et des prolongements axonaux des neurones PKC $\gamma$  permettra non seulement d'évaluer quelles types de fibres sont susceptibles d'activer ces neurones mais aussi quelles sont leurs cibles potentielles.



CHAPITRE 2 :  
L'HYPERSENSIBILITE MECANIQUE  
STATIQUE INDUITE PAR L'ACTIVATION  
DES FIBRES C NECESSITE UNE  
SURPRODUCTION DE ROS,  
UNE DESINHIBITION GABAERGIQUE ET  
UNE ACTIVATION DES INTERNEURONES  
PKC $\gamma$

*« Un fait n'est rien par lui-même, il ne vaut que par l'idée qui s'y rattache ou par la preuve qu'il fournit. »*

*Claude Bernard*

Dans cette première partie, j'ai cherché à déterminer quelles étaient les mécanismes et les réseaux neuronaux impliqués dans l'allodynie mécanique statique trigéminal après injection sous-cutanée de capsaïcine chez le rat. Les résultats obtenus lors de cette étude ont permis de mettre à jour deux réseaux neuronaux distincts activés respectivement lors de la douleur aiguë provoquée par l'injection de la capsaïcine, et lors de l'allodynie mécanique statique qui s'en suit. Aucune allodynie mécanique dynamique n'a été observée dans ces conditions. Le réseau polysynaptique impliqué lors de l'allodynie mécanique statique démasqué par la capsaïcine implique les neurones PKC $\gamma$  de la couche III. Une allodynie mécanique statique ainsi qu'une activation d'un réseau neuronal similaire à celui observé après capsaïcine ont été observées après injection intracisternale d'un antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub> ou d'un donneur de ROS. Ici encore, l'implication des interneurons PKC $\gamma$  a été mise en évidence. A nouveau, aucune allodynie mécanique dynamique n'a été observée dans ces conditions. Un traitement par injection intracisternale d'un antagoniste de la PKC $\gamma$ , d'un agoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub> ou d'un piègeur de ROS permet de prévenir l'allodynie mécanique statique observée après injection sous-cutanée de capsaïcine ainsi que l'activation du réseau polysynaptique qui y est associée. En conclusion, les résultats obtenus dans cette première partie suggèrent que l'allodynie mécanique statique observée après injection sous-cutanée de capsaïcine résulte d'une désinhibition GABAergique segmentaire provoquée par une surproduction de ROS. Cette désinhibition permettrait de libérer les interneurons PKC $\gamma$  de la couche III, leur permettant ainsi de transférer l'information tactile vers les neurones nociceptifs spécifiques des couches superficielles et de provoquer ainsi une allodynie mécanique statique. L'inhibition pharmacologique de la PKC $\gamma$  prévient l'apparition de ce symptôme lorsqu'il est provoqué par l'activation de fibres nociceptives C par la capsaïcine, ouvrant ainsi des perspectives thérapeutiques très intéressantes.

**TITLE**

Capsaicin induces secondary static mechanical allodynia through ROS production, GABAergic disinhibition and PKC $\gamma$  activation in the rat medullary substantia gelatinosa

**AUTHORS**

Cédric Peirs<sup>1</sup>, Nathalie Bourgois<sup>1,2</sup>, Alain Artola<sup>1</sup>, Radhouane Dallel<sup>1</sup>

**INSTITUTIONAL AFFILIATIONS**

<sup>1</sup>Inserm/UdA U1107, Neuro-Dol: Trigeminal Pain and Migraine, Université d'Auvergne, Faculté de Chirurgie Dentaire, 11 Boulevard Charles de Gaulle, Clermont-Ferrand, 63000, France

<sup>2</sup>CHU Clermont-Ferrand, 58 rue Montalembert, Clermont-Ferrand, 63000, France

**RUNNING HEAD**

Static mechanical allodynia: ROS, GABA and PKC $\gamma$

**CORRESPONDING AUTHOR**

Radhouane Dallel

Inserm/UdA U1107, Neuro-Dol: Trigeminal Pain and Migraine, Université d'Auvergne, Faculté de Chirurgie Dentaire, 11 Boulevard Charles de Gaulle, Clermont-Ferrand, 63000, France

Tel: +33-(0)4-7317-7313

Fax: +33-(0)4-7317-7306

## GRANT INFORMATION

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Fondation des Gueules Cassées, Université d'Auvergne-Clermont1 (France) and Région Auvergne

## ABSTRACT

Inflammatory and neuropathic chronic pain syndromes are characterized by pain hypersensitivity, manifest as spontaneous pain, allodynia and hyperalgesia. It is becoming clear that each of these pain symptoms involves specific mechanisms. We investigated in the rat medullary dorsal horn (MDH) the mechanisms and neuronal network subserving two pain symptoms, spontaneous pain and the static form of mechanical allodynia, induced by capsaicin injection into the vibrissa pad. Spontaneous pain increases p-ERK1/2 immunoreactivity exclusively in cells within the most superficial MDH laminae (I-IIo), whereas evoked pain enhances it in cells located in both I-IIo and Iii-III laminae, including lamina Iii PKC $\gamma$  neurons. Associated with intracisternal (i.c.) application of a GABA<sub>A</sub> receptor antagonist, bicuculline, or reactive oxygen species (ROS) donor, *tert*-Butyl hydroperoxide (t-BOOH), tactile stimulation produces the very same static mechanical allodynia and extended p-ERK1/2 immunoreactivity pattern, as with capsaicin. Conversely, i.c. application of a PKC $\gamma$  antagonist, KIG31-1, or a ROS scavenger, N-*tert*-Butyl- $\alpha$ -phenylnitron (PBN), or a GABA<sub>A</sub> receptor agonist, muscimol, prevents capsaicin-induced allodynia and its associated p-ERK1/2 elevation. Interestingly, neither KIG31-1 nor PBN suppresses capsaicin-induced spontaneous pain. Therefore, spontaneous and touch-evoked pains are generated by different mechanisms. Expression of static mechanical allodynia, but not spontaneous pain, appears to be gated by both PKC $\gamma$  activation in lamina Iii neurons and disruption of segmental GABA<sub>A</sub>ergic inhibition, mediated, at least in part, by ROS release.

Dissecting out the mechanisms responsible for the production of each pain symptom will reveal novel biological and molecular targets which will lead to new drugs, specific for each pain.

## **KEY WORDS**

Pain, secondary hyperalgesia, mechanical allodynia, static, dynamic, disinhibition, trigeminal, medullary dorsal horn (MDH), subnucleus caudalis (Sp5c), lamina II, protein kinase C gamma (PKC $\gamma$ ), capsaicin, transient receptor potential vanilloïde-1 (TRPV1), bicuculline, *tert*-Butyl hydroperoxide (t-BOOH), N-*tert*-Butyl- $\alpha$ -phenylnitron (PBN), reactive oxygene species (ROS),  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), extracellular regulated kinase (ERK), KIG31-1

## **INTRODUCTION**

Chronic pain syndromes initiated by tissue damage and inflammation (inflammatory pain) or lesions to the nervous system (neuropathic pain) are characterized by pain hypersensitivity. Key symptoms of persistent pain syndromes are spontaneous pain (pain experienced in the absence of any identifiable peripheral stimulus), hyperalgesia (enhanced pain perception to noxious stimuli) and allodynia (pain in response to normally innocuous stimulus). Moreover, two types of mechanical allodynia can be clinically discriminated in patients with neuropathic syndromes: a static one evoked by applying a gentle pressure on the skin and a dynamic one elicited by lightly stroking it. It is becoming clear that these different chronic pain symptoms are subserved by specific mechanisms. Identifying the mechanisms responsible for the production of pain and correlating them with symptoms and signs should make it possible to dissect out the very mechanisms that operate in individual patients and design optimal treatments (Dallel and Voisin, 2001; Baron, 2006).

Mechanical allodynia requires that innocuous inputs elicit a nociceptive percept or response. Primary afferents terminate within dorsal horn (DH) according to their sensory modality: fine primary afferents, either lightly myelinated A $\delta$ - or unmyelinated C-fibers, including most nociceptors, innervate the more superficial laminae, I and outer II (Ilo), whereas touch-sensing, low-threshold mechanoreceptors (LTMRs), including all heavily myelinated A $\beta$ -fiber as well as A $\delta$ - and C-LTMR fibers, terminate in deeper laminae, inner II (Ili) to V (Seal et al., 2009; Li et al., 2011; for review see Todd, 2010). Under physiological conditions, information from different modalities are kept separate and neurons in lamina I, one of the main nociceptive output pathways from the spinal cord to the brain, do not receive direct input from A-fiber LTMRs. However, such inputs can be unmasked after disruption of inhibitory mechanisms (Torsney and MacDermott, 2006; Miraucourt et al., 2007). Thus our group has recently established that the dynamic form of mechanical allodynia is due to the unmasking of usually blocked local, ventral to dorsal circuits following disinhibition by, specifically, glycine receptor antagonists (Miraucourt et al., 2007; Miraucourt et al., 2009; Miraucourt et al., 2011). Such circuits begin in lamina Ili with neurons expressing the gamma isoform of protein kinase C (PKC $\gamma$ ) on which A $\beta$ -LTMRs, that mediate this allodynia (Campbell et al., 1988; Yamamoto et al., 2008), terminate (Neumann et al., 2008) and end on NK1 receptor negative (NK1R $-$ ) lamina I projection neurons. The dorsally directed flow of information through these local circuits is gated by the levels of both activation of PKC $\gamma$  in lamina Ili neurons and glycinergic inhibition (Miraucourt et al., 2007).

Preclinical and clinical studies have shown that dynamic and static allodynia have different mechanisms (Ochoa and Yarnitsky, 1993; Gonzalez et al., 2000) and do not respond to opiates (Dickenson and Sullivan, 1986; Scherrer et al., 2009; Miraucourt et al., 2009). Moreover, the flow of information underlying static mechanical allodynia appears to be gated

by specifically segmental GABA<sub>A</sub>ergic, and not glycinergic, mechanisms (Miraucourt et al., 2009). In the present study, using behavioural, immunohistochemical and western blotting techniques, we investigated the mechanisms and neuronal network underlying the static form of mechanical allodynia and compared them with those of another pain symptom, spontaneous pain, in the rat trigeminal system.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animals**

Adult male Sprague–Dawley rats (250 - 275 g) were obtained from Charles River (L'Arbresle, France) and maintained in a controlled environment (light on 19.00 - 7.00, 22°C). Water and food were provided *ad libitum*. Rats were housed 3-4 per cage. All efforts were made to minimize the number of animals used. The experiments followed the ethical guidelines of the International Association for the Study of Pain and ethical guidelines of the Directive 2010/63/UE of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purpose. Animals were randomly assigned to control or treated groups.

### **Chemicals**

Capsaicin, bicuculline, Muscimol, *tert*-Butyl hydroperoxide (t-BOOH) and N-*tert*-Butyl- $\alpha$ -phenylnitron (PBN) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). KIG31-1 was obtained from Kai Pharmaceuticals (San Francisco, CA, USA). It is conjugated to Tat, a peptide carrier, via a cysteine-cysteine bond at its N terminus. KIG31-1 competes with activated PKC $\gamma$  for binding to the isoenzyme-specific docking proteins, receptors for activated C kinase (RACK). This strategy prevents PKC $\gamma$  translocation in an isoenzyme-specific manner (Mochly-Rosen and Gordon, 1998; Churchill et al., 2009). Linking of KIG31-1 to Tat enables efficient transfer of the peptide into cells (Chen et al.,

2001). Drug doses were selected based on literature (Cao et al., 2011; Yowtak et al., 2011; Lapirot et al., 2011) and our preliminary experiments. No motor impairment has been reported with intrathecal or intracisternal injections of muscimol up to 1  $\mu$ g (Dirig and Yaksh, 1995), PBN up to 100  $\mu$ g (Wei et al., 2011) and KIG31-1 up to 500  $\mu$ g (Miraucourt et al., 2007).

### **Behavioral testing**

For investigating the effects of capsaicin upon spontaneous pain and static or dynamic mechanical allodynia, rats were first habituated to stand on their hind paws on the experimenter sleeve and lean against the experimenter chest in a quiet room under red light, according to a method adapted from Ren (Ren, 1999). The habituation required half an hour during which the animals were tested with von Frey filaments or gentle air puffing using a calibrated pump onto a region between the right vibrissa pad and the upper right lip, with carefully avoiding touching any of the vibrissa. Ascending and descending series of von Frey filaments (1.0–12 g; Bioseb, France) were used. Each filament was tested five times at intervals of at least 5 s. The habituation session was repeated for 2 days. At the end of the second habituation session, all rats responded to 6.0 g von Frey filament with only a simple detection, showing a non-aversive response. On the third day, the actual testing session took place. Rats were then placed in an observation field (0.6 x 0.6 m square) under red light for a 30-minutes habituation session during which the experimenter reached into the cage to apply a von Frey filament (6 g; Bioseb) or gentle air puffing on the face of the animal. At the end of the habituation period, rats received a subcutaneous (s.c.) injection of capsaicin (25  $\mu$ g in 25  $\mu$ l endolipid) into the right vibrissa pad using a 30G gauge needle as previously described (Pelissier et al., 2002). After injection, animals were placed back within the test box for a 15-minutes observation period recorded by a digital camera (Sanyo, USA) followed by a 60-



minutes mechanical-testing period. Von Frey filament (6 g; Bioseb) or gentle air puffing (1 s duration) was applied every 3 minutes onto a region between the right vibrissa pad and the upper right lip. Each series of stimulation consisted of 5 stimulations applied every 10 s. Stimulation was carried out when the rat was in a sniffing/no locomotion state: with four paws placed on the ground, neither moving nor freezing. The distance to the target from which the stimulus was applied varied from 2 to 5 cm. The tip of the pump or the von Frey filament was moved toward the target from behind the animal so that it could not see it. The recording time was divided into five 3-minute blocks. For each block, a nociceptive score was determined by measuring the time (in seconds) animals spent rubbing the injected area (vibrissa pad) with the forepaw and not the hind paw. The behavioral responses to mechanical stimulations were observed and quantified according to the method developed by Vos et al. (Vos et al., 1994). A rat's response to mechanical stimulation consisted of one or more of the following elements: (1) detection, rats turn head toward stimulus; (2) withdrawal reaction, rats turn head away or pulls it briskly backward when stimulation is applied (a withdrawal reaction is assumed to include a detection element preceding the head withdrawal and therefore consists of two responses elements); (3) escape/attack, rats avoid further contact with the stimulus, either passively by moving their body away from the stimulus, or actively by attacking the tip of the pump or the hair; (4) asymmetric grooming, rats display an uninterrupted series of at least three wash strokes directed to the stimulated area. The following rank-ordered descriptive responses categories were formulated according to the study by Vos et al. (Vos et al., 1994): no response, non aversive response, mild aversive response, strong aversive response, prolonged aversive behavior. Each category was given a score (0-4) based on the number of observed response elements. According to Vos et al. (Vos et al., 1994), the score was assumed to reflect the magnitude of the aversiveness evoked by the mechanical stimulation. Score was equal to zero in case of absence of response. A mean score value was then calculated for each

stimulation series. In all case, behavior was analyzed by a second experimenter who was blinded to animal treatment.

### **Intracisternal injections**

For experiments investigating the effects of KIG31-1 (50 pmoles in 5  $\mu$ l, conjugated to Tat carrier), PBN (100  $\mu$ g dissolved in 5  $\mu$ l aCSF) or muscimol (250 ng dissolved in 5  $\mu$ l aCSF) upon capsaicin-induced spontaneous pain or mechanical allodynia, animals were briefly (<3 minutes) anesthetized using a mask with 2% halothane and received an intracisternal (i.c.) injection of either drug or vehicle alone (5  $\mu$ l) using a 10  $\mu$ l Hamilton syringe (Miraucourt et al., 2011). aCSF consisted of: 150 mM Na<sup>+</sup>, 3 mM K<sup>+</sup>, 0.8 mM Mg<sup>2+</sup>, 1.4 mM Ca<sup>2+</sup>, 155 mM Cl<sup>-</sup>, pH 7.4, 295 mosmol.kg<sup>-1</sup>. Following recovery (< 2 minutes), rats were placed in the test box for a 30-minute habituation period. Immediately after the 30-minutes habituation period, animals received a s.c. capsaicin injection as described above. Spontaneous pain and behavioral responses to mechanical stimulations were evaluated, as described above.

For experiments investigating the effects of bicuculline (0.05  $\mu$ g dissolved in 5  $\mu$ l aCSF) or t-BOOH (50, 100, 250 ng dissolved in 5  $\mu$ l aCSF) upon mechanical allodynia, animals were briefly (<3 minutes) anesthetized using a mask with 2% halothane and received an i.c. injection of either drug or aCSF alone (5  $\mu$ l) using a 10  $\mu$ l Hamilton syringe. Immediately following recovery (< 2 minutes), rats were placed in the test box for a 45-minutes (for bicuculline) or a 125-minutes (for t-BOOH) period test. Behavioral responses to mechanical stimulations were evaluated, as described above.

### **Immunohistochemistry**

In a first series of experiments (group 1), we assessed p-ERK1/2 activation under capsaicin-induced spontaneous and mechanical-evoked pain. Rats were anaesthetized deeply with urethane (1.5 g / kg i.p.) as previously described (Miraucourt et al., 2011). Twenty minutes after the injection, the depth of the anesthesia was tested, and rats received a s.c. injection of capsaicin (25  $\mu$ g in 25  $\mu$ l endolipid) or vehicle alone into the right vibrissa pad using a 30 G gauge needle. Five minutes (for spontaneous pain) or thirty minutes (for mechanical-evoked allodynia) later, innocuous stimulation of the right upper lip was performed using a von Frey filament (6 g) during three minutes at a velocity of 0.5 Hz to a locus well outside the s.c. injection site, in the anticipated region of secondary hyperalgesia, around and over a distance of 0.5 - 1 cm from the s.c. injection site. Two minutes later, rats were perfused transcardially with warm heparinized saline followed by cold 0.1 M phosphate-buffered solution pH 7.6 (PB) containing 4% paraformaldehyde (PFA) and 0.03% picric acid. The brainstem was removed and post-fixed for 2 h in the same fixative solution at 4°C and then cryoprotected in 30% sucrose diluted in 0.05 M Tris-buffered saline pH 7.4 (TBS) at 4°C for 24 h. 30  $\mu$ m coronal sections were cut on a freezing microtome and collected in TBS before being processed. Free-floating sections were placed in 2% normal goat serum (NGS) diluted in TBS containing 0.25% bovine serum albumin (BSA) and 0.3 % Triton X-100 (TBS-BSA-T) for 2 h before incubation in a polyclonal rabbit primary antibody directed against p-ERK1/2 (1:3000, Cell Signaling Technology, USA) diluted in TBS-BSA-T overnight at room temperature. Sections were then incubated 90 minutes with the secondary antibody goat anti-rabbit conjugated with peroxidase (1:400, Vector Laboratories, Les Ulis, France). Immunoreactivity was revealed using nickel-diaminobenzidine (Vector Laboratories). In all cases, sections were rinsed in TBS several times, between and after each incubation, and finally transferred onto gelatinized slides before being coverslipped using DPX mountant for histology. Specificity controls consisted of the omission of the primary

antibody and incubation of sections in inappropriate secondary antibodies. In all these control experiments, no specific staining was evident. A few selected sections were mounted separately and slightly counterstained with cresyl violet to help delineate the limits of the medullary dorsal horn (MDH).

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

In a third series of experiments (group 3), rats were treated as in group 1 but received an i.c. injection of KIG31-1 (500 pmoles in 5  $\mu$ l, conjugated to Tat carrier), PBN (100  $\mu$ g dissolved in 5  $\mu$ l aCSF) or vehicle alone 20 minutes after induction of anesthesia. Capsaicin (25  $\mu$ g / 25  $\mu$ l) was given 30 minutes later.

In a fourth series of experiments (group 4), we assessed p-ERK1/2 activation under bicuculline- or t-BOOH-induced mechanical allodynia. Rats were anaesthetized deeply with urethane (1.5 g / kg i.p.) as previously described. Twenty minutes after the injection, the depth of the anesthesia was tested, and rats received an i.c. injection of bicuculline (3  $\mu$ g dissolved in 5  $\mu$ l aCSF) or t-BOOH (100 ng dissolved in 5  $\mu$ l aCSF). Thirty minutes (for bicuculline) or sixty minutes (for t-BOOH) later, innocuous stimulation of the right upper lip was performed as described above. Tissues were collected and p-ERK1/2 activation or p-ERK1/2 activation in PKC $\gamma$  interneurons were assessed as described above.

### **Western blot**

Rats were anesthetized deeply with urethane (1.5 g / kg i.p.). Twenty minutes after the injection, the depth of the anesthesia was tested, and rats received a s.c. injection of capsaicin (25  $\mu$ g in 25  $\mu$ l endolipid) or vehicle alone into the right vibrissa pad using a 30 G gauge needle. Five minutes (for spontaneous pain) or thirty minutes (for mechanical-evoked allodynia) later, innocuous stimulation of the right upper lip was performed using a von Frey filament (6 g) during three minutes at a velocity of 0.5 Hz as described above. Immediately after, rats were decapitated for rapid tissue harvesting. Tissues from the MDH, divided into ipsilateral and contralateral side, were dissected and rapidly frozen on dry ice and stored at -80°C for later use. Proteins were extracted and homogenized in 500  $\mu$ l RIPA buffer (Sigma-Aldrich) containing 0.5% of protease inhibitors (Sigma-Aldrich) and 0.5% of phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich). The homogenate was centrifuged at 4°C for 30 minutes at 22,000 g to remove the debris. Protein concentration of the supernatants was measured with the Micro Lowry total protein kit (Sigma-Aldrich) with a spectrophotometer (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) at a wavelength of 750 nm. The supernatants (30  $\mu$ g) were heated for 5 minutes at 95°C and loaded onto 5% stacking / 12% separating SDS-

polyacrylamide gels for the protein separation. Electrophoresis was carried out in Tris 25 mM, glycine 192 mM, and 1% of SDS buffer for 2 h at 80 V, until the reference colorant reached the end of the gel. Proteins were then electrophoretically transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore, Molsheim, France) in a buffer containing Tris 25 mM, glycine 192 mM, 10% of SDS and 20% of methanol for 45 minutes at 100 V. The equality of sample loading in each lane was confirmed by Ponceau Red membrane staining following the blotting. The membrane was blocked with 6% non-fat dry milk and subsequently incubated overnight at 4°C with the polyclonal rabbit primary antibody directed against the phosphorylated form of PKC $\gamma$  (Thr514) (1:1000, Cell Signaling Technology) diluted in 0.05 M TBS, 5% BSA and 0.1% Tween<sup>®</sup> 20 with moderate shaking. The membrane was then incubated 1 h at room temperature with an HRP-conjugated donkey anti-rabbit secondary antibody (1:10,000, GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France) diluted in 0.05 M TBS, 6% non-fat dry milk and 0.1% Tween<sup>®</sup> 20. ECL Plus solution (GE Healthcare) was used to visualize a blot. The blot was captured using an automated image acquisition system (Fusion FX7; Vilber Lourmat, Marne la Vallée, France) for 1–10 minutes. The blot was then incubated in a stripping buffer (Tris 62.5 mM,  $\beta$ -mercaptoethanol 100 mM and 2 % SDS, pH 6.7) for 30 minutes at 50°C and reprobated 1 h at room temperature with a polyclonal rabbit primary antibody directed against  $\beta$ -actin (1:1000; Cell Signaling Technology) diluted in 0.05 M TBS, 3% BSA and 0.1% Tween<sup>®</sup> 20 as loading control.

### **Data and statistical analysis**

Neurons containing p-ERK1/2 immunoreactivity in the MDH were photographed using a Nikon Optiphot 2 coupled with a 3CCD Sony DXC-950P digital camera at x10 and x20 magnifications. Neurons containing p-ERK1/2 and/or PKC $\gamma$  immunofluorescence in the MDH were photographed using a fluorescent Zeiss Axioplan 2 Imaging microscope coupled

with a Hamamatsu C4742–95 digital camera, by switching between FITC and Rhodamine filter sets at x20 and x40 and x100 magnifications. Each image was then analyzed with Fiji-ImageJ 1.47 program (<http://rsbweb.nih.gov/ij> ; Schindelin et al., 2012). p-ERK1/2 and/or PKC $\gamma$  neurons were counted according to their location in the different laminae of the MDH from 7 different sections, each taken at a given rostrocaudal plane within the MDH. Intervals of 400  $\mu$ m between planes ensured that cells were counted only once. The delineation of the MDH was based upon the Paxinos and Watson atlas (Paxinos and Watson, 1997) and our own myeloarchitectural atlas as determined by our previous work (Miraucourt et al., 2011). The data is expressed as the sum of the total number of labeled cells counted from all 7 sections that were analyzed in each animal. Pictures were optimized for visual quality using Fiji-ImageJ 1.47 program at the end of analysis.

Data of capsaicin-induced spontaneous pain were analyzed using a Mann-Whitney test or an unpaired Student's *t* test after passed the Kolmogorov-Smirnov normality test. Data of capsaicin-, bicuculline- or t-BOOH-induced allodynia were analyzed using an ANOVA with repeated measures followed by a Bonferroni *post hoc* test. Data of dose efficiency of t-BOOH-induced allodynia were analyzed using a one-way ANOVA followed by a Dunnett's *post hoc* test. Data of p-ERK1/2 positive cells were analyzed using a Mann-Whitney test or a one-way ANOVA followed by a Newman-Keuls *post hoc* test. Bands obtained by Western blot were quantified by densitometry using Fusion capt<sup>®</sup> and Bio1D<sup>®</sup> software (Vilber Lourmat). Comparison of the means of densitometric analysis was made using a one-way ANOVA followed by a Newman-Keuls *post hoc* test. In all cases,  $p < 0.05$  was considered to be statistically significant. All quantitative analysis, graphs and statistical tests were performed on GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.0. Figures were made using CorelDRAW<sup>®</sup> 12.

## RESULTS

### **Capsaicin induces transient spontaneous pain and secondary static mechanical allodynia**

In a first series of experiments, we assessed capsaicin-induced spontaneous and mechanical evoked-pain in adult rats. s.c. injection of capsaicin (25  $\mu$ g in 25  $\mu$ l) into the vibrissa pad caused an intense nociceptive rubbing behavior lasting for  $138 \pm 19$  s (compared with  $28 \pm 9$  s following s.c. injection of endolipid alone; unpaired Student's *t* test,  $p < 0.001$ ;  $n = 5$ ) (Fig. 1A). Spontaneous pain was maximum within the first 5 minutes after s.c. capsaicin injection and completely disappeared within 15 minutes. Capsaicin-induced mechanical allodynia was evaluated once spontaneous pain had ceased (first measurement: 15 minutes after injection). The two forms, static and dynamic, of mechanical allodynia were assessed by applying the two types of mechanical stimuli, air puffing and 6.0 g von Frey filament, respectively, to the zone of secondary hyperalgesia adjacent to capsaicin injection. A 6.0 g von Frey filament was selected since it was the highest stimulus intensity that evoked a non-aversive response in habituated rats. s.c. capsaicin produced a dramatic static mechanical allodynia with the highest mean score reaching  $3.5 \pm 0.2$  s (ANOVA with repeated measures,  $p < 0.001$ ,  $n = 5$ ) on a scale ranging from 0 to 4 (Fig. 1B). Allodynia was maximum at the first measurement, 15 minutes after s.c. injection, and progressively decreased within 45 minutes. Interestingly, s.c. capsaicin did not change significantly response scores to air puff stimulation (Fig. 2B).

Peripheral noxious, but not non-noxious stimuli are known to induce ERK1/2 activation in dorsal horn neurons in normal conditions (Ji et al., 1999). However, this rule changes after injuries so that tactile stimulation can lead to ERK activation in SCDH neurons (Hao et al., 2005). Therefore, we evaluated p-ERK1/2-immunoreactivity to determine which neurons within the medullary dorsal horn (MDH) are activated by the two types of stimuli, noxious s.c. capsaicin injection and mechanical stimulation in allodynic conditions (Fig. 1 C-E). As



previously noted (Ji et al., 1999; Shimizu et al., 2006; Noma et al., 2008), s.c. capsaicin induced a strong p-ERK1/2 immunoreactivity, detected as early as 5 minutes after injection. Moreover, it had a highly restricted anatomical localization. p-ERK1/2 immunoreactive neurons were exclusively located in the most superficial laminae (I-IIo) (Fig. 1 C, E), mainly within the maxillary area of the MDH where inputs from the vibrissa pad terminate (not shown). Increase in p-ERK1/2 immunoreactive neurons was exclusively found ipsilateral to the s.c. capsaicin injection compared to endolipid ( $144 \pm 19.3$  vs.  $43 \pm 18$ , Newman-Keuls *post hoc*,  $p < 0.001$ ,  $n = 5$ ). No p-ERK-immunoreactivity was evoked contralateral to the s.c. capsaicin injection compared to endolipid ( $13.0 \pm 6.3$  vs.  $9.2 \pm 3.2$  immunoreactive neurons, Newman-Keuls *post hoc*,  $p > 0.05$ ,  $n = 5$ ). Stimulation of the upper lip with a 6.0 g von Frey filament, in allodynic conditions, further increased p-ERK1/2 immunoreactivity within MDH (Fig. 1 D, E). Interestingly, such an increase could only be observed 30 minutes ( $234.8 \pm 34.4$  vs.  $139.6 \pm 11.3$ , Newman-Keuls *post hoc*,  $p < 0.01$ ,  $n = 5$ ) but not 5 minutes ( $154.7 \pm 9.8$  vs.  $144 \pm 19.3$ , Newman-Keuls *post hoc*,  $p > 0.05$ ,  $n = 5$ ), after s.c. capsaicin injection. Moreover, it occurred not only in the most superficial laminae (I-IIo) ( $198.8 \pm 28.9$  vs.  $130.2 \pm 9.9$ , Newman-Keuls *post hoc*,  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ) but also in deeper laminae (IIi-IIIo) ( $44.4 \pm 7.2$  vs.  $9.4 \pm 2.7$ , Newman-Keuls,  $p < 0.001$ ,  $n = 5$ ) (Fig. 1 D, E). Interestingly, no increase in p-ERK1/2 immunoreactivity was observed after dynamic stimulation of the upper lip with a soft paintbrush 30 minutes after s.c. capsaicin injection ( $106 \pm 17.9$  vs.  $139.6 \pm 11.3$  immunoreactive neurons, Newman-Keuls *post hoc*,  $p > 0.05$ ,  $n = 5$ ). This suggests that the neuronal circuits underlying capsaicin-induced spontaneous pain and mechanical-evoked pain are different and that neurons in laminae IIi and IIIo are recruited by only mechanical stimulation in allodynic conditions.

### **PKC $\gamma$ neurons are involved in capsaicin-induced mechanical allodynia**

Laminae Iii and IIIo contain a class of interneurons that selectively concentrate the gamma isoform of protein kinase C (PKC $\gamma$ ) (Malmberg et al., 1997; Polgar et al., 1999). That selective blockade of PKC $\gamma$  prevents both static mechanical allodynia in neuropathic rats (Malmberg et al., 1997; Martin et al., 2001) and mechanical allodynia following glycinergic disinhibition (Miraucourt et al., 2007) suggests that activation of PKC $\gamma$  is a prerequisite for the expression of mechanical allodynia. Is activation of PKC $\gamma$  also required for capsaicin-induced static mechanical allodynia? To address this question, we first assessed whether PKC $\gamma$  immunopositive interneurons do express p-ERK1/2 following stimulation with von Frey filaments (6 g) in capsaicin-treated animals. Using double immunocytochemical labeling, we found that  $30.5 \pm 2.8\%$  ( $n = 4$ ) of the p-ERK1/2 immunopositive cells in laminae Iii-IIIo of the MDH after such mechanical stimulation in allodynic conditions were also PKC $\gamma$  immunopositive (Fig. 2A).

Expression of phosphorylated PKC $\gamma$  (p-PKC $\gamma$ ) – the active form of PKC $\gamma$  (Sossin, 2007) – in the MDH was directly measured using the Western blot method (Fig. 2B). Whereas p-PKC $\gamma$  was not modified after s.c. capsaicin alone, it was strongly increased when the skin was stimulated with von Frey filaments (6 g) in capsaicin-treated rats (to  $451.4 \pm 39.6\%$  of baseline; Newman-Keuls *post hoc*,  $p < 0.001$ ,  $n = 4$ ). Interestingly, such increase in p-PKC $\gamma$  protein level was only observed when the skin was stimulated 30 minutes, but not 5 minutes (to  $75.4 \pm 14.5\%$  of baseline; Newman-Keuls *post hoc*,  $p > 0.05$ ,  $n = 4$ ), after capsaicin injection. Altogether, these results indicate that PKC $\gamma$ -immunoreactive neurons are activated and p-PKC $\gamma$  protein levels increased following mechanical stimulation in capsaicin-treated rats in allodynic conditions. They suggest that PKC $\gamma$  neurons are involved in the neuronal circuits underlying capsaicin-induced static mechanical allodynia, but not spontaneous pain.

To examine whether activation of PKC $\gamma$  is necessary for the expression of capsaicin-induced mechanical allodynia, we tested the effect of i.c. application of the selective PKC $\gamma$

antagonist, KIG31-1 (50 pmoles in 5  $\mu$ l). i.c. KIG31-1 had no effect on spontaneous pain induced by s.c. capsaicin ( $69.8 \pm 12.3$  s vs.  $83.6 \pm 17.5$  s, Unpaired Student's *t* test,  $p = 0.54$ ,  $n = 5$ ) (Fig. 2C) but it completely prevented static mechanical allodynia (ANOVA with repeated measures,  $p < 0.001$ ,  $n = 5$ ) (Fig. 2D) and strongly reduced mechanical stimulation-evoked increase in p-ERK1/2 immunoreactive neurons ( $123.5 \pm 27.9$  vs.  $274.0 \pm 34.2$ , Mann-Whitney test,  $p < 0.05$ ,  $n = 4$ ), 30 minutes after capsaicin injection (Fig. 2E).

### **GABAergic disinhibition mediates capsaicin-induced mechanical allodynia**

Local application of GABA<sub>A</sub> receptor antagonists results in mechanical allodynia (Roberts et al., 1986; Sivilotti and Woolf, 1994). Moreover, direct microinjection of the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist, bicuculline (50  $\mu$ mol in 0.5  $\mu$ l), into MDH produces specifically a static mechanical allodynia (Miraucourt et al., 2009). The observation that capsaicin and GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition produce the very same form of mechanical allodynia, raises the possibility that capsaicin acts through GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition.

To test this hypothesis, we first assessed the behavioral effect of i.c. application of a very low dose of bicuculline (0.05  $\mu$ g in 5  $\mu$ l): it induced a static, but not a dynamic, mechanical allodynia (Fig. 3) that lasted for about 30 minutes. Then, using p-ERK1/2 immunoreactivity, we explored which neuronal circuits are activated in MDH by mechanical stimulation under GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition. Without any treatment, no p-ERK1/2 immunoreactivity was evoked by 2-minutes stimulation of the skin with von Frey filaments (6 g) ( $24.6 \pm 5.2$  vs.  $17 \pm 6.8$ , Newman-Keuls *post hoc* test,  $p > 0.05$ ,  $n = 5$ ) (Fig. 4C). However, an increase in the number of p-ERK1/2 immunoreactive neurons was seen in the laminae I-IIo as early as 2 minutes following bicuculline alone compared with that after aCSF ( $55 \pm 4.4$  vs.  $15 \pm 5.8$ , Newman-Keuls *post hoc* test,  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ) (Fig. 4A, C). On the other hand, when the cutaneous stimulation was applied after i.c. bicuculline, it rapidly evoked p-ERK1/2

immunoreactivity within MDH neurons in both I-IIo ( $119.6 \pm 16.7$  vs.  $55 \pm 4.4$ , Newman-Keuls *post hoc* test,  $p < 0.001$ ,  $n = 5$ ) and Iii-IIIo ( $58.6 \pm 12.9$  vs.  $8.4 \pm 1.8$ , Newman-Keuls *post hoc* test,  $p < 0.001$ ,  $n = 5$ ) superficial laminae (Fig. 4B, C). It has to be noted, however, that p-ERK1/2 immunoreactivity was also slightly enhanced in deeper laminae (IIIi-V) ( $20 \pm 5.7$  vs.  $2.8 \pm 1$ , Newman-Keuls *post hoc* test,  $p < 0.001$ ,  $n = 5$ ) (Fig. 4B, C). Moreover,  $20.7 \pm 1.5\%$  ( $n = 4$ ) of p-ERK1/2 immunoreactive neurons in laminae Iii-IIIo were also PKC $\gamma$  immunoreactive, indicating that this class of interneurons participate in neuronal circuits activated by mechanical stimulations under GABA<sub>A</sub>ergic désinhibition (Fig. 4D-F). These results suggest that the very same neuronal circuits are activated during capsaicin and GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition-induced static mechanical allodynias.

That subcutaneous injection of capsaicin and local GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition produce the very same behavioural and anatomical effects strongly suggests that capsaicin induces a static mechanical allodynia through GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition in the MDH. To directly test this hypothesis, we examined the effect of local application of the GABA<sub>A</sub> receptor agonist, muscimol, on capsaicin-induced spontaneous and evoked pain. *i.c.* muscimol (250 ng in 5  $\mu$ l) completely prevented the nociceptive rubbing behavior within the first minutes after capsaicin injection ( $33.25 \pm 10.8$  s vs.  $138.19 \pm 19.1$  s, Mann-Whitney test,  $p < 0.01$ ,  $n = 4$ ) (Fig. 5A) and mechanical allodynia (ANOVA with repeated measures,  $p < 0.001$ ,  $n = 4$ ) (Fig. 5B).

### **GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition is due to ROS release**

We next probed the mechanism underlying this dramatic GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition. It has been suggested that ROS production, which is increased after *s.c.* capsaicin (Schwartz et al., 2008), can specifically decrease GABA release through a presynaptic mechanism (Yowtak et al., 2011).

We therefore tested whether i.c. application of a ROS donor, t-BOOH, can cause a static mechanical allodynia and unmask the same neuronal circuit as GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition and s.c. capsaicin injection. i.c. applied t-BOOH induced a static, but not a dynamic, mechanical allodynia (Fig. 6A-D). Interestingly, increasing t-BOOH concentration did not enhance the maximum score of allodynia – the highest mean score was the same for 150 ng ( $2.92 \pm 0.3$ , n = 5) and 250 ng ( $3 \pm 0.3$ , n = 5) – but rather the duration of t-BOOH-induced mechanical allodynia (Fig. 6A). The area under the curve was thus correlated with the dose of t-BOOH (Fig. 6B). At the highest t-BOOH concentration (250 ng in 5  $\mu$ l), mechanical allodynia lasted for more than 2 h (Fig. 6A), and a transient dynamic mechanical allodynia was present during the first minutes (Fig. 6C).

We next examined whether ERK is involved in t-BOOH-induced mechanical allodynia. The vibrissa pad was stimulated with von Frey filaments for 2 minutes, 60 minutes after i.c. injection of t-BOOH (100 ng in 5  $\mu$ l), that is, at the peak allodynic score at this concentration (see Fig. 6A). i.c. injection of t-BOOH alone had no effect on p-ERK1/2 levels ( $12.5 \pm 3.3$  vs.  $17 \pm 6.8$ , Newman-Keuls *post hoc* test,  $p > 0.05$ , n = 4) (Fig. 7A, C). But p-ERK1/2 immunoreactivity was detected within MDH neurons as early as 2 minutes after mechanical stimulation when it was applied in t-BOOH treated animals ( $139.3 \pm 23.5$  vs.  $12.5 \pm 3.3$ , Newman-Keuls *post hoc* test,  $p < 0.001$ , n = 4) (Fig. 7B, C). p-ERK1/2 immunoreactive neurons were located in both I-Ilo ( $68.5 \pm 14.2$  vs.  $7.2 \pm 2.2$ , Newman-Keuls *post hoc* test,  $p < 0.01$ , n = 4) and Ii-IIIo ( $68 \pm 19.6$  vs.  $4.2 \pm 1.4$ , Newman-Keuls *post hoc* test,  $p < 0.01$ , n = 4) superficial laminae (Fig. 7B, C). Moreover,  $26.8 \pm 5.2\%$  (n = 4) of p-ERK1/2 immunoreactive neurons in laminae Ii-IIIo, were also PKC $\gamma$  immunoreactive, indicating that, again, this class of interneurons participate in the neuronal circuits activated by mechanical stimulation after t-BOOH treatment (Fig. 7D-F). These results suggest that, again, the very same neuronal

circuits are activated during capsaicin-, GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition- and t-BOOH-induced static mechanical allodynia.

That s.c. capsaicin and ROS release both produce a specific static mechanical allodynia and unmask the very same neuronal circuits within MDH strongly suggest that capsaicin induces a static mechanical allodynia through ROS release. To directly test this hypothesis, we examined the effect of local application of the ROS-scavenger, PBN, on capsaicin-induced pain and p-ERK1/2 elevation. i.c. PBN (100  $\mu$ g in 5  $\mu$ l) had no effect on the capsaicin-induced spontaneous pain (124.6  $\pm$  21.5 s vs. 138.19  $\pm$  19.1 s, unpaired Student's *t* test, *p* = 0.65, *n* = 5) (Fig. 8A) but almost completely prevented static mechanical allodynia (ANOVA with repeated measures, *p* < 0.001, *n* = 5) (Fig. 8B). Similarly, it reduced p-ERK1/2 levels (108.3  $\pm$  8.9 vs. 334.8  $\pm$  13.6, Mann-Whitney test, *p* < 0.05, *n* = 4) to those following capsaicin alone (Fig. 8C).

## **DISCUSSION**

These results show that the injection of a small dose of capsaicin into the vibrissa pad of rats produces a brief episode of spontaneous pain and a longer, specifically static mechanical allodynia, lasting about 60 min. p-PKC $\gamma$  becomes elevated concomitantly only with the expression of static mechanical allodynia. Both spontaneous and evoked pain increase the number of p-ERK1/2 immunoreactive cells in the MDH. However, the two p-ERK1/2 immunoreactivity patterns are different. Whereas p-ERK1/2 immunoreactivity is exclusively detected in cells within the most superficial laminae (I-IIo) after spontaneous pain, it is present in cells located in both I-IIo and Iii-III laminae, including lamina Iii PKC $\gamma$  neurones, following evoked pain. In the presence of either the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist, bicuculline, or ROS donor, t-BOOH, tactile stimulation produces the very same static but not dynamic form of mechanical allodynia and pattern of ERK phosphorylation as with capsaicin.

Although, neither tactile stimulation nor bicuculline nor t-BOOH alone significantly induced spontaneous pain or ERK phosphorylation. That local application of either a PKC $\gamma$  antagonist or a ROS scavenger has no effect on spontaneous pain but prevents capsaicin-induced both static mechanical allodynia and the associated enhanced p-ERK1/2 immunoreactivity strongly suggests that PKC $\gamma$  activation and ROS release are specifically involved in the expression of the static form of mechanical allodynia compared to spontaneous pain.

We compared the mechanisms and neuronal networks within MDH underlying two different pain symptoms: spontaneous pain and static mechanical allodynia. The former was produced by s.c. injection of capsaicin. The latter was manifested by stimulating the vibrissa pad with normally innocuous von Frey filaments in the area of capsaicin-induced secondary hyperalgesia. Intradermal injection or high-dose topical application of capsaicin produces in humans a remarkable set of sensory changes including ongoing pain, hyperalgesia, and mechanical allodynia (Simone et al., 1989; LaMotte et al., 1991; Koltzenburg et al., 1992; Sang et al., 1996). Spontaneous pain is immediate during the injection of capsaicin and typically reaches a peak within the first 5-15 s. It usually declines rapidly within the next few minutes and then more gradually until it disappears within 10-30 min after injection. Spontaneous pain is accompanied progressively by the formation of two areas of secondary mechanical hypersensitivity. The smallest area shows dynamic mechanical allodynia and the largest, mechanical hyperalgesia (LaMotte et al., 1991; Hughes et al., 2002; Scanlon et al., 2006). However, secondary hyperalgesia is actually characterized by a leftward shift to the left of the stimulus-response function for both noxious and innocuous mechanical stimuli such as von Frey filaments (see LaMotte et al., 1991; Kilo et al., 1994; Magerl et al., 1998). Therefore, it shows both hyperalgesia and allodynia to static mechanical stimuli. Moreover, the duration of spontaneous pain as well as the areas of secondary mechanical

hypersensitivities are dose-dependent (Scanlon et al., 2006). Therefore, static mechanical allodynia can be specifically manifested following s.c. capsaicin provided that, on the one hand, the dose of capsaicin is small enough to reduce as much as possible the duration of spontaneous pain and the area of dynamic mechanical allodynia, and, on the other hand, stimuli are applied rather far away from the injection site.

p-PKC $\gamma$  is enhanced concomitantly with the expression of static mechanical allodynia but not spontaneous pain. PKC $\gamma$  interneurons are known to play a key role in the processing of tactile inputs in pathological conditions (Miraucourt et al., 2007). Our results are thus consistent with previous evidence showing that genetic (Malmberg et al., 1997; Zou et al., 2011) as well as pharmacological blockade of PKC $\gamma$  (Sweitzer et al., 2004; Miraucourt et al., 2007) prevents both type of mechanical allodynia.

Static mechanical allodynia is manifested in two other experimental conditions: following i.c. application of either the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist, bicuculline, or the ROS donor, t-BOOH. It is long known that, under segmental GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition, light touch can elicit pain (Roberts et al., 1986; Sivilotti and Woolf, 1994; Cao et al., 2011). Our group has recently established in anesthetized animals that the mechanical allodynia obtained following segmental GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition is exclusively static (Miraucourt et al., 2009). The present results confirm such conclusion in behaving animals. It has also been previously shown that intra-theally applied t-BOOH reduces mechanical thresholds (Schwartz et al., 2008; Yowtak et al., 2011). Our results extend this observation by showing that segmental application of a ROS donor induces exclusively a static mechanical allodynia. Altogether, these results establish that rats show a static, but not a dynamic, mechanical allodynia in three experimental situations: in the area of capsaicin-induced secondary mechanical hypersensitivity, under segmental GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition and in the presence of a ROS



donor. Conversely, local application of either a PKC $\gamma$  antagonist or a ROS scavenger or a GABA<sub>A</sub> receptor agonist prevents capsaicin-induced both static mechanical allodynia and ERK1/2 phosphorylation. These results are consistent with the hypothesis that static mechanical allodynia requires both activation of PKC $\gamma$  and disruption of GABA<sub>A</sub>ergic inhibition mediated, at least in part, by ROS release. Capsaicin-induced on-going excitation of peptide-containing C- and some A $\delta$ -fiber primary afferents (Holzer, 1991; O'Neill et al., 2012), via the activation of peripheral TRPV1 (Caterina et al., 1997), would reduce specifically segmental GABA<sub>A</sub>ergic inhibition via ROS release. It becomes clear that ROS are involved in central sensitization associated with acute and chronic inflammatory and neuropathic pain. On the one hand, peripheral inflammation (Schwartz et al., 2008; Westlund et al., 2010) and nerve ligation (Park et al., 2006) induce a significant increase in ROS within MDH and spinal DH. On the other hand, segmental application of ROS scavengers reduces spontaneous pain mechanical hypersensitivity in animal models of both inflammatory (present results; Lee et al., 2007; Schwartz et al., 2008) and neuropathic pain (Kim et al., 2004; Yowtak et al., 2011). There is also evidence for ROS selectively attenuating GABA<sub>A</sub>ergic, but not glycinergic, inhibitory transmission via a presynaptic mechanism. In whole-cell recorded lamina II neurons, bath-applied t-BOOH decreases the frequency of specifically GABA<sub>A</sub> receptor-mediated mIPSCs without altering their amplitudes, and this effect is reversed by PBN (Yowtak et al., 2011). Together with our present finding that capsaicin-induced mechanical allodynia is prevented by segmental application of a GABA<sub>A</sub> receptor agonist, muscimol, these results are all consistent with the hypothesis that capsaicin-induced on-going activation of peptide-containing C-fiber primary afferents specifically reduces GABA<sub>A</sub>ergic inhibition via ROS release.

However other mechanisms are possible. That systemically applied PBN blocks the phosphorylation of the NMDA receptor subunit 1 in DH induced by either tight ligation of the L5 spinal nerve or intradermal injection of capsaicin (Gao et al., 2007), suggests that ROS might also potentiate excitatory synaptic transmission. However, bath applied t-BOOH appears to have no effect on excitatory transmission in DH (Yowtak et al., 2011, but see Lee et al., 2010). Muscimol pretreatment might prevent mechanical allodynia, not by counteracting the effect of released ROS but, rather, by silencing the intrinsic MDH neuronal network. This would account for its effect on spontaneous pain. It is also possible that activation of peptide-containing C-fiber primary afferents directly reduces GABA<sub>A</sub>ergic inhibition. Activation of peptide-containing C-fiber primary afferents can be mimicked, in *in vitro* slices, by activating TRPV1 on afferent terminals. Bath-applied capsaicin increases mEPSC via a presynaptic mechanisms (Yang et al., 1998; Baccei et al., 2003; Pan and Pan, 2004). Bath applied capsaicin has also been reported to increase spontaneous IPSCs in lamina II neurons, via a presynaptic mechanism, likely via enhanced excitation of inhibitory interneurons (Ferrini et al., 2007; Ferrini et al., 2010). However, interestingly, it has recently been shown that TRPV1 are also expressed on GABAergic spinal interneurons. As in other brain areas (Gibson et al., 2008; Grueter et al., 2010; Chavez et al., 2010), activation of such postsynaptic TRPV1 depresses excitatory inputs on GABAergic interneurons (Kim et al., 2012). Thus, activation of TRPV1 by endogenous agonists (for review see Szolcsanyi and Sandor, 2012) by depressing excitatory transmission on specifically GABA interneurons, should, at the end, reduce GABA<sub>A</sub>ergic inhibition. (Zhou et al., 2007; Zhou et al., 2008) observed, on the one hand, a decrease in the frequency of spontaneous IPSCs in half of their recorded neurons, and, on the other hand, an increase in that of spontaneous glycinergic IPSCs in most of their recorded neurons. Can combined increased glycinergic and decreased GABAergic IPSCs lead to an overall increased frequency of spontaneous IPSCs?

s.c. capsaicin alone is able to phosphorylate ERK1/2 in the MDH. As in DH (Ji et al., 1999), p-ERK1/2 immunoreactive neurons are restricted largely to lamina I-IIo (present results; Noma et al., 2008), where peptide-containing C-fiber primary afferents terminate (for review see Todd, 2010). Such activation is likely produced by the on-going activity of peptide-containing C-fiber primary afferents which is concomitant with spontaneous pain (for review see Holzer, 1991; O'Neill et al., 2012). When tactile stimulation is applied either during capsaicin-induced secondary mechanical hypersensitivity, or in the presence of i.c. bicuculline or t-BOOH, it also produces robust ERK1/2 phosphorylation in superficial MDH. However, p-ERK1/2 immunoreactive neurons are now located in lamina I-IIo and lamina Ii-III and include lamina Ii PKC $\gamma$ -immunoreactive neurons. Such p-ERK1/2 immunoreactivity pattern is consistent with that observed, *in vitro*, in spinal cord slices following A $\beta$ -fiber stimulation in the presence of bicuculline (Baba et al., 2003) and, *in vivo*, in rats with spinal nerve ligation after gentle tactile stimulation (Hao et al., 2005). It is worthwhile to mention that neither tactile stimulation, nor i.c. bicuculline, nor ROS donor alone significantly phosphorylates ERK1/2 in lamina Ii-III. Enhanced p-ERK1/2 in lamina I-IIo under i.c. bicuculline alone is likely due to a small increase in spontaneous activity of the superficial MDH neuronal network (see Schoffnegger et al., 2008). That ERK1/2 phosphorylation is only concomitant with the manifestation of either spontaneous pain or static mechanical allodynia, is consistent with the conclusion that it is specific to noxious stimuli (Ji et al., 1999). These results suggest that the neuronal networks underlying the expression of these two types of pain are different.

Our results reveal that the manifestation of static mechanical allodynia is associated with the activation of polysynaptic circuits involving lamina Ii PKC $\gamma$  neurons after GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition. Our group has previously demonstrated that dynamic mechanical

allodynia is associated with the activation of polysynaptic, ventral to dorsal circuits, that convey low-threshold mechanoreceptive inputs to lamina I projection neurons, leading to a miscoding of the information by cells that normally only detect painful stimuli (Miraucourt et al., 2007). Neuronal circuits, associated with static and dynamic mechanical allodynia, appear to be very similar: they both encompass neurons in lamina I to IIi-III, including lamina IIi PKC $\gamma$  neurons. Since the distinct populations of neurons – A $\beta$ -, A $\delta$ - and C-fiber low-threshold mechanoreceptors – detecting innocuous touch, all terminate, though in different laminae, within or below lamina IIi (Li et al., 2011), such polysynaptic, ventral to dorsal circuits are required to drive up tactile information toward lamina I output neurons. However, are neuronal circuits underlying static and dynamic mechanical allodynia the same? Likely not. First, both static and dynamic mechanical allodynia can manifest alone (Ochoa and Yarnitsky, 1993). Second, whereas PKC $\gamma$  neurons are key elements of circuits underlying static and dynamic mechanical allodynia, the former are activated after disinhibition by GABA<sub>A</sub> receptor antagonists and the latter after disinhibition by glycine receptor antagonists (present results; Miraucourt et al., 2007), suggesting that the dorsally directed flows of information underlying static and dynamic mechanical allodynia are under different inhibitory controls. Therefore, sensory modalities mediating the two types of allodynia need to be transmitted by different primary afferents. Clinical studies have established that dynamic mechanical allodynia is mediated by A $\beta$ -fiber primary afferents (Campbell et al., 1988). Static mechanical allodynia might thus be mediated by A $\delta$ - and/or C-fiber primary afferents (Treede and Cole, 1993; Ochoa and Yarnitsky, 1993; Field et al., 1999; Seal et al., 2009). Similarly, static and dynamic tactile informations should also reach lamina I output neurons through different local, ventral to dorsal circuits, with different inhibitory controls. There is some evidence for region-specific specialization of inhibition in superficial DH. But it is rather laminar-specific. Thus, in adult rats, synaptic inhibition on lamina I neurons is exclusively

mediated through glycine receptors whereas that on lamina II neurons through either glycinergic or GABA<sub>A</sub>ergic (Keller et al., 2001). Tonic inhibition on inhibitory neuron is primarily mediated through glycine receptors at the lamina II/III border and through GABA<sub>A</sub> receptors in lamina I-IIo (Takazawa and MacDermott, 2010).

In summary, these results provide additional evidence for different mechanisms underlying different pain symptoms. Thus spontaneous pain and static mechanical allodynia are associated with the activation of different local circuits within MDH, encompassing laminae I-IIo and laminae I-IIo and Iii-III, respectively. Two mechanisms, PKC $\gamma$  activation and ROS release, are exclusively involved in the expression of mechanical allodynia. Finally, local circuits underlying the static form of mechanical allodynia are gated by the levels of ROS release, GABA<sub>A</sub>ergic inhibition and activation of PKC $\gamma$  in lamina Iii neurons. These gates are thus partly different from those on the local circuits for dynamic mechanical allodynia: PKC $\gamma$  and glycinergic inhibition (Miraucourt et al., 2007; Miraucourt et al., 2009). Dissecting out the mechanisms that may operate to produce these different pains is likely to lead to specific pharmacological, surgical or physical therapy interventions for each identified mechanism involved in a particular syndrome.

#### **CONFLICT OF INTEREST STATEMENT**

None of the authors has any conflict of interest to declare.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank A Descheemaeker for technical help and A.M. Gaydier for secretarial assistance.

## **ROLE OF AUTHORS**

All authors had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Study concept and design: AA, CP and RD. Acquisition of data: CP and NB. Analysis and interpretation of data: AA, CP and RD. Drafting of the manuscript: AA, CP and RD. Obtained funding: RD. Study supervision: RD.

## **LITTERATURE CITED**

- Baba H, Ji RR, Kohno T, Moore KA, Ataka T, Wakai A, Okamoto M, Woolf CJ. 2003. Removal of GABAergic inhibition facilitates polysynaptic A fiber-mediated excitatory transmission to the superficial spinal dorsal horn. *Mol Cell Neurosci* 24(3):818-30.
- Baccei ML, Bardoni R, Fitzgerald M. 2003. Development of nociceptive synaptic inputs to the neonatal rat dorsal horn: glutamate release by capsaicin and menthol. *J Physiol* 549(Pt 1):231-42.
- Baron R. 2006. Mechanisms of disease: neuropathic pain--a clinical perspective. *Nat Clin Pract Neurol* 2(2):95-106.
- Campbell JN, Raja SN, Meyer RA, Mackinnon SE. 1988. Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury. *Pain* 32(1):89-94.
- Cao J, Yang X, Liu YN, Suo ZW, Shi L, Zheng CR, Yang HB, Li S, Hu XD. 2011. GABAergic disinhibition induced pain hypersensitivity by upregulating NMDA receptor functions in spinal dorsal horn. *Neuropharmacology* 60(6):921-9.

- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389(6653):816-24.
- Chavez AE, Chiu CQ, Castillo PE. 2010. TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus. *Nat Neurosci* 13(12):1511-8.
- Chen L, Wright LR, Chen CH, Oliver SF, Wender PA, Mochly-Rosen D. 2001. Molecular transporters for peptides: delivery of a cardioprotective epsilonPKC agonist peptide into cells and intact ischemic heart using a transport system, R(7). *Chem Biol* 8(12):1123-9.
- Churchill EN, Qvit N, Mochly-Rosen D. 2009. Rationally designed peptide regulators of protein kinase C. *Trends Endocrinol Metab* 20(1):25-33.
- Dallel R, Voisin D. 2001. Towards a pain treatment based on the identification of the pain-generating mechanisms? *Eur Neurol* 45(2):126-32.
- Dickenson AH, Sullivan AF. 1986. Electrophysiological studies on the effects of intrathecal morphine on nociceptive neurones in the rat dorsal horn. *Pain* 24(2):211-22.
- Dirig DM, Yaksh TL. 1995. Intrathecal baclofen and muscimol, but not midazolam, are antinociceptive using the rat-formalin model. *J Pharmacol Exp Ther* 275(1):219-27.
- Ferrini F, Salio C, Lossi L, Gambino G, Merighi A. 2010. Modulation of inhibitory neurotransmission by the vanilloid receptor type 1 (TRPV1) in organotypically cultured mouse substantia gelatinosa neurons. *Pain* 150(1):128-40.

- Ferrini F, Salio C, Vergnano AM, Merighi A. 2007. Vanilloid receptor-1 (TRPV1)-dependent activation of inhibitory neurotransmission in spinal substantia gelatinosa neurons of mouse. *Pain* 129(1-2):195-209.
- Field MJ, Bramwell S, Hughes J, Singh L. 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):303-11.
- Gao X, Kim HK, Chung JM, Chung K. 2007. Reactive oxygen species (ROS) are involved in enhancement of NMDA-receptor phosphorylation in animal models of pain. *Pain* 131(3):262-71.
- Gibson HE, Edwards JG, Page RS, Van Hook MJ, Kauer JA. 2008. TRPV1 channels mediate long-term depression at synapses on hippocampal interneurons. *Neuron* 57(5):746-59.
- Gonzalez MI, Field MJ, Hughes J, Singh L. 2000. Evaluation of selective NK(1) receptor antagonist CI-1021 in animal models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 294(2):444-50.
- Grueter BA, Brasnjo G, Malenka RC. 2010. Postsynaptic TRPV1 triggers cell type-specific long-term depression in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci* 13(12):1519-25.
- Hao S, Mata M, Wolfe D, Huang S, Glorioso JC, Fink DJ. 2005. Gene transfer of glutamic acid decarboxylase reduces neuropathic pain. *Ann Neurol* 57(6):914-8.
- Holzer P. 1991. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* 43(2):143-201.



- Hughes A, Macleod A, Growcott J, Thomas I. 2002. Assessment of the reproducibility of intradermal administration of capsaicin as a model for inducing human pain. *Pain* 99(1-2):323-31.
- 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):1114-9.
- Keller AF, Coull JA, Chery N, Poisbeau P, De Koninck Y. 2001. Region-specific developmental specialization of GABA-glycine cosynapses in laminae I-II of the rat spinal dorsal horn. *J Neurosci* 21(20):7871-80.
- Kilo S, Schmelz M, Koltzenburg M, Handwerker HO. 1994. Different patterns of hyperalgesia induced by experimental inflammation in human skin. *Brain* 117 ( Pt 2):385-96.
- Kim HK, Park SK, Zhou JL, Tagliabatella G, Chung K, Coggeshall RE, Chung JM. 2004. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 111(1-2):116-24.
- Kim YH, Back SK, Davies AJ, Jeong H, Jo HJ, Chung G, Na HS, Bae YC, Kim SJ, Kim JS, Jung SJ, Oh SB. 2012. TRPV1 in GABAergic interneurons mediates neuropathic mechanical allodynia and disinhibition of the nociceptive circuitry in the spinal cord. *Neuron* 74(4):640-7.
- Koltzenburg M, Lundberg LE, Torebjork HE. 1992. Dynamic and static components of mechanical hyperalgesia in human hairy skin. *Pain* 51(2):207-19.
- 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):1821-31.
- Lee I, Kim HK, Kim JH, Chung K, Chung JM. 2007. The role of reactive oxygen species in capsaicin-induced mechanical hyperalgesia and in the activities of dorsal horn neurons. *Pain* 133(1-3):9-17.
- Lee KY, Chung K, Chung JM. 2010. Involvement of reactive oxygen species in long-term potentiation in the spinal cord dorsal horn. *J Neurophysiol* 103(1):382-91.
- Li L, Rutlin M, Abaira VE, Cassidy C, Kus L, Gong S, Jankowski MP, Luo W, Heintz N, Koerber HR, Woodbury CJ, Ginty DD. 2011. The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons. *Cell* 147(7):1615-27.
- Magerl W, Wilk SH, Treede RD. 1998. Secondary hyperalgesia and perceptual wind-up following intradermal injection of capsaicin in humans. *Pain* 74(2-3):257-68.
- Malmberg AB, Chen C, Tonegawa S, Basbaum AI. 1997. Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC $\gamma$ . *Science* 278(5336):279-83.
- Martin WJ, Malmberg AB, Basbaum AI. 2001. PKC $\gamma$  contributes to a subset of the NMDA-dependent spinal circuits that underlie injury-induced persistent pain. *J Neurosci* 21(14):5321-7.
- Miracourt LS, Dallel R, Voisin DL. 2007. Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through PKC $\gamma$  interneurons. *PLoS One* 2(11):e1116.

- Miraucourt 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):2519-27.
- Miraucourt LS, Peirs C, Dallel R, Voisin DL. 2011. Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through astrocyte-derived D-serine. *Pain* 152(6):1340-8.
- Mochly-Rosen D, Gordon AS. 1998. Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB J* 12(1):35-42.
- Neumann S, Braz JM, Skinner K, Llewellyn-Smith IJ, Basbaum AI. 2008. Innocuous, not noxious, input activates PKC $\gamma$  interneurons of the spinal dorsal horn via myelinated afferent fibers. *J Neurosci* 28(32):7936-44.
- Noma N, Tsuboi Y, Kondo M, Matsumoto M, Sessle BJ, Kitagawa J, Saito K, Iwata K. 2008. Organization of pERK-immunoreactive cells in trigeminal spinal nucleus caudalis and upper cervical cord following capsaicin injection into oral and craniofacial regions in rats. *J Comp Neurol* 507(3):1428-40.
- O'Neill J, Brock C, Olesen AE, Andresen T, Nilsson M, Dickenson AH. 2012. Unravelling the mystery of capsaicin: a tool to understand and treat pain. *Pharmacol Rev* 64(4):939-71.
- Ochoa JL, Yarnitsky D. 1993. Mechanical hyperalgesias in neuropathic pain patients: dynamic and static subtypes. *Ann Neurol* 33(5):465-72.
- Pan YZ, Pan HL. 2004. Primary afferent stimulation differentially potentiates excitatory and inhibitory inputs to spinal lamina II outer and inner neurons. *J Neurophysiol* 91(6):2413-21.

- Park ES, Gao X, Chung JM, Chung K. 2006. Levels of mitochondrial reactive oxygen species increase in rat neuropathic spinal dorsal horn neurons. *Neurosci Lett* 391(3):108-11.
- Paxinos G, Watson C. 1997. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press.
- Pelissier T, Pajot J, Dallel R. 2002. The orofacial capsaicin test in rats: effects of different capsaicin concentrations and morphine. *Pain* 96(1-2):81-7.
- Polgar E, Fowler JH, McGill MM, Todd AJ. 1999. The types of neuron which contain protein kinase C gamma in rat spinal cord. *Brain Res* 833(1):71-80.
- Ren K. 1999. An improved method for assessing mechanical allodynia in the rat. *Physiol Behav* 67(5):711-6.
- Roberts LA, Beyer C, Komisaruk BR. 1986. Nociceptive responses to altered GABAergic activity at the spinal cord. *Life Sci* 39(18):1667-74.
- Sang CN, Gracely RH, Max MB, Bennett GJ. 1996. Capsaicin-evoked mechanical allodynia and hyperalgesia cross nerve territories. Evidence for a central mechanism. *Anesthesiology* 85(3):491-6.
- Scanlon GC, Wallace MS, Ispirescu JS, Schulteis G. 2006. Intradermal capsaicin causes dose-dependent pain, allodynia, and hyperalgesia in humans. *J Investig Med* 54(5):238-44.
- Scherrer G, Imamachi N, Cao YQ, Contet C, Mennicken F, O'Donnell D, Kieffer BL, Basbaum AI. 2009. Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. *Cell* 137(6):1148-59.

- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9(7):676-82.
- Schoffnegger D, Ruscheweyh R, Sandkuhler J. 2008. Spread of excitation across modality borders in spinal dorsal horn of neuropathic rats. *Pain* 135(3):300-10.
- Schwartz ES, Lee I, Chung K, Chung JM. 2008. Oxidative stress in the spinal cord is an important contributor in capsaicin-induced mechanical secondary hyperalgesia in mice. *Pain* 138(3):514-24.
- Seal RP, Wang X, Guan Y, Raja SN, Woodbury CJ, Basbaum AI, Edwards RH. 2009. Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature* 462(7273):651-5.
- Shimizu K, Asano M, Kitagawa J, Ogiso B, Ren K, Oki H, Matsumoto M, Iwata K. 2006. Phosphorylation of Extracellular Signal-Regulated Kinase in medullary and upper cervical cord neurons following noxious tooth pulp stimulation. *Brain Res* 1072(1):99-109.
- Simone DA, Baumann TK, LaMotte RH. 1989. Dose-dependent pain and mechanical hyperalgesia in humans after intradermal injection of capsaicin. *Pain* 38(1):99-107.
- Sivilotti L, Woolf CJ. 1994. The contribution of GABAA and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. *J Neurophysiol* 72(1):169-79.

- Sossin WS. 2007. Isoform specificity of protein kinase Cs in synaptic plasticity. *Learn Mem* 14(4):236-46.
- Sweitzer SM, Wong SM, Peters MC, Mochly-Rosen D, Yeomans DC, Kendig JJ. 2004. Protein kinase C epsilon and gamma: involvement in formalin-induced nociception in neonatal rats. *J Pharmacol Exp Ther* 309(2):616-25.
- Szolcsanyi J, Sandor Z. 2012. Multimeric TRPV1 nociceptor: a target for analgesics. *Trends Pharmacol Sci*.
- Takazawa T, MacDermott AB. 2010. Glycinergic and GABAergic tonic inhibition fine tune inhibitory control in regionally distinct subpopulations of dorsal horn neurons. *J Physiol* 588(Pt 14):2571-87.
- Todd AJ. 2010. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci* 11(12):823-36.
- 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):1833-43.
- Treede RD, Cole JD. 1993. Dissociated secondary hyperalgesia in a subject with a large-fibre sensory neuropathy. *Pain* 53(2):169-74.
- 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):2708-23.

- Wei H, Huang J, Hao B, Wang YC, Nian G, Ma AN, Li XY, Wang YX, Pertovaara A. 2011. Intrathecal administration of antioxidants attenuates mechanical pain hypersensitivity induced by REM sleep deprivation in the rat. *Scandinavian Journal of Pain*:64-9.
- Westlund KN, Kochukov MY, Lu Y, McNearney TA. 2010. Impact of central and peripheral TRPV1 and ROS levels on proinflammatory mediators and nociceptive behavior. *Mol Pain* 6:46.
- Yamamoto W, Sugiura A, Nakazato-Imasato E, Kita Y. 2008. Characterization of primary sensory neurons mediating static and dynamic allodynia in rat chronic constriction injury model. *J Pharm Pharmacol* 60(6):717-22.
- Yang K, Kumamoto E, Furue H, Yoshimura M. 1998. Capsaicin facilitates excitatory but not inhibitory synaptic transmission in substantia gelatinosa of the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 255(3):135-8.
- Yowtak J, Lee KY, Kim HY, Wang J, Kim HK, Chung K, Chung JM. 2011. Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain by reducing spinal GABA release. *Pain* 152(4):844-52.
- Zhou HY, Zhang HM, Chen SR, Pan HL. 2007. Increased nociceptive input rapidly modulates spinal GABAergic transmission through endogenously released glutamate. *J Neurophysiol* 97(1):871-82.
- Zhou HY, Zhang HM, Chen SR, Pan HL. 2008. Increased C-fiber nociceptive input potentiates inhibitory glycinergic transmission in the spinal dorsal horn. *J Pharmacol Exp Ther* 324(3):1000-10.

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):465-75.



**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1.** Subcutaneous (s.c.) capsaicin induces spontaneous pain and static, but not dynamic, mechanical allodynia. **A**, Bar histograms of the duration (mean  $\pm$  SEM) of the rubbing behavior in capsaicin-treated (red bar; n = 5) and control rats (empty bar; n = 5). Capsaicin induces spontaneous pain. **B**, Time course of changes (mean  $\pm$  SEM) in behavioral responses (allodynic score) evoked by static (6.0 g von Frey hair; filled circles) and dynamic mechanical stimuli (air puff; empty circles) applied in the area of secondary hypersensitivity of the same capsaicin-treated rats as A. Capsaicin induces a static, but not dynamic, mechanical allodynia lasting about 60 min. **C**, **D**, Images of phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2) immunolabeling in the MDH of rats 30 min after s.c. capsaicin with (D) or without (C) 2-min static mechanical stimulation (6.0 g von Frey hair). Stippled lines indicate, from dorsal to ventral, the limits of lamina I and outer (IIo) and inner (IIi) lamina II. Phospho-ERK1/2 immunoreactive cells are exclusively located within the most superficial MDH laminae (I-IIo) following spontaneous pain whereas they encompass both I-IIo and IIi-III after static mechanical stimulation in capsaicin-treated rats. **E**, Bar histograms of the number (mean  $\pm$  SEM) of p-ERK1/2 immunoreactive cells in laminae I-IIo, IIi-outer III (IIIo) and inner-III (IIIi)-V, 5 (red bars) and 30 min (green bars) after either s.c. endolipid alone (light red and light green bars) or capsaicin (dark red and dark green bars), with (hachure) or without 2-min static mechanical stimulation (6.0 g von Frey hair), as indicated on the figure (n = 5 in each group). Note that static mechanical stimulation enhances the number of p-ERK1/2 immunoreactive cells in laminae I-IIo and IIi-IIIo only when it is applied 30 min after s.c. capsaicin. \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001.

**Figure 2.** Activation of PKC $\gamma$  is required for the expression of capsaicin-induced static-mechanical allodynia but not spontaneous pain. **A**, Fluorescence images of phospho-PKC $\gamma$  (p-PKC $\gamma$ ) immunopositive (green), p-ERK1/2 immunopositive (red) and dual labeled neurons

(white arrows) in lamina Ii of the MDH. Insets show the dual labeled neuron in the white stippled square. **B**, Top, Western blots for PKC $\gamma$  and  $\beta$ -actin on ipsilateral MDH proteins for the four groups of rats as indicated below the bar histograms. Bottom, bar histograms of the quantification of Western blotting. Values are normalized to  $\beta$ -actin staining. Values (mean  $\pm$  SEM) in the four groups are normalized to that in aCSF injected and 2-min static mechanical stimulation (6 g von Frey hair) group (light red bar). Treatments are indicated below the bar histograms. The bar color code is the same as in figure 1E: 5 min (red bars) and 30 min (green bars) after either s.c. endolipid alone (light red bar) or capsaicin (dark red and green bars), with (hachure) and without 2-min static mechanical stimulation (6 g von Frey hair). **C**, Bar histograms of the duration (mean  $\pm$  SEM) of the rubbing behavior in capsaicin-treated rats which had preemptively received i.c. Tat (empty bar; n = 5) or KIG (red bar; n = 5). Spontaneous pain is not suppressed in KIG-treated rats. **D**, Time course of changes (mean  $\pm$  SEM) in behavioral responses (allodynic score) evoked by static mechanical stimuli (6.0 g von Frey hair) applied in the area of secondary hypersensitivity in the same capsaicin-treated rats as C, preemptively intracisternally (i.c.) treated with KIG (empty circles) or Tat (filled circles). Static mechanical allodynia is suppressed in KIG-treated rats. **E**, Bar histograms (mean  $\pm$  SEM) of the number of p-ERK1/2 immunoreactive cells in laminae I-IIo, Ii-IIIo and IIIi-V following 2-min static mechanical stimulation (6 g von Frey hair) of the area of secondary hypersensitivity in capsaicin-treated rats, preemptively i.c. injected with either Tat (empty bars) or KIG (green bars), as indicated on the figure (n = 4 in each group). i.c. KIG prevents stimulation-induced elevation of the number of p-ERK1/2 immunoreactive cells in laminae I-IIo and Ii-IIIo in capsaicin-treated rats.\* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001.

**Figure 3.** GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition induces static, but not dynamic, mechanical allodynia. Time course of changes (mean  $\pm$  SEM) in behavioral responses (allodynic score) evoked by

static (6.0 g von Frey hair; filled circles and triangles) and dynamic mechanical stimuli (air puff; empty circles and triangles) applied on the face of i.c. bicuculline- (circles) and i.c. aCSF-injected rats (triangles) as indicated on the figure (n = 5 in each group). i.c.-applied bicuculline induces a static, but not dynamic, mechanical allodynia lasting about 30 min.

**Figure 4.** Static mechanical stimulation under GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition activates a neural circuit which encompasses both superficial and deeper laminae. **A, B,** Images of p-ERK1/2 immunolabeling in the MDH in rats after i.c. bicuculline with (B) and without (A) 2-min static mechanical stimulation (6 g von Frey hair) of the area of secondary hypersensitivity. Stippled lines indicate, from dorsal to ventral, the limits of laminae I, Ii and Iii. There are no or very few p-ERK1/2 immunoreactive cells after bicuculline alone whereas many are found after bicuculline and static mechanical stimulation, in laminae I, Iii, Ii and Iii. **C,** Bar histograms of the number (mean  $\pm$  SEM) of p-ERK1/2 immunoreactive cells in laminae I-Ii, Iii-IIIi and IIIi-V, after either aCSF (light green) or bicuculline (dark green), with (hachure) and without 2-min static mechanical stimulation (6 g von Frey hair) of the area of secondary hypersensitivity, as indicated on the figure (n = 5 in each group). Static mechanical stimulation can enhance the number of p-ERK1/2 immunoreactive cells in laminae I-Ii, Iii-IIIi and IIIi-V only when it is applied under GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition. Note that, in addition, bicuculline alone increases the number of p-ERK1/2 immunoreactive cells, but only in laminae I-Ii. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001. **D-F,** Fluorescence images of PKC $\gamma$  immunopositive (green; D), p-ERK1/2 immunopositive (red; E) and dual labeled neurons (white arrows; F).

**Figure 5.** Intracisternal application of the GABA<sub>A</sub> receptor agonist, muscimol, prevents capsaicin-induced both spontaneous pain and static mechanical allodynia. **A,** Bar histograms of the duration (mean  $\pm$  SEM) of the rubbing behavior in capsaicin-treated rats which had

preemptively received i.c. aCSF (empty bar; n = 5) or muscimol (red bar; n = 5). Spontaneous pain is suppressed in muscimol-treated rats. **B**, Time course of changes (mean  $\pm$  SEM) in behavioral responses (allodynic score) evoked by static mechanical stimuli (6.0 g von Frey hair) applied in the area of secondary hypersensitivity in the same capsaicin-treated rats as A, preemptively treated with i.c. muscimol (empty circles) or i.c. aCSF (filled circles). Static mechanical allodynia is suppressed in muscimol-treated rats. \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001.

**Figure 6.** Intracisternal application of the ROS donor, t-BOOH, induces a static, but not a dynamic mechanical allodynia. **A, C**, Time courses of changes (mean  $\pm$  SEM) in behavioral responses (allodynic score) evoked by static (6.0 g von Frey hair; A) and dynamic mechanical stimuli (air puff; C) on the face of rats i.c. injected with aCSF (filled circles) and increasing doses of t-BOOH: 50 (empty circles), 100 (empty triangles) and 250 g (empty squares). **B, D**, Bar histograms of the corresponding areas under the curves (mean  $\pm$  SEM): B, for static mechanical stimuli (A) and D, dynamic mechanical stimuli (C). ROS mainly produce a static mechanical allodynia. Nevertheless, there is also a very short dynamic mechanical allodynia with the largest dose of t-BOOH (see in C and D). \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001.

**Figure 7.** Static mechanical stimulation under ROS donor activates a neural circuit which encompasses both superficial and deeper laminae. **A, B**, Images of p-ERK1/2 immunolabeling in the MDH in rats after i.c. t-BOOH with (B) and without (A) static mechanical stimuli (6.0 g von Frey hair). Stippled lines indicate, from dorsal to ventral, the limits of laminae I, Ilo and Ili. There are no or very few p-ERK1/2 immunoreactive cells after i.c. t-BOOH alone whereas many are found in laminae I, Ili, Ilo and IIIli after i.c. t-BOOH and static mechanical stimulation. **C**, Bar histograms of the number (mean  $\pm$  SEM) of p-ERK1/2 immunoreactive cells in laminae I-Ilo, Ili-IIIlo and IIIli-V, after either aCSF (light green) or bicuculline (dark green), with (hachure) and without 2-min static mechanical stimuli (6.0 g von Frey hair), as

indicated on the figure (n = 5 in each group). Static mechanical stimulation can enhance the number of p-ERK1/2 immunoreactive cells in laminae I-IIo and Iii-IIIo only when it is applied under ROS donor.  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . **D-F**, Fluorescence images of PKC $\gamma$  immunopositive (green; D), p-ERK1/2 immunopositive (red; E) and dual labeled neurons (white arrows; F) in lamina Iii of the MDH.

**Figure 8.** Intracisternal application of the ROS scavenger, PBN, prevents capsaicin-induced static mechanical allodynia but not spontaneous pain. **A**, Bar histograms of the duration (mean  $\pm$  SEM) of the rubbing behavior in capsaicin-treated rats which have preemptively received i.c. aCSF (empty bar; n = 5) or PBN (red bar; n = 5). Spontaneous pain is not suppressed in PBN-treated rats. **B**, Time course of changes (mean + SED) in behavioral responses (allodynic score) evoked by 2-min static mechanical stimuli (6.0 g von Frey hair) applied in the area of secondary hypersensitivity in the same capsaicin-treated rats as A, preemptively i.c. treated with PBN (empty circles) or aCSF (filled circles). Static mechanical allodynia is suppressed in PBN-treated rats. **C**, Bar histograms of the number (mean  $\pm$  SEM) of p-ERK1/2 immunoreactive cells in laminae I-IIo, Iii-IIIo and IIIi-V in capsaicin-treated rats stimulated for 2-min with static mechanical stimuli (6.0 g von Frey hair) in the area of secondary hypersensitivity, preemptively i.c. injected with either aCSF (empty bars) or PBN (green bars), as indicated on the figure (n = 4 in each group). i.c. PBN prevents stimulus-induced elevation of the number of p-ERK1/2 immunoreactive cells in laminae I-IIo, Iii-IIIo and IIIi-V in capsaicin-treated rats.\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

FIGURES

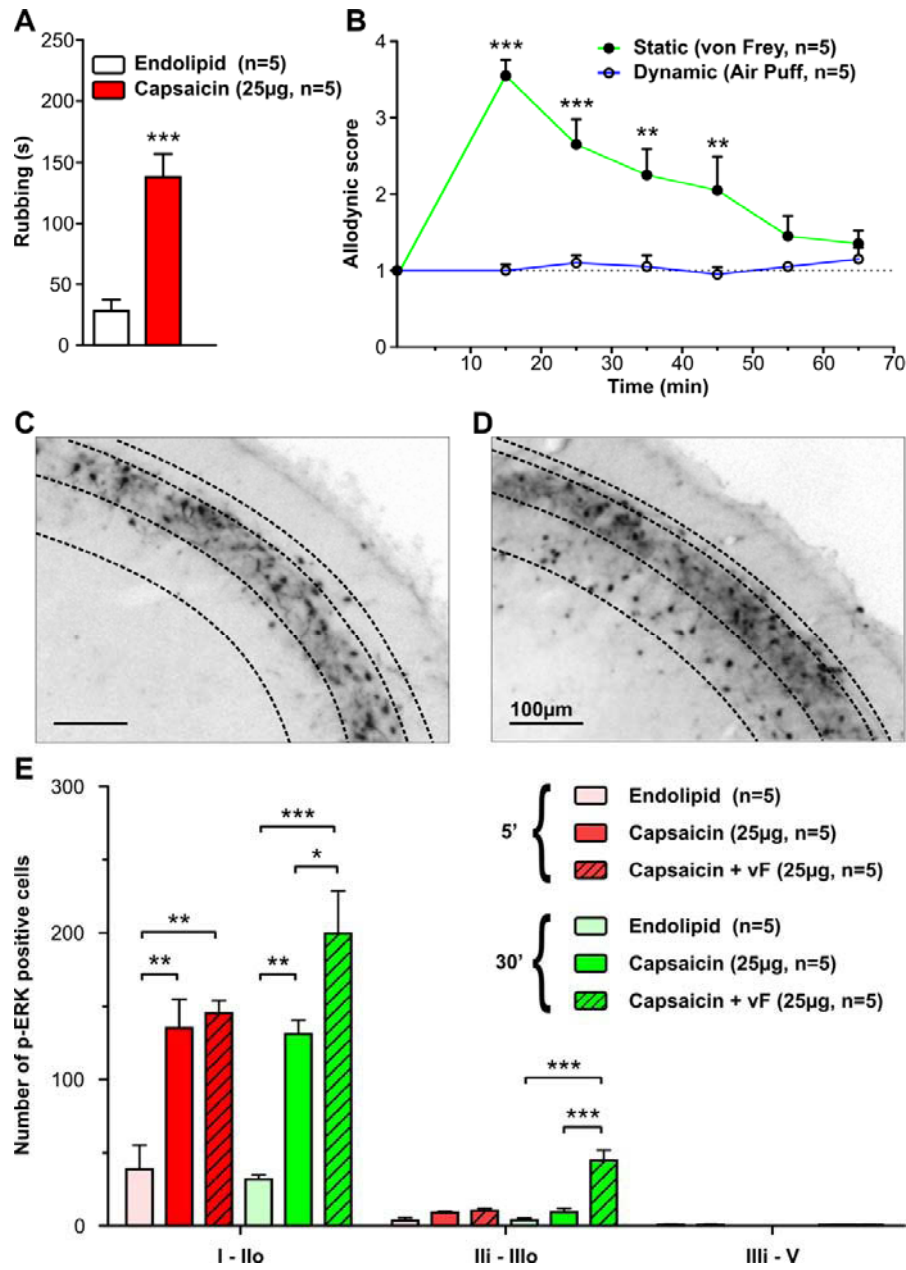


Figure 1

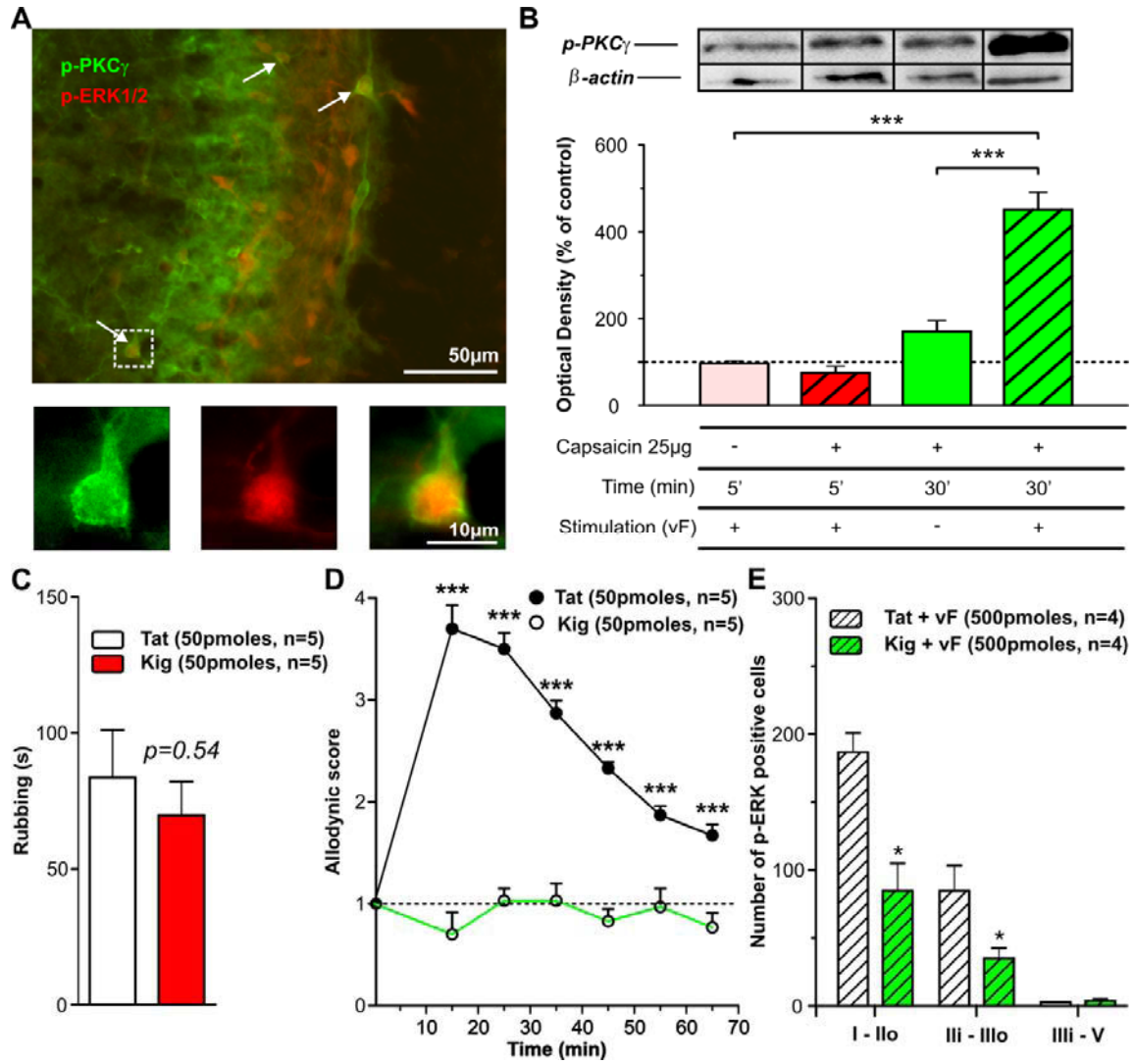


Figure 2

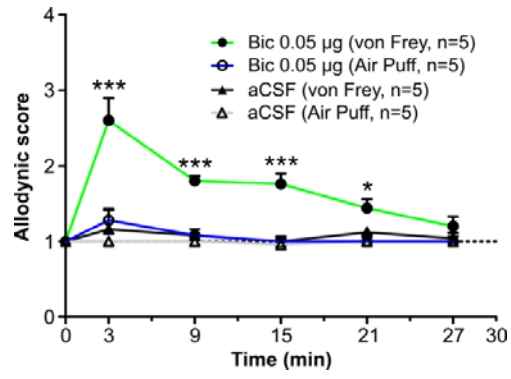


Figure 3



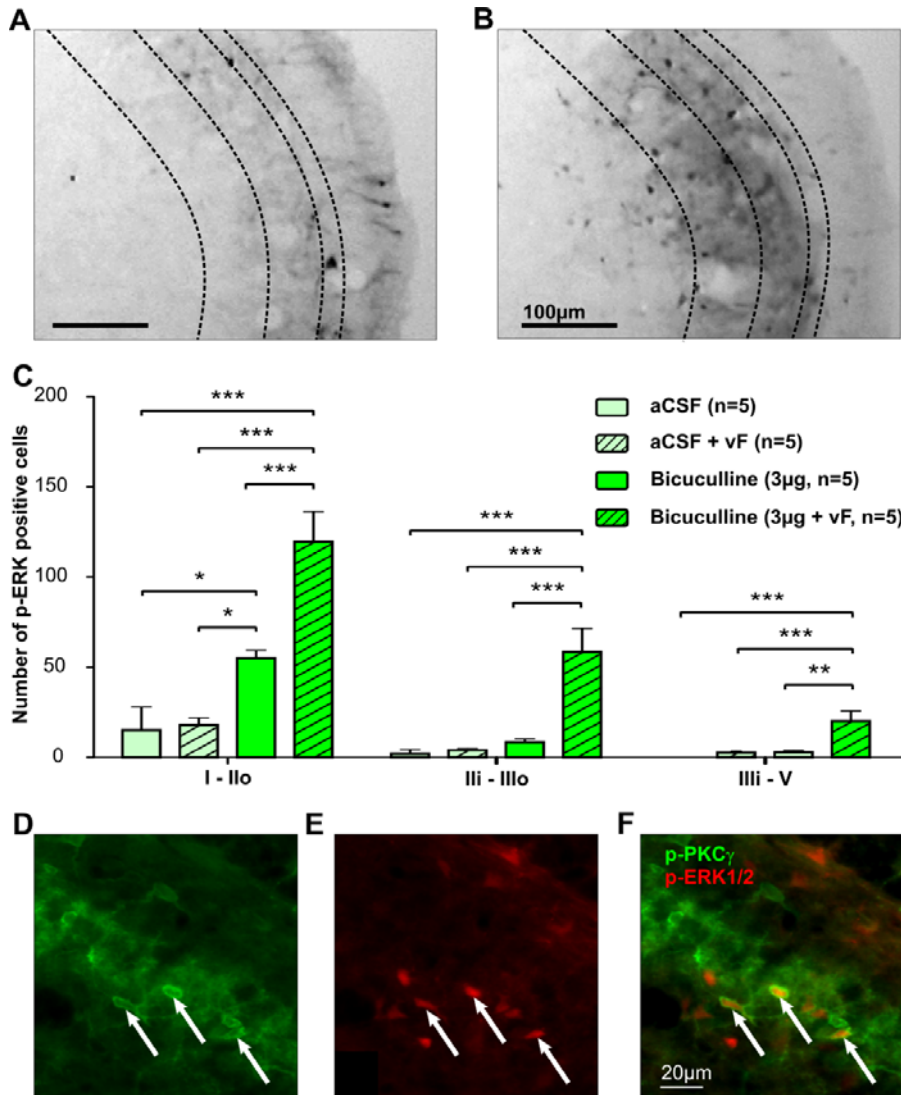


Figure 4

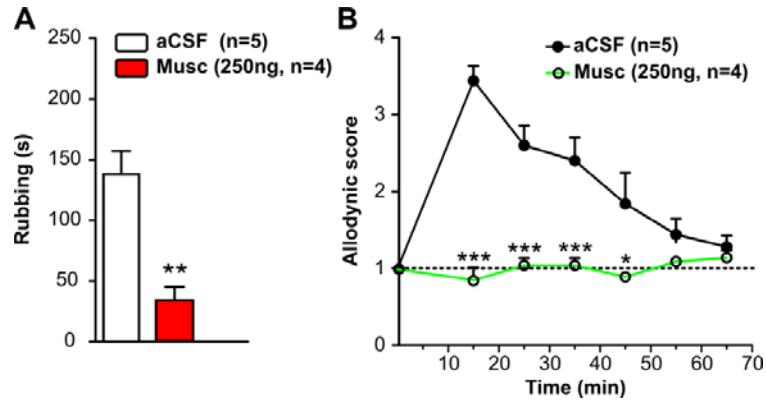


Figure 5

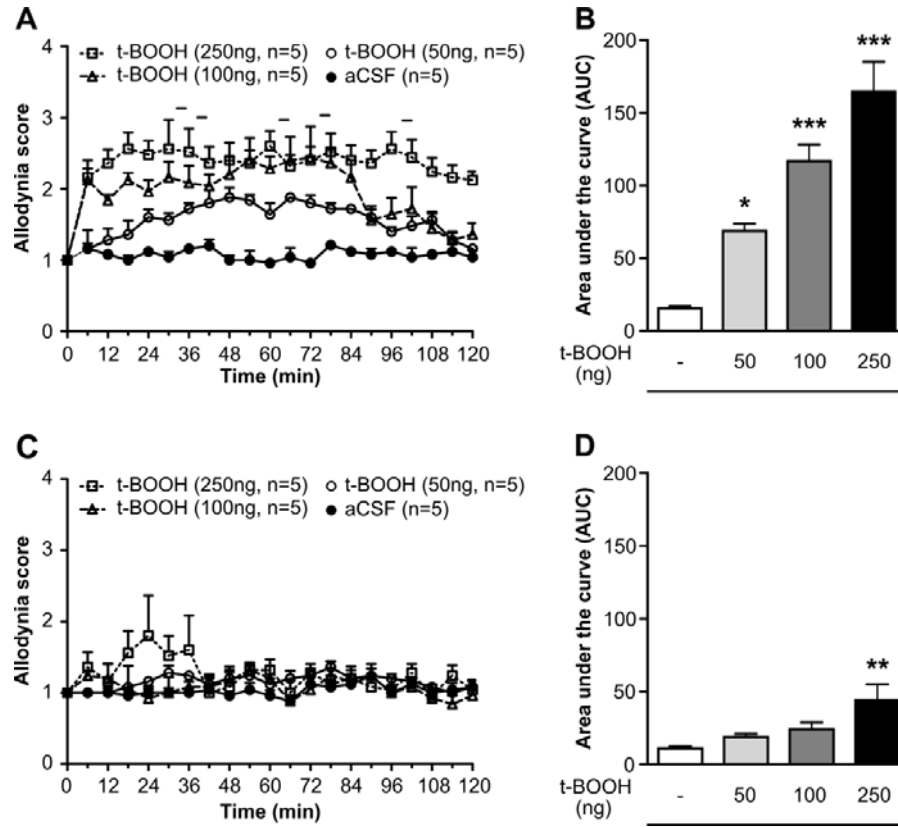


Figure 6

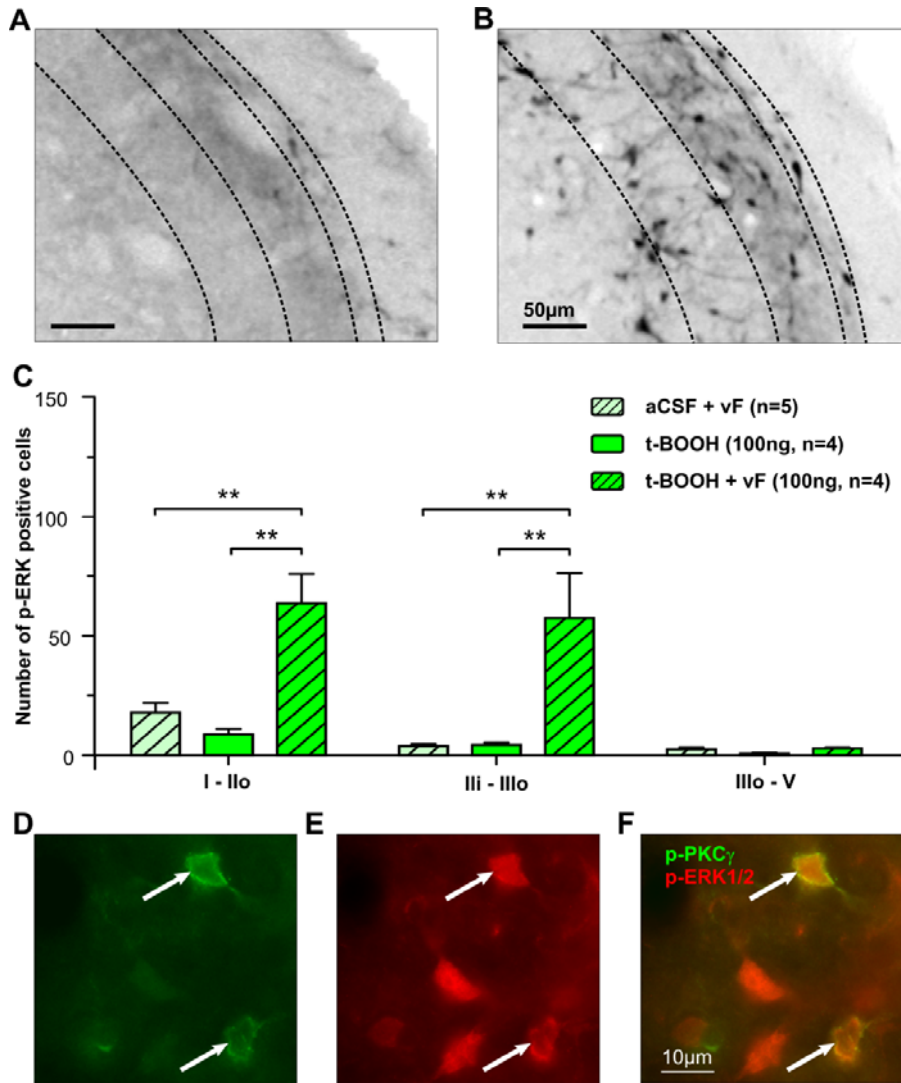


Figure 7

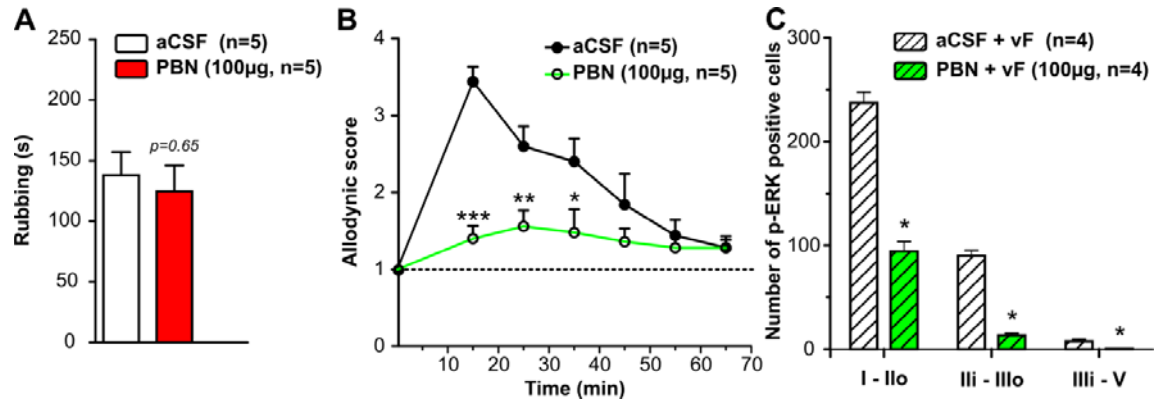


Figure 8

CHAPITRE 3 :

LES INTERNEURONES DE LA CORNE DORSALE  
MEDULLAIRE EXPRIMANT LA PKC $\gamma$  :

DISTRIBUTION ET CONNECTIVITE DE CES  
NEURONES. LOCALISATION SYNAPTIQUE DE  
LA PKC $\gamma$

*« L'expérience est une observation provoquée dans le but de faire naître une idée. »*

*Claude Bernard*

Dans cette deuxième partie j'ai cherché à caractériser les propriétés synaptiques des interneurons PKC $\gamma$  de la couche Iii de la corne dorsale médullaire par une approche utilisant des techniques de microscopies électronique et confocale. Les résultats obtenus lors de cette étude ont permis de mettre à jour des caractéristiques spécifiques des interneurons PKC $\gamma$  de la couche Iii du Sp5C. D'une part, ces interneurons sont localisés au sein de la couche Iii du sous noyau caudal et représentent près de la moitié des neurones excitateurs de cette couche. Ces interneurons ne sont pas présents dans le reste du complexe sensitif du trijumeau. D'autre part, les fibres C-LTMR exprimant le VGLUT3 forment un plexus dense dans la couche Iii mais contactent d'autres interneurons que ceux exprimant la PKC $\gamma$ . Les interneurons PKC $\gamma$  ne sont contactés que par des fibres afférentes non nociceptives de type A au sein de glomérules synaptiques de type II. Les interneurons PKC $\gamma$  de la couche Iii expriment à la fois le récepteur GABA<sub>A</sub> et le récepteur à la glycine, suggérant qu'ils peuvent être contrôlés par ces deux types d'inhibition. La PKC $\gamma$  exprimée dans les neurones de la couche Iii est localisée majoritairement au niveau des membranes postsynaptiques. De plus, cette protéine forme des clusters au niveau de l'espace pérисynaptique, en dehors de la zone active de la synapse. Cette localisation particulière de la PKC $\gamma$  diffère de celle retrouvée dans les cellules de Purkinje du cervelet où elle est majoritairement cytoplasmique. Cette spécificité anatomique de la PKC $\gamma$  exprimée dans les interneurons de la couche Iii de la corne dorsale suggère une implication fonctionnelle spécifique à l'étage segmentaire. La PKC $\gamma$  pourrait intervenir dans le trafic membranaire de récepteurs au niveau postsynaptique.

**TITLE**

Protein kinase C gamma neurons in the rat medullary dorsal horn: distribution and synaptic inputs of these neurons, and subcellular localization of the enzyme

**AUTHORS**

Cédric Peirs<sup>1</sup>, Sudarshan Patil<sup>1</sup>, Alain Artola<sup>1</sup>, Marc Landry<sup>2</sup>, Radhouane Dallel<sup>1</sup>

**INSTITUTIONAL AFFILIATIONS**

<sup>1</sup>Inserm/UdA U1107, Neuro-Dol: Trigeminal Pain and Migraine, Université d'Auvergne, Faculté de Chirurgie Dentaire, 11 Boulevard Charles de Gaulle, Clermont-Ferrand, 63000, France

<sup>2</sup>IINS, CNRS UMR 5297, Bordeaux Segalen University, Université Bordeaux 2, 146 rue Leo-Saignat, Bordeaux, 33077, France

**RUNNING HEAD**

PKC $\gamma$  neurons in rat MDH

**CORRESPONDING AUTHOR**

Radhouane Dallel

Inserm/UdA U1107, Neuro-Dol: Trigeminal Pain and Migraine, Université d'Auvergne, Faculté de Chirurgie Dentaire, 11 Boulevard Charles de Gaulle, Clermont-Ferrand, 63000, France

Tel: +33-(0)4-7317-7313



Fax: +33-(0)4-7317-7306

## **GRANT INFORMATION**

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Fondation des Gueules Cassées, Université d'Auvergne-Clermont1 (France) and Région Auvergne.

## **ABSTRACT**

The  $\gamma$  isoform of protein kinase C (PKC $\gamma$ ), which is concentrated in interneurons in the inner part of lamina II (II<sub>i</sub>) of the dorsal horn, has been implicated in the expression of a tactile allodynia. Lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  interneurons have been shown to be activated by tactile inputs and to participate in local circuits through which these inputs can reach lamina I, nociceptive output neurons. That such local circuit is gated by glycinergic inhibition and that A- and C-fibers low threshold mechanoreceptors (LTMRs) terminate in lamina II<sub>i</sub> raise the general issue of synaptic inputs to lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  interneurons. Combining light and electron microscopic immunochemistry in the rat spinal trigeminal nucleus, we show that PKC $\gamma$ -immunoreactivity is restricted to lamina II<sub>i</sub> of the medullary dorsal horn (MDH), where they constitute 1/3 of total neurons. The majority of synapses on PKC $\gamma$ -immunoreactive interneurons are asymmetric (likely excitatory). PKC $\gamma$  interneurons do not receive any unmyelinated but rather exclusively myelinated primary afferents in type II synaptic glomeruli. Indeed, neither large dense core vesicle terminals nor type I synaptic glomeruli, assumed to be the endings of unmyelinated nociceptive terminals, could be found on PKC $\gamma$ -immunoreactive interneurons. Moreover, there is no vesicular glutamate transporter 3-immunoreactive boutons, specific of C-LTMRs, on PKC $\gamma$ -immunoreactive interneurons. PKC $\gamma$ -immunoreactive interneurons contain GABA<sub>A</sub>ergic and glycinergic receptors. At subcellular level, PKC $\gamma$ -immunoreactivity is mostly concentrated on plasma membranes,

close to (but not within) postsynaptic densities. These results confirm that PKC $\gamma$  interneurons are ideally placed to allow touch activation of superficial nociceptive neurons.

## **KEY WORDS**

Medullary dorsal horn (MDH), protein kinase C gamma (PKC $\gamma$ ), C-low threshold mechanoreceptor (C-LTMR), vesicular glutamate transporter 3 (VGLUT3),  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor (GABA<sub>A</sub>) receptor, glycine receptor, electron microscopy, confocal microscopy

## **INTRODUCTION**

Pain is initiated by peripheral tissue damage and inflammation (inflammatory pain) or lesions to the nervous system (neuropathic pain). It is characterized by persistent pain hypersensitivity, including spontaneous pain (pain experienced in the absence of any obvious peripheral stimulus), hyperalgesia (exacerbated response to noxious stimuli) and allodynia (pain in response to normally innocuous stimuli).

It is now well established that the development and maintenance of persistent pain hypersensitivity involves, at least in part, changes in the processing of sensory information within the dorsal horn (DH). Primary afferents terminate in DH with a distribution pattern that is determined by sensory modality: fine primary afferents, either lightly myelinated A $\delta$ - or unmyelinated C-fibers, including most nociceptors, innervate the more superficial laminae, I and outer II (II<sub>o</sub>), whereas touch-sensing, lightly myelinated D-hair A $\delta$ -fibers and heavily myelinated A $\beta$ -fibers terminate in lamina inner II (II<sub>i</sub>)-III and II<sub>i</sub>-V, respectively (Li et al., 2011; for review see: Basbaum et al., 2009). Under physiological conditions, informations from different modalities are kept separate. However, under conditions of disinhibition, A $\beta$ -fiber-mediated information can reach lamina I, nociceptive output neurons by way of a

polysynaptic excitatory pathway (Torsney and MacDermott, 2006; Miraucourt et al., 2007). Activation of such local circuits has been shown to be associated with mechanical allodynia, leading to a miscoding of tactile information by cells that normally only detect painful stimuli (Miraucourt et al., 2007).

The  $\gamma$  isoform of protein kinase C (PKC $\gamma$ ) appears to play an important role in the development of mechanical allodynia. Increases in PKC $\gamma$  activity in spinal DH are triggered by both nerve (Miletic et al., 2000; Nakajima et al., 2011) and tissue injury (Martin et al., 1999; Cheng et al., 2008). Genetic impairment of PKC $\gamma$ , by the way of targeted deletion (Malmberg et al., 1997) or RNA interference (Zou et al., 2011) decreases specifically the behavioral allodynia that occurs days after nerve injury but has no effect on normal acute pain responses. Similarly, pharmacological impairment of PKC $\gamma$  inhibits mechanical allodynia that is produced by glycine receptor antagonists (Miraucourt et al., 2007). That, in DH, PKC $\gamma$  is restricted to a population of local circuit interneurons in the lamina II<sub>i</sub> (Malmberg et al., 1997; Polgar et al., 1999) has led to the suggestion that these lamina II<sub>i</sub> neurons are contained within local circuits underlying mechanical allodynia. However, how activation of PKC $\gamma$  neurons engages the ‘pain’ transmission circuit, is still unclear.

In the present study, we used immunocytochemistry at the level of light and electron microscopy level to get insights into the neuronal function of lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  immunoreactive neurons in rats. We first characterized PKC $\gamma$  expression in the spinal trigeminal nucleus, mainly its most caudal subnucleus or medullary dorsal horn (MDH), which has received little attention (Li et al., 2001a; Li et al., 2001b), though it is a major relay nucleus for the somatosensory information from the face and meninges. We then addressed the general issue of synaptic inputs to lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  neurons in the MDH. C-low-threshold mechanoreceptors (C-LTMR) are a subpopulation of unmyelinated, cutaneous sensory

afferents that likely process pleasant and socially relevant aspects of touch (Loken et al., 2009; Olausson et al., 2010) and mechanical allodynia after inflammation or nerve injury (Seal et al., 2009). That, on the one hand, PKC $\gamma$  neurons are specifically activated by tactile, but not noxious, inputs (Miracourt et al., 2007; Neumann et al., 2008), and, on the other hand, in mice, C-LTMRs terminate in a very restricted DH area that precisely overlaps with the band of PKC $\gamma$  immunoreactive interneurons in lamina II (Seal et al., 2009; Li et al., 2011), raises the question as to whether C-LTMRs directly terminate on PKC $\gamma$  immunoreactive interneurons. Fast inhibitory synaptic transmission within the dorsal horn is mediated by both  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-ergic and glycinergic transmission (for review: see Zeilhofer et al., 2012). That dorsally directed local circuits underlying mechanical allodynia appear to be unmasked by selectively glycinergic receptor antagonists (Miracourt et al., 2007; Miracourt et al., 2009) raises the question as to whether GABA<sub>A</sub> receptors are also present on lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  interneurons. Therefore, we examined whether both glycinergic and GABA<sub>A</sub>ergic receptors are present on lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  interneurons. Finally, we examined the subcellular localization of PKC $\gamma$  within lamina II<sub>i</sub> neurons in baseline conditions.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animals**

Adult male Sprague–Dawley rats (250 - 275 g) were obtained from Charles River (L'Arbresle, France) and maintained in a controlled environment (light on 19.00 - 7.00, 22°C). Water and food were provided *ad libitum*. Rats were housed 3-4 per cage. All efforts were made to minimize the number of animals used. The experiments followed the ethical guidelines of the International Association for the Study of Pain and ethical guidelines of the Directive 2010/63/UE of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purpose.

### **Antibody characterization**

Details of the primary antibodies used in this study are given in Table 1.

#### ***GABA<sub>A</sub> receptor***

GABA<sub>A</sub> monoclonal antibody BD17 (IgG1) was raised in mouse and recognizes an epitope on the extracellular domain of the  $\beta$ 2 and  $\beta$ 3 subunits of the GABA<sub>A</sub> receptor. This antibody reveals an appropriate protein band at 55 kDa in Western blot analysis of rat brain membrane lysate (Benke et al., 1991). Staining was eliminated by replacing primary antibodies with nonimmune serum (Fritschy et al., 1992).

#### ***Glycine receptor***

GlyR $\alpha$  monoclonal antibody mAb4a (IgG1) was raised in mouse and recognizes an epitope located within the amino acid residues 99-105 of the mature glycine receptor  $\alpha$ 1-subunit. The immunogen was a purified rat spinal cord glycine receptor. This antibody reveals the appropriate two protein bands (48 and 58 kDa) on Western blot analysis of rat spinal cord (Pfeiffer et al., 1984). An additional fixation with a mixture of methanol:acetic acid (95:5) for 10 min at -20°C was performed when using this antibody according to the manufacturer (Dumoulin et al., 2001).

#### ***NeuN***

NeuN purified monoclonal antibody A60 (IgG1) was raised in mouse and apparently labels all spinal neurons in rats (Todd et al., 1998). The immunogen was purified cell nuclei extracted from mouse brain. This antibody recognizes mostly nuclear antigens and weakly cytoplasm ones (Mullen et al., 1992; Wolf et al., 1996). This antibody reveals three bands in the 46-48 kDa region on Western blot analysis and binds to DNA *in vitro* (Mullen et al., 1992). As a negative control, this antibody recognizes neither glia cells nor non neuronal

tissue. No staining was observed when the primary antibody was replaced by normal serum in mouse (Lorenzo et al., 2008).

### ***PKC $\gamma$***

PKC $\gamma$  monoclonal antibody PK-G4 (IgG2a) was raised in mouse and recognizes an epitope located within the amino acid residues 684-697 at the C-terminal variable (V5) region of the PKC $\gamma$ . This antibody reveals the band of the polypeptide PKC (80 kDa) on Western blot analysis of brain lysates in wild type but not in PKC $\gamma$  knock-out mice (Yevseyenkov et al., 2009). Using immunostaining, it shows a unique localization in the lamina II<sub>i</sub> of MDH where PKC $\gamma$  is known to be restricted (Miraucourt et al., 2007; present results).

PKC $\gamma$  purified polyclonal antibody (C-19) was raised in rabbit and recognizes a peptide at the C-terminus of mouse PKC $\gamma$ . This antibody reveals two closely spaced bands of the appropriate molecular weight (80 kDa) on Western blot analysis of brain lysates. Immunoreactivity was restricted to the lamina II<sub>i</sub> of DH from wild type but not PKC $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice (Malmberg et al., 1997; Miraucourt et al., 2007).

### ***VGLUT3***

VGLUT3 polyclonal antibody was raised in guinea-pig and was generously provided by Hioki. H. It was affinity-purified with antigen-conjugated column. This antibody recognizes the C-terminal region located within amino acid residues 564-588 of the VGLUT3 antigen in mouse and rat brain tissue using immunoblotting and immunohistochemistry. No immunoreactivity was observed in VGLUT3 knock-out mice (Nakamura et al., 2004; Seal et al., 2009).

The specificity of antibodies was verified by omitting either primary or secondary antibodies. In those cases, no staining was visualized confirming the appropriate dilution and specificity of antibodies used in this study.

### **Immunohistochemistry**

Rats were deeply anaesthetized with urethane (1.5g/kg i.p.) and transcardially perfused with ice-cold 0.1 M phosphate buffer saline, pH 7.4 (PBS) followed by ice-cold 4% paraformaldehyde (PFA) diluted in PBS. Brainstem was quickly removed and immersed into fixative solution for 2 h at 4°C before cryoprotection in 30% sucrose in PBS for 48 h at 4°C. 40  $\mu$ m coronal sections were cut on a freezing microtome and collected in PBS before being processed. Free floating sections were first treated with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl diluted in PBS for 30 min at room temperature (RT). After several washes in 0.1 M PBS with 0.2% Triton (PBS-Tx), sections were blocked by pre-incubation in 5% Normal Goat Serum (NGS) in PBS-Tx for 1 h at RT. After washes in PBS-Tx, sections were incubated with a primary antibody diluted in 5% NGS in PBS-Tx for 24 h at 4°C. Sections were then washed with 5% NGS followed by washes in PBS-Tx. Tissues were incubated with secondary fluorescent antibody diluted in 5% NGS in PBS-Tx for 1 h at RT. Finally, sections were washed in 5% NGS, in PBS-Tx and then in PBS. Sections were transferred onto gelatinized slides before being coverslipped with DPX mountant for histology. Neurons containing VGLUT3, NeuN, GABA<sub>A</sub>, GlyR and/or PKC $\gamma$  immunoreactivity in the MDH were first photographed using a fluorescent Zeiss Axioplan 2 Imaging microscope coupled with a Hamamatsu C4742–95 digital camera, by switching between FITC and Rhodamine filter sets at respectively x5 and x20 magnifications before being analyzed with a confocal microscope. The delineation of the MDH was based upon the Paxinos and Watson atlas (Paxinos and Watson, 1997) and our own myeloarchitectural atlas as determined by our previous work (Miraucourt et al., 2011).

### **Confocal laser scanning microscopy**

Sections were analyzed with a Zeiss LSM 510 confocal laser scanning microscope by using 488- and 543-nm excitation laser light. In order to suppress emission cross-talk, the

microscope was configured to perform all scanning in sequential mode. Z-series were scanned at x20 and x63 magnifications with an oil immersion lens and a z-step of 0.37  $\mu\text{m}$ . The z-series were first examined with the Zeiss LSM image examiner<sup>®</sup>. Each image was then analyzed with Fiji-ImageJ 1.47 program (<http://rsbweb.nih.gov/ij> ; Schindelin et al., 2012). For fluorescence pattern analysis, a single image corresponding to the z-middle of cell was quantified using plot profile analysis plug-in. For this, a single line going from either side of the neuron through the plasma membrane, cytoplasm and nucleus was traced and grey values calculated. The relative changes in fluorescence intensity were measured from the background level and plasma membrane and perikarion separated considering the limited resolution of light. To ensure that the analyzed neurons were entirely included in the z-section, 3D-reconstruction was systematically performed using the 3D-viewer plug-in (Schmid et al., 2010) after cropping an isolated neuron.

### **Electron microscopy (pre-embedding method)**

Animals were deeply anesthetized with pentobarbital and perfused through the ascending aorta with an ice-cold fixative containing 4% PFA, 1.5% picric acid and 0.1% glutaraldehyde diluted in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 (PB). Brainstem was rapidly dissected out and postfixed in the same fixative without glutaraldehyde for 2 h and then rinsed in 0.1 M PBS, pH 7.4 at 4°C overnight. Free-floating sections (40- $\mu\text{m}$  thickness) were obtained on a Vibratome (Leica, Nanterre, France) and permeabilized 30 min with 1% borohydride diluted in 0.1 M PBS. After several washes in 0.1 M PBS, sections were then saturated 30 min at RT with 1% Bovine Serum Albumin (BSA) diluted in 0.1 M Tris, 0.15 M NaCl and 0.05 % Tween (TNT). For single immunostaining, sections were first incubated overnight at 4°C with the primary antibody diluted in TNT with 1% BSA. After several washes with TNT, sections were incubated for 2 h at RT with the secondary antibody diluted



in TNT with 1% BSA followed by a Diaminobenzidine (DAB) reaction. For immunogold reaction, sections were pre-treated with 1% glutaraldehyde diluted in distilled water 10 min at RT followed by several washes with TNT. A silver amplification was performed with HQ SILVER Nanoprobes (Yaphank, NY, USA). In all cases, sections were post-fixed for 1 h in dark with 1% OsO<sub>4</sub> diluted in PB after several washes in PB. Sections were then dehydrated through a graded series of ethanol (10 min in 50% ethanol, 10 min in 70% ethanol, 2 x 15 min in 95% ethanol, 2 x 20 min in 100% ethanol and 2 x 30 min in propylene oxide). Sections were embedded by the progressive temperature lowering technique. Briefly sections were incubated for 2 h at RT with 50% EPON resin and 50% propylene oxide, overnight with 100% EPON resin, 4 h at RT with freshly-made EPON resin and then 36 h at 60 °C. Ultrathin sections (60–100 nm) from blocs were mounted on gold mesh grids and observed under a HITACHI H7650 electron microscope. For double immunostainings, DAB reaction was performed immediately after Silver amplification and several washes with distilled water.

### **Cell counting**

NeuN and/or PKC $\gamma$  immunoreactive cells in the MDH were first scanned at x20 magnification and analyzed using Fiji-ImageJ 1.47 program. Sections were analyzed at -1200  $\mu$ m from the obex aperture, i.e. at about the middle of the rostro-caudal extend of MDH (Strassman and Vos, 1993; Miraucourt et al., 2011), for each rat (n=4). For cell counting, a 300 x 400  $\mu$ m window was positioned so that its median axe was perpendicular to the MDH border and its dorsolateral end at the border between the white and grey matter (Lorenzo et al., 2008). In addition, the center of this window was on the diagonal of a rectangle enclosing the whole MDH (see Fig. 1). NeuN and PKC $\gamma$  immunoreactivity profiles were counted separately using the cell counter plug-in. Delimitation of laminae borders was first done using merged NeuN/PKC $\gamma$  images. The border between lamina I and lamina II<sub>o</sub> was delimited so

that the lamina I contained the apparent unicellular layer of characteristic large lamina I output neurons. The border between lamina II<sub>o</sub> and lamina II<sub>i</sub> was set based on the apparition of a dense PKC $\gamma$  immunoreactive neuropil and that between lamina II<sub>i</sub> and III<sub>o</sub> on the disappearance of this neuropil. As we did not use neurochemical markers to delineate the border between lamina III and IV (Polgar et al., 2006), we did not separate these two last laminae. A cell was counted as immunopositive if (1) immunostaining of a single cell was clearly defined, (2) its level was at least two times that of the background levels, and (3) it had disappeared at both the top and bottom surfaces of z-stack. To ensure that a cell was not counted several times, the immediate look-up z-section was used as reference and compared to the subsequent z-section. 3D reconstruction using the 3D-viewer plug-in was also used to compare our counting with the representative neuronal structure reconstructed from the z-series. If any doubt was present, cells were reanalyzed at a higher magnification using x63 oil immersion lens.

### **Data and statistical analysis**

Rostro-caudal levels of the MDH are shown as distance in  $\mu\text{m}$  from the obex aperture. Number and percentage of neurons are shown as mean  $\pm$  SEM. VGLUT3 immunoreactive fibers were analyzed using the simple neurite tracer plug-in (Longair et al., 2011). Non-linear Lorentzian fit of the distribution of PKC $\gamma$  immunogold particles *vs.* the distance to the synaptic cleft was performed as following:  $Y = \text{Amplitude} / (1 + ((X - \text{Center}) / \text{Width})^2)$  with  $\text{Amplitude} = Y_{\text{max}}$ ;  $\text{Center} = \text{Log}(\text{Value of } X \text{ at } Y_{\text{mid}})$ ;  $\text{Width} = X_{\text{max}} - X_{\text{min}}$ . Ultrastructural repartition of PKC $\gamma$ -immunoreactivity in MDH and cerebellar neurons is represented as mean percentage  $\pm$  SEM of total fluorescence of the cell. Differences between immunoreactivity of MDH and cerebellar respective compartments were analyzed using a one-way ANOVA followed by a Tuckey *post hoc*, after passed the Kolmogorov-Smirnov normality test. In all

cases,  $p < 0.05$  was considered to be statistically significant. All quantitative analysis, graphs and statistical tests were performed on GraphPad Prism<sup>TM</sup> 5.0. Pictures were optimised for visual quality using Fiji-ImageJ 1.47 program at the end of analysis. Figures were made using CorelDRAW<sup>®</sup> 12.

## **RESULTS**

### **Distribution of PKC $\gamma$ interneurons within the spinal trigeminal nucleus**

In the spinal trigeminal nucleus, PKC $\gamma$  immunoreactivity was found exclusively within the MDH (Fig. 2B-E) where it formed a continuous, homogeneous and dense band in superficial laminae from the dorsomedial to the ventrolateral part in transverse sections. Actually, such PKC $\gamma$  immunoreactive band varied throughout the rostro-caudal axis of the MDH. Rather large at the caudal end of the MDH (thickness at -2400  $\mu\text{m}$ :  $65.6 \pm 2.3 \mu\text{m}$ ,  $n=5$ ), this band progressively narrowed (-800  $\mu\text{m}$ :  $36.1 \pm 0.7 \mu\text{m}$ ,  $n=5$ ), became scattered (between -400 and 0  $\mu\text{m}$ ; corresponding to the transition from the MDH to interpolaris subnucleus (Sp5I)), and finally vanished (at +400  $\mu\text{m}$ ), where both MDH and Sp5I overlap and laminar organization has disappeared (Fig. 2A-E).

At low magnification, PKC $\gamma$  immunoreactivity appeared as mainly a dense neuropil with few strongly immunoreactive cell bodies and associated dendrites in lamina II<sub>i</sub>. However, though most immunoreactive neurons were located within this lamina II<sub>i</sub> neuropil, there were also stained cells both in lamina I, lamina II<sub>o</sub>, and in outer lamina III (Fig. 3B and 3D). As previously observed (Polgar et al., 1999), PKC $\gamma$  immunoreactivity was weaker in the more dorsal (lamina I and II<sub>o</sub>) than in ventral cells (lamina II<sub>i</sub> and III). When sections immunostained with both PKC $\gamma$  and NeuN were viewed at high magnification, the vast majority of PKC $\gamma$  immunoreactive cells ( $92 \pm 3\%$ ) were found to be NeuN-positive, indicating that these were neurons.

Quantitative analysis indicates that lamina II shows the most intense neuronal density, especially at its dorsal part ( $47 \pm 4$  and  $34 \pm 4$  neurons /  $100 \mu\text{m}^2$  in lamina II<sub>o</sub> and II<sub>i</sub>, respectively, compared with  $14 \pm 4$  and  $24 \pm 2$  neurons /  $100 \mu\text{m}^2$ , lamina I and III-IV, respectively) as already observed by (Todd et al., 1998; Polgar et al., 2004)(Fig. 3A). Most of PKC $\gamma$  immunoreactive cells were located within lamina II<sub>i</sub> ( $52 \pm 6\%$ ) where they represent  $30 \pm 5\%$  of the total number of neurons within this lamina (Fig. 3D and 3E). Results of this study are shown in Table 4. As PKC $\gamma$  immunoreactivity is predominantly found in lamina II<sub>i</sub>, we will focus on PKC $\gamma$  neurons in lamina II<sub>i</sub> of the MDH in the remainder of the paper.

### **Synaptic inputs to lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$ interneurons**

We performed a transmission electron microscopy study of synapses on PKC $\gamma$  immunoreactive neurons. A total 35 synaptic appositions were analyzed. Most of them (74%) were asymmetric (excitatory), mostly axo-dendritic synapses, whereas 26% were symmetric (inhibitory), mostly axo-somatic ones (Fig. 4A and 4B). Putative excitatory, axo-dendritic synapses were mainly (81%) between axon terminals of local circuit interneurons and PKC $\gamma$  immunoreactive dendrites (Fig. 4A), and to a lesser extent (19%), between large terminals of primary afferent fibers and PKC $\gamma$  immunoreactive neurons (Fig. 4E).

In mice, C-LTMRs have been shown to specifically express the vesicular glutamate transporter 3 (VGLUT3) and terminate in lamina II<sub>i</sub>, precisely within the PKC $\gamma$  immunoreactive band (Seal et al., 2009; Li et al., 2011). To examine whether C-LTMRs directly terminate on PKC $\gamma$  immunoreactive neurons, we performed a light and electron microscopy double labeling study of MDH sections with VGLUT3 and PKC $\gamma$  antibodies. Our light microscopy study confirmed that, in rats too, VGLUT3 immunoreactive fibers terminate in lamina II<sub>i</sub>. They travel from the Lissauer tract to lamina II<sub>i</sub> in a dorso-ventral direction and form a dense plexus within this lamina where PKC $\gamma$  immunoreactivity is predominantly

located (Fig. 4C and 4D). Somewhat surprisingly, though, no synaptic contact between VGLUT3 immunoreactive terminals and PKC $\gamma$  immunoreactive neurons could be found using electron microscopy (105 ultrathin sections in 3 rats). Finally, we observed only one morphological type of primary afferents terminals onto PKC $\gamma$  immunoreactive neurons. These were large terminals (section area:  $2.05 \pm 0.48 \mu\text{m}^2$ , n=5) with light axoplasm containing loosely packed, uniformly clear vesicles and numerous mitochondria ( $3.22 \pm 0.24$  per  $\mu\text{m}^2$ , n=5) (Fig. 4E) and forming the central element of synaptic glomeruli of type II (Ribeiro-da-Silva and Coimbra, 1982). Such terminals are thought to be endings of myelinated primary afferent fibers (Ribeiro-da-Silva and Coimbra, 1982; Maxwell and Réthelyi, 1987; Larsson and Broman, 2005; Neumann et al., 2008). Interestingly, no large dense core vesicle terminals neither synaptic glomeruli of type I, which are assumed to be the endings of unmyelinated peptidergic terminals, were found on PKC $\gamma$  immunoreactive neurons. Together with our failure to find any VGLUT3 immunoreactive boutons on PKC $\gamma$  immunoreactive neurons, these observations strongly suggest that neither nociceptive nor tactile unmyelinated C-fibers terminals terminate on lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  immunoreactive neurons.

It was recently shown that PKC immunoreactive neurons receive direct glycinergic synaptic inhibition (Miraucourt et al., 2007). Do lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  neurons receive pure glycinergic synaptic inhibition? To address this question, we assessed glycinergic and GABA<sub>A</sub>ergic receptor immunoreactivity on lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  immunoreactive neurons, at the electron microscopy level. We found that PKC $\gamma$  interneurons express both GABA<sub>A</sub> and glycine receptors (Fig. 4F and 4G). Immunoreactivity was found inside and closed to plasma membranes, the neuronal cytoplasm and to a less extent in the nucleus. We assume that this observation is likely not due to antibodies cross-reactions as both gold or DAB staining could be found alone within neuronal as well as dendritic profiles (data not shown). This particular

localization of inhibitory receptors suggests a dynamic expression of inhibitory receptors at the neuronal membrane with their different states (active, biosynthesized or recycled).

### **Subcellular localization of PKC $\gamma$ immunoreactivity within lamina II<sub>i</sub> neurons**

PKC $\gamma$  primary antibody combined with HRP-conjugated secondary antibody revealed two types of morphologically distinct PKC $\gamma$  interneurons: fusiform and oval shaped (Fig. 5A and 5B). The size of their soma, measured by confocal microscopy, was  $13.1 \pm 0.8 \times 6.5 \pm 0.3$  and  $9.1 \pm 0.4 \times 7.4 \pm 0.4$   $\mu\text{m}$  for fusiform (n=10) and oval shaped (n=10) neurons, respectively. Immunoreactivity was found in the perikarion and dendritic cytoplasm and, to a less extent, in the nucleus. At high magnification, DAB reaction product was found throughout the cytoplasm but its concentration was very high close to or inside the plasma membrane (Fig. 5A and 5B). This suggested that PKC $\gamma$  was primarily located on plasma membranes.

To further assess the subcellular distribution of PKC $\gamma$ , we performed quantitative electron microscopy immunogold localization. Then, immunogold particles were mostly located on plasma membranes ( $83 \pm 5\%$ ) rather than within cytoplasm ( $17 \pm 5\%$ ) (Fig. 5C; 324 particles, 10 dendrites, 3 rats) and were exclusively postsynaptic. Interestingly, quantification of immunolabelling revealed a high density of gold particles outside synapses but close to the active zone; that is, gold particles appeared to be clustered within the perisynaptic space (distance from the synaptic cleft:  $248 \pm 11\text{nm}$ ; 182 particles, 15 synapses, 3 rats) (Fig. 5D and 5E). Moreover, presumably endosomal vesicles highly stained with gold particles, were often found close to the synaptic space (see examples in Fig. 5C and 5D).

PKCs are known to be translocated from the cytoplasm to plasma membranes upon activation (Sakai et al., 1997; Oancea et al., 1998). That PKC $\gamma$  immunoreactivity is mostly located on plasma membranes in lamina II<sub>i</sub> neurons would imply that, in MDH, almost all

PKC $\gamma$  is activated in basal conditions. Then, it becomes important to know whether such strong PKC $\gamma$  immunoreactivity on the plasma membranes of trigeminal neurons is a specific feature of these neurons or an experimental artifact. To address this question, we compared the subcellular localization of PKC $\gamma$  immunoreactivity in MDH PKC $\gamma$  immunoreactive cells with that in cerebellar Purkinje cells, which are known to both highly express PKC $\gamma$ . PKC $\gamma$  is located in the cytoplasm of these latter cells in baseline conditions and translocates to plasma membranes upon activation (Sakai et al., 1997; Sakai et al., 2004). Using light microscopy, we assessed the sub-cellular localization of PKC $\gamma$ -immunoreactivity in both trigeminal PKC $\gamma$  immunoreactive neurons (n = 10) and cerebellar Purkinje cells (n = 10) in naive animals. In MDH neurons, PKC $\gamma$  immunoreactivity was mainly located in plasma membranes (Fig. 6A, double arrows) and to a lesser extent in the cytoplasm (Fig. 6A, arrowhead) and nucleus (Fig. 6A, arrow). On the other hand, PKC $\gamma$  immunoreactivity in cerebellar Purkinje cells was equally located in the cytoplasm (Fig. 6C, arrowhead) and plasma membranes (Fig. 6C, double arrows) and little, if none, in the nucleus (Fig. 6C, arrow). Quantitative analysis of gray levels in the different compartments of both trigeminal and cerebellar PKC $\gamma$  immunopositive cells, using confocal microscopy, confirmed that PKC $\gamma$  immunoreactivity is predominantly located in plasma membranes in trigeminal interneurons (Fig. 6B, 6E and 6F), but in both plasma membranes and cytoplasm, in cerebellar Purkinje cells (Fig. 6D, 6E and 6G). These results thus suggest that the localization of PKC $\gamma$  on plasma membranes in baseline conditions is a specific feature of trigeminal interneurons. However, clearly, trigeminal PKC $\gamma$  immunoreactive neurons and cerebellar Purkinje cells exhibit many other morphological differences including size and nucleus/cytoplasm ratio (Fig. 6B and 6D).

## **DISCUSSION**

Using light and electron microscopy, our anatomical and morphological study shows that PKC $\gamma$  immunoreactivity is restricted to a single sub-nucleus in the trigeminal system: the

MDH. Within MDH, PKC $\gamma$  immunoreactive cells are concentrated in superficial laminae, mostly in lamina II<sub>i</sub>, where they constitute 1/3 of the total number of neurons. The majority of synapses on lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  immunoreactive interneurons are asymmetric (likely excitatory). However, neither large dense core vesicle-containing nor VGLUT3 immunoreactive boutons, which are both specific of unmyelinated afferents, could be found forming contacts with lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  immunoreactive interneurons. Lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  immunoreactive interneurons receive both GABA<sub>A</sub>ergic and glycinergic inputs. At the subcellular level, PKC $\gamma$  immunoreactivity within lamina II<sub>i</sub> MDH neurons is mostly concentrated on plasma membranes, close to (but not within) postsynaptic densities, in baseline conditions. Such subcellular localization is thus very different from that in Purkinje cells where PKC $\gamma$  immunoreactivity is mostly cytoplasmic in the same conditions.

### **Technical considerations**

We used a modification of the physical dissector method (Williams and Rakic, 1988; Coggeshall, 1992; Guillery, 2002; Polgar et al., 2004; Polgar et al., 2011) to provide an unbiased count of neurons. However, MDH is a heterogeneous structure which can vary in length and width throughout its rostro-caudal axis. A precise estimate of the total number of neurons that exist in this structure was therefore not possible. Nevertheless, to allow comparison with other studies, we report here densities of neurons in each MDH lamina at level -1200  $\mu$ m.

As previously described both in the spinal (Mori et al., 1990; Malmberg et al., 1997; Polgar et al., 1999) and medullary DHs (Li et al., 2001b; Miraucourt et al., 2007), PKC $\gamma$  immunoreactivity forms a dense plexus – consisting of cell bodies and associated dendrites within lamina II<sub>i</sub>. In addition, as in spinal DH (Polgar et al., 1999), PKC $\gamma$  immunoreactive cells can also be found within lamina I, II<sub>o</sub> and III in the MDH. Nevertheless, PKC $\gamma$



immunoreactive cells within both lamina II<sub>o</sub> and III are actually located close to the borders of lamina II<sub>i</sub>. Li et al. (2001b) reported that, in MDH, PKC $\gamma$  immunoreactive cells are most prominent in lamina II, but in its outer part. The apparent discrepancy in the laminar localization of the band of strong PKC $\gamma$  immunoreactivity between this latter study and ours probably reflects a slight difference in the placing of the lamina II/III border between the two studies.

### **PKC $\gamma$ neuronal population**

Double immunostaining with PKC $\gamma$  and NeuN antibodies reveals that the great majority of PKC $\gamma$  immunoreactive cells are also NeuN-positive indicating that they are neurons. That some PKC $\gamma$  immunoreactive cells are NeuN-negative raises the possibility that few PKC $\gamma$  immunoreactive cells are not neurons. This is very unlikely as PKC $\gamma$  has been shown to be expressed solely in neurons (Kose et al., 1988). Furthermore, no PKC $\gamma$  immunoreactive glia cells were found at the electron microscopy level in our study. Finally, it has already been noted that some neurons might be NeuN-negative (Lorenzo et al., 2008).

Cell counts reveal that about half of PKC $\gamma$  immunoreactive cells within MDH are restricted to lamina II<sub>i</sub>. Thus, taken together with previous estimates that the great majority of PKC $\gamma$  immunoreactive cells are excitatory neurons (Martin et al., 1999; Polgar et al., 1999) and that nearly 70% of neurons in lamina II<sub>i</sub> are excitatory (Polgar et al., 2003), the present study indicates that PKC $\gamma$  immunoreactive neurons make up around 50% of the excitatory neurons in lamina II<sub>i</sub>. PKC $\gamma$  immunoreactive neurons would thus constitute one of the relatively largest population of neurons within one lamina of the medullary, and likely spinal, DHs. Preprotachykinin B (PPTB) immunoreactive neurons have also been shown to be highly concentrated in lamina II<sub>i</sub> where they constitute 16% of the neurons (Polgar et al., 1999).

However most of PPTB immunoreactive neurons (76%) also express PKC $\gamma$  suggesting that these are the same neurons.

PKC $\gamma$  immunoreactivity varies between cells with most lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  immunoreactive cells being more immunoreactive than those within other laminae, in both the medullary (present results) and spinal DHs (Polgar et al., 1999). Several subpopulations of PKC $\gamma$  immunoreactive cells can be identified based on PKC $\gamma$  immunoreactivity and expression of various neurochemical markers. For example, PKC $\gamma$  immunoreactive cells which express PPTB are weakly to moderately PKC $\gamma$  immunoreactive (Polgar et al., 2006) whereas those expressing neurotensin and somatostatin are moderately to strongly PKC $\gamma$  immunoreactive (Polgar et al., 1999). Since neurotensin and somatostatin are expressed in different sets of excitatory interneurons (Polgar et al., 1999; Polgar et al., 2006), neurotensin- and somatostatin-expressing PKC $\gamma$  immunoreactive interneurons may represent two different populations of PKC $\gamma$  immunoreactive interneurons. Similarly, GluR2-3 is expressed by only 50% and calbindin, by 15-25% of PKC $\gamma$  immunoreactive interneurons (Hughes et al., 2008). Moreover, a basic distinction can be drawn between PKC $\gamma$  immunoreactive cells within and outside lamina II<sub>i</sub>. Thus, GluR1s are present on 1/3 of PKC $\gamma$  immunoreactive neurons in lamina I and II<sub>o</sub> but on very few in lamina II<sub>i</sub> (Hughes et al., 2008). Similarly, PKC $\gamma$  immunoreactive neurons in lamina I and III can express NK1 receptors while there is essentially no co-expression of PKC $\gamma$  and NK1 receptor in lamina II<sub>i</sub> (Polgar et al., 1999; Hughes et al., 2008). This last distinction might be associated with particular functional types as PKC $\gamma$  immunoreactive neurons in lamina I and III, but not in lamina II, can project to the thalamus (Li et al., 2001b). Therefore, the differential expression of PKC $\gamma$  immunoreactivity and the detection of various neurochemical markers strongly suggest that there are different subpopulations of PKC $\gamma$  immunoreactive neurons with, likely, different functions. We

therefore concentrated on PKC $\gamma$  immunoreactive interneurons in lamina II<sub>i</sub> for the rest of our study.

### **Primary afferent inputs to PKC $\gamma$ immunoreactive neurons**

In mice, C-LTMR, terminate in lamina II<sub>i</sub>, precisely within the PKC $\gamma$  immunoreactive band (Seal et al., 2009; Li et al., 2011). The present study confirms that, in rats, too, VGLUT3 immunoreactivity is concentrated within lamina II<sub>i</sub> where about half of PKC $\gamma$  interneurons are located. Nevertheless, at the EM level, despite our efforts, no bouton containing VGLUT3 could be found forming synapse with PKC $\gamma$  immunoreactive interneurons. It is then more likely that VGLUT3 containing afferents actually terminate on another population of lamina II<sub>i</sub> interneurons, namely calbindin-positive interneurons, which have been shown to receive unmyelinated, but not myelinated, primary afferents (Braz and Basbaum, 2009). It has to be noted, however, that C-LTMRs and PKC $\gamma$  interneurons appear to be both involved in injury- or inflammation-induced secondary mechanical allodynia, the former transmitting the input that produces pain (Malmberg et al., 1997; Seal et al., 2009), suggesting that they are somehow functionally related.

Together with our failure to find any large dense core vesicle-containing terminals on PKC $\gamma$  immunoreactive interneurons, these results suggest that PKC $\gamma$  interneurons do not receive any unmyelinated but rather exclusively myelinated primary afferents. Such conclusion is consistent with previous evidence showing that central terminals that conduct in the A $\beta$  range (Hughes et al., 2003) or contain the VGLUT1, the vesicular glutamate transporter that is associated with large-diameter afferents (Neumann et al., 2008), contact PKC $\gamma$  immunoreactive interneurons in lamina II<sub>i</sub>. In addition, a significant number of PKC $\gamma$  immunoreactive interneurons in lamina II<sub>i</sub> are labeled by the transneuronal tracer wheat germ agglutinin when it is expressed in myelinated sensory neurons (Neumann et al., 2008; Braz

and Basbaum, 2009). It has to be noted, however, that another type of LTMRs, namely thinly myelinated A $\delta$  D-hair, terminates in lamina II<sub>i</sub> and the outer part of lamina III (Maxwell and Réthelyi, 1987; Li et al., 2011). Since both A $\beta$  and A $\delta$  can form synaptic type II glomeruli in DH, our study cannot exclude the possibility that D-hairs directly contact PKC $\gamma$  immunoreactive interneurons. Interestingly, activation of these two LTMRs leads to different pain symptoms (Treede and Magerl, 2000). In conclusion, different types of low threshold mechanoreceptors might thus engage different types of lamina II<sub>i</sub> neurons, the myelinated ones, the PKC $\gamma$  interneurons and the unmyelinated ones, the calbindin interneurons.

### **Inhibitory receptors onto PKC $\gamma$ immunoreactive neurons**

Our electron microscopic study shows that both glycinergic and GABA<sub>A</sub>ergic receptors are expressed in lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  interneurons in adult rats. Evidence for glycine receptor immunoreactivity on lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  immunoreactive neurons had already been obtained (Miraucourt et al., 2007). The present study demonstrates in addition that GABA<sub>A</sub> receptors are also present on lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  immunoreactive neurons. This is consistent with anatomical evidence showing that lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  interneurons receive many vesicular GABA transporter-containing boutons, including those from neuropeptide Y GABAergic interneurons (Polgar et al., 2011). The electrophysiological observation that pure glycine receptor- and pure GABA<sub>A</sub> receptor-mediated events can be recorded in the same lamina II neuron and the fact that benzodiazepine can convert many pure glycine receptor-mediated events into mixed glycine receptor-GABA<sub>A</sub> receptor-mediated events (Keller et al., 2001) suggests the existence of a heterogeneous junctional distribution of glycinergic and GABA<sub>A</sub>ergic receptors in lamina II neurons. However, because of technical limits including an overlap between electron-dense DAB product and gold particles in the plasma membrane due to a pre-embedding approach used in this study, we cannot address the issue of the pattern

of distribution of glycinergic and GABA<sub>A</sub>ergic receptors in symmetric synapses formed onto PKC $\gamma$  immunoreactive interneurons.

### **Subcellular localization of PKC $\gamma$**

PKC $\gamma$ , a conventional PKC isoform, is known to be translocated from the cytosol to the plasma membrane when activated by Ca<sup>2+</sup> and diacylglycerol (Sakai et al., 1997; Oancea et al., 1998). Therefore, the translocation of PKC $\gamma$  can be considered as a good marker of whether this enzyme is activated or not. Our electron microscopic study of the subcellular localization of PKC $\gamma$  immunoreactivity in lamina II<sub>i</sub> interneurons of the MDH suggests that the enzyme is mostly located on, or very close to, plasma membranes. This result is consistent with previous electron microscopic studies in the spinal DH pointing out that, within dendrites of lamina II<sub>i</sub> neurons, in basal conditions, PKC $\gamma$  immunoreactivity seems to be on cell membranes where the reaction products are concentrated against the inner plasma membrane (Mori et al., 1990; but see Martin et al., 2001). Since our result at the electron microscopic level showing that PKC $\gamma$  immunoreactivity, by analysis of DAB reaction product or immunogold particles, is predominantly located on plasma membranes in lamina II<sub>i</sub> neurons implied that most of the enzyme is activated in baseline conditions, it was important to verify that it was not an experimental artifact. We performed two series of controls. We first investigated the subcellular localization of PKC $\gamma$  immunoreactivity in lamina II<sub>i</sub> interneurons using another technique, the confocal laser scanning fluorescent microscopy, and, then, compared it with that of Purkinje cells from the same animals. Confocal images of PKC $\gamma$  immunoreactivity in lamina II<sub>i</sub> interneurons confirmed that fluorescence was predominantly located on plasma membranes. Interestingly, these images appear to be very similar to those of PKC $\gamma$  immunostaining previously obtained in spinal DH where the most intense staining was clearly found at the membrane level (see Fig. 5-6 in Polgar et al., 1999 or Fig. 8-9 in

Polgar et al., 2011). Moreover, using the very same confocal microscopy, we assessed PKC $\gamma$  immunoreactivity in Purkinje cells from the same animals. Fluorescence appeared to be rather uniformly distributed in the perikarion and plasma membrane, much the same as that of PKC $\gamma$  fused with green fluorescent protein of transgenic mice before any stimulation (Sakai et al., 2004). This suggests that the preferential localization of PKC $\gamma$  immunoreactivity on the plasma membranes of lamina II<sub>i</sub> interneurons is a special feature of these neurons, both in medullary and spinal DHs. However, it is noteworthy that the distance between the antibody-antigen site and gold particles can vary up to 30 nm (Matsubara et al., 1996), and even more when using silver amplification. Therefore, we cannot exclude the possibility that PKC $\gamma$  is not located within but rather very close to plasma membranes.

PKC $\gamma$  immunoreactivity, postsynaptic to asymmetric (excitatory) synapses, appears to cluster in the perisynaptic space at a distance of about 250 nm to the synaptic zone. Such distance corresponds to that of “synaptic molecules” (see Tardin et al., 2003), suggesting that PKC $\gamma$  contributes to synaptic functions. Thus, PKCs appear to be involved in horizontal and vertical membrane-trafficking of AMPA and NMDA receptors in many brain areas including DH (Li et al., 1999; Groc et al., 2004). And PKC $\gamma$  itself has been shown to regulate synaptic plasticity in hippocampus (Abeliovich et al., 1993) as well as DH (Martin et al., 2001; Woolf, 2011).

Finally, our anatomical study establishes that PKC $\gamma$  immunoreactivity is restricted to a single sub-nucleus within the spinal trigeminal nucleus: the MDH. No PKC $\gamma$  immunoreactivity could be detected in the two other, more rostral, spinal trigeminal sub-nuclei: interpolaris and oralis. It is interesting to note that these three sub-nuclei exhibit very different anatomical organizations: only MDH includes laminae, much the same as those in spinal DH, and receives unmyelinated C-fiber primary afferents (DaSilva and DosSantos,

2012). Lamina II; PKC $\gamma$  interneurons, at the border between noxious and innocuous tactile primary afferents, might thus regulate the cross-talk between sensory modalities. Receiving myelinated tactile primary afferent inputs, including A $\beta$ , at the lamina II/III border, they would act as gateway of local excitatory circuits that mediate mechanical allodynia.

### **CONFLICT OF INTEREST STATEMENT**

None of the authors has any conflict of interest to declare.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank A. Calas, E. Gontier, M. Petrel, S. Lacomme (Bordeaux Imaging Center), C. Blavignac, C. Szczepaniak (Centre Imagerie Cellulaire Santé), C. Vachias for expertise in image analysis, and A.M. Gaydier for secretarial assistance. We are grateful to Dr H. Hioki (Department of Morphological Brain Science Graduate School of Medicine, Kyoto University Konoe-cho, Japan) for the generous gift of the VGLUT3 antibody.

### **ROLE OF AUTHORS**

All authors had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Study concept and design: AA, CP, ML and RD. Acquisition of data: CP, SP. Analysis and interpretation of data: AA, CP, ML and RD. Drafting of the manuscript: AA, CP and RD. Obtained funding: ML and RD. Study supervision: RD.

### **LITTERATURE CITED**

- Abeliovich A, Chen C, Goda Y, Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S. 1993. Modified hippocampal long-term potentiation in PKC gamma-mutant mice. *Cell* 75(7):1253-62
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. 2009. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139(2):267-84.
- Benke D, Mertens S, Trzeciak A, Gillessen D, Mohler H. 1991. GABAA receptors display association of gamma 2-subunit with alpha 1- and beta 2/3-subunits. *J Biol Chem* 266(7):4478-83.
- Braz JM, Basbaum AI. 2009. Triggering genetically-expressed transneuronal tracers by peripheral axotomy reveals convergent and segregated sensory neuron-spinal cord connectivity. *Neuroscience* 163(4):1220-32.
- Cheng HT, Suzuki M, Hegarty DM, Xu Q, Weyerbacher AR, South SM, Ohata M, Inturrisi CE. 2008. Inflammatory pain-induced signaling events following a conditional deletion of the N-methyl-D-aspartate receptor in spinal cord dorsal horn. *Neuroscience* 155(3):948-58.
- Coggeshall RE. 1992. A consideration of neural counting methods. *Trends Neurosci* 15(1):9-13.
- DaSilva AF, DosSantos MF. 2012. The role of sensory fiber demography in trigeminal and postherpetic neuralgias. *J Dent Res* 91(1):17-24.
- Dumoulin A, Triller A, Dieudonne S. 2001. IPSC kinetics at identified GABAergic and mixed GABAergic and glycinergic synapses onto cerebellar Golgi cells. *J Neurosci* 21(16):6045-57.



Fritschy JM, Benke D, Mertens S, Oertel WH, Bachi T, Mohler H. 1992. Five subtypes of type A gamma-aminobutyric acid receptors identified in neurons by double and triple immunofluorescence staining with subunit-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(15):6726-30.

Groc L, Heine M, Cognet L, Brickley K, Stephenson FA, Lounis B, Choquet D. 2004. Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nat Neurosci* 7(7):695-6.

Guillery RW. 2002. On counting and counting errors. *J Comp Neurol* 447(1):1-7.

Hughes AS, Averill S, King VR, Molander C, Shortland PJ. 2008. Neurochemical characterization of neuronal populations expressing protein kinase C gamma isoform in the spinal cord and gracile nucleus of the rat. *Neuroscience* 153(2):507-17.

Hughes DI, Scott DT, Todd AJ, Riddell JS. 2003. Lack of evidence for sprouting of A $\beta$  afferents into the superficial laminae of the spinal cord dorsal horn after nerve section. *J Neurosci* 23(29):9491-9.

Keller AF, Coull JA, Chery N, Poisbeau P, De Koninck Y. 2001. Region-specific developmental specialization of GABA-glycine cosynapses in laminae I-II of the rat spinal dorsal horn. *J Neurosci* 21(20):7871-80.

Kose A, Saito N, Ito H, Kikkawa U, Nishizuka Y, Tanaka C. 1988. Electron microscopic localization of type I protein kinase C in rat Purkinje cells. *J Neurosci* 8(11):4262-8.

Larsson M, Broman J. 2005. Different basal levels of CaMKII phosphorylated at Thr286/287 at nociceptive and low-threshold primary afferent synapses. *Eur J Neurosci* 21(9):2445-58.

- Li JL, Li YQ, Nomura S, Kaneko T, Mizuno N. 2001a. Protein kinase C gamma-like immunoreactivity in the substantia gelatinosa of the medullary dorsal horn of the rat. *Neurosci Lett* 311(3):185-8.
- Li L, Rutlin M, Abaira VE, Cassidy C, Kus L, Gong S, Jankowski MP, Luo W, Heintz N, Koerber HR, Woodbury CJ, Ginty DD. 2011. The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons. *Cell* 147(7):1615-27.
- Li P, Kerchner GA, Sala C, Wei F, Huettner JE, Sheng M, Zhuo M. 1999. AMPA receptor-PDZ interactions in facilitation of spinal sensory synapses. *Nat Neurosci* 2(11):972-7.
- Li YQ, Li JL, Li H, Kaneko T, Mizuno N. 2001b. Protein kinase C gamma-like immunoreactivity of trigeminothalamic neurons in the medullary dorsal horn of the rat. *Brain Res* 913(2):159-64.
- Loken LS, Wessberg J, Morrison I, McGlone F, Olausson H. 2009. Coding of pleasant touch by unmyelinated afferents in humans. *Nat Neurosci* 12(5):547-8.
- Longair MH, Baker DA, Armstrong JD. 2011. Simple Neurite Tracer: open source software for reconstruction, visualization and analysis of neuronal processes. *Bioinformatics* 27(17):2453-4.
- 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(4):592-604.
- Malmberg AB, Chen C, Tonegawa S, Basbaum AI. 1997. Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKCgamma. *Science* 278(5336):279-83.

- 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):1267-74.
- Martin WJ, Malmberg AB, Basbaum AI. 2001. PKC $\gamma$  contributes to a subset of the NMDA-dependent spinal circuits that underlie injury-induced persistent pain. *J Neurosci* 21(14):5321-7.
- Matsubara A, Laake JH, Davanger S, Usami S, Ottersen OP. 1996. Organization of AMPA receptor subunits at a glutamate synapse: a quantitative immunogold analysis of hair cell synapses in the rat organ of Corti. *J Neurosci* 16(14):4457-67.
- Maxwell DJ, Réthelyi M. 1987. Ultrastructure and synaptic connections of cutaneous afferent fibres in the spinal cord. *Trends Neurosci* 10(3):117-23.
- Miletic V, Bowen KK, Miletic G. 2000. Loose ligation of the rat sciatic nerve is accompanied by changes in the subcellular content of protein kinase C beta II and gamma in the spinal dorsal horn. *Neurosci Lett* 288(3):199-202.
- 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):2519-27.
- Miracourt LS, Peirs C, Dallel R, Voisin DL. 2011. Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through astrocyte-derived D-serine. *Pain* 152(6):1340-8.

- Mori M, Kose A, Tsujino T, Tanaka C. 1990. Immunocytochemical localization of protein kinase C subspecies in the rat spinal cord: light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 299(2):167-77.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116(1):201-11.
- Nakajima A, Tsuboi Y, Suzuki I, Honda K, Shinoda M, Kondo M, Matsuura S, Shibuta K, Yasuda M, Shimizu N, Iwata K. 2011. PKC $\gamma$  in Vc and C1/C2 is involved in trigeminal neuropathic pain. *J Dent Res* 90(6):777-81.
- Nakamura K, Wu SX, Fujiyama F, Okamoto K, Hioki H, Kaneko T. 2004. Independent inputs by VG. *Neuroreport* 15(3):431-6.
- Neumann S, Braz JM, Skinner K, Llewellyn-Smith IJ, Basbaum AI. 2008. Innocuous, not noxious, input activates PKC $\gamma$  interneurons of the spinal dorsal horn via myelinated afferent fibers. *J Neurosci* 28(32):7936-44.
- Oancea E, Teruel MN, Quest AF, Meyer T. 1998. Green fluorescent protein (GFP)-tagged cysteine-rich domains from protein kinase C as fluorescent indicators for diacylglycerol signaling in living cells. *J Cell Biol* 140(3):485-98.
- Olausson H, Wessberg J, Morrison I, McGlone F, Vallbo A. 2010. The neurophysiology of unmyelinated tactile afferents. *Neurosci Biobehav Rev* 34(2):185-91.
- Paxinos G, Watson C. 1997. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press.

- Pfeiffer F, Simler R, Grenningloh G, Betz H. 1984. Monoclonal antibodies and peptide mapping reveal structural similarities between the subunits of the glycine receptor of rat spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(22):7224-7.
- Polgar E, Fowler JH, McGill MM, Todd AJ. 1999. The types of neuron which contain protein kinase C gamma in rat spinal cord. *Brain Res* 833(1):71-80.
- 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):687-97.
- Polgar E, Gray S, Riddell JS, Todd AJ. 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):144-50.
- Polgar E, Hughes DI, Riddell JS, Maxwell DJ, Puskar Z, Todd AJ. 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):229-39.
- Polgar E, Sardella TC, Watanabe M, Todd AJ. 2011. Quantitative study of NPY-expressing GABAergic neurons and axons in rat spinal dorsal horn. *J Comp Neurol* 519(6):1007-23.
- Ribeiro-da-Silva A, Coimbra A. 1982. Two types of synaptic glomeruli and their distribution in laminae I-III of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 209(2):176-86.

- Sakai N, Sasaki K, Ikegaki N, Shirai Y, Ono Y, Saito N. 1997. Direct visualization of the translocation of the gamma-subspecies of protein kinase C in living cells using fusion proteins with green fluorescent protein. *J Cell Biol* 139(6):1465-76.
- Sakai N, Tsubokawa H, Matsuzaki M, Kajimoto T, Takahashi E, Ren Y, Ohmori S, Shirai Y, Matsubayashi H, Chen J, Duman RS, Kasai H, Saito N. 2004. Propagation of gammaPKC translocation along the dendrites of Purkinje cell in gammaPKC-GFP transgenic mice. *Genes Cells* 9(10):945-57.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9(7):676-82.
- Schmid B, Schindelin J, Cardona A, Longair M, Heisenberg M. 2010. A high-level 3D visualization API for Java and ImageJ. *BMC Bioinformatics* 11:274.
- Seal RP, Wang X, Guan Y, Raja SN, Woodbury CJ, Basbaum AI, Edwards RH. 2009. Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature* 462(7273):651-5.
- Strassman AM, Vos BP. 1993. Somatotopic and laminar organization of fos-like immunoreactivity in the medullary and upper cervical dorsal horn induced by noxious facial stimulation in the rat. *J Comp Neurol* 331(4):495-516.
- Tardin C, Cognet L, Bats C, Lounis B, Choquet D. 2003. Direct imaging of lateral movements of AMPA receptors inside synapses. *EMBO J* 22(18):4656-65.

- Todd AJ, Spike RC, Polgar E. 1998. A quantitative study of neurons which express neurokinin-1 or somatostatin sst2a receptor in rat spinal dorsal horn. *Neuroscience* 85(2):459-73.
- 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):1833-43.
- Treede RD, Magerl W. 2000. Multiple mechanisms of secondary hyperalgesia. *Prog Brain Res* 129:331-41.
- Waldvogel HJ, Baer K, Eady E, Allen KL, Gilbert RT, Mohler H, Rees MI, Nicholson LF, Faull RL. 2010. Differential localization of gamma-aminobutyric acid type A and glycine receptor subunits and gephyrin in the human pons, medulla oblongata and uppermost cervical segment of the spinal cord: an immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 518(3):305-28.
- Williams RW, Rakic P. 1988. Three-dimensional counting: an accurate and direct method to estimate numbers of cells in sectioned material. *J Comp Neurol* 278(3):344-52.
- Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, Schmidt-Kastner PK, Pietsch T, Wiestler OD, Blumcke I. 1996. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem* 44(10):1167-71.
- Woolf CJ. 2011. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain* 152(3 Suppl):S2-15.

Yevseyenkov VV, Das S, Lin D, Willard L, Davidson H, Sitaramayya A, Giblin FJ, Dang L, Takemoto DJ. 2009. Loss of protein kinase C $\gamma$  in knockout mice and increased retinal sensitivity to hyperbaric oxygen. *Arch Ophthalmol* 127(4):500-6.

Zeilhofer HU, Wildner H, Yevenes GE. 2012. Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiol Rev* 92(1):193-235.

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):465-75.



## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Schematic representation of the 300 x 400  $\mu\text{m}$  cell counting window (yellow). Its median axe is positioned perpendicular to the MDH border (red dotted line) and its dorsolateral end at the border between the white and grey matter. The center of this window (red dot) is set on the diagonal of a rectangle enclosing the whole MDH (black). Scale bar = 500  $\mu\text{m}$ .

**Figure 2. A-E:** Rostro-caudal distribution of PKC $\gamma$  immunoreactivity within trigeminal MDH. PKC $\gamma$  immunoreactivity in transverse sections at various levels (800  $\mu\text{m}$  intervals) of the MDH, from its rostral (0  $\mu\text{m}$ ; obex aperture) to its caudal end (-2400  $\mu\text{m}$ ). A transverse section at +400  $\mu\text{m}$ , where the MDH and Sp5I overlap with each other, is displayed in addition. On the right are the corresponding schematic drawings of laminar organization. It is clear that PKC $\gamma$  immunoreactivity occupies mainly the inner part of lamina II (lamina II<sub>i</sub>). Thick and dense at the rostral end of MDH (-2400  $\mu\text{m}$ ), the lamina II<sub>i</sub> band of PKC $\gamma$  immunoreactivity becomes thinner (-1600 and -800  $\mu\text{m}$ ) and scattered (0  $\mu\text{m}$ ) when moving rostrally. It has disappeared at +400  $\mu\text{m}$  where the MDH and Sp5I are overlapping and the laminar organization is lost. Scale bars = 500  $\mu\text{m}$ . I, lamina I. II, lamina II. III, lamina III. IV, lamina IV. V, lamina V. MDH, medullary dorsal horn. Sp5I, spinal trigeminal nucleus interpolar part.

**Figure 3.** Laminar distribution of NeuN and PKC $\gamma$  immunoreactive cells within lamina I-IV of MDH. **A-C:** Confocal images showing NeuN (A), PKC $\gamma$  (B) and merged NeuN and PKC $\gamma$  (C) immunoreactivities in laminae I, II<sub>o</sub>, II<sub>i</sub> and III-IV. Border between layers are shown with dotted lines. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ . **D:** Proportion of PKC $\gamma$  immunoreactive cells in laminae I-IV. More than half of the total number of PKC $\gamma$  immunoreactive cells are found in lamina II<sub>i</sub>. **E:** Bar histogram of the relative number of NeuN/PKC $\gamma$  immunoreactive neurons to the total

number of NeuN immunoreactive neurons within each laminae I-IV. In lamina II<sub>i</sub>, PKC $\gamma$  immunoreactive cells represent about 1/3 of total neurons. Data are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 4).

**Figure 4.** Synaptic inputs to PKC $\gamma$  immunoreactive interneurons. **A, B:** Axodendritic asymmetric (A) and axosomatic symmetric (B) synapses on a PKC $\gamma$  immunoreactive cell (DAB reaction). Scale bars = 500 nm. **C, D:** VGLUT3-immunostaining in the MDH. Light microscopy image through a transverse section of the MDH immunostained to reveal VGLUT3 (C) and the corresponding NeuroLucida reconstruction (D). The dashed lines represent the borders between lamina I and II<sub>o</sub>, II<sub>o</sub> and II<sub>i</sub> and II<sub>i</sub> and III. Fibers coming from the Lissauer tract project ventrally through the most superficial layers and form a dense plexus within the inner part of the lamina II. Scale bars = 20  $\mu$ m. **E.** Asymmetric synapse between a primary afferent and a PKC $\gamma$  immunoreactive interneuron (gold particles) in a type II glomerulus. Arrows are across asymmetric synapses between the presynaptic terminal and postsynaptic dendrites (stars). Scale bar = 500 nm. **F.** Colocalization of GABA<sub>A</sub> immunoreactivity (gold particles) in a PKC $\gamma$  immunoreactive interneuron (DAB reaction). Scale bar = 1  $\mu$ m. **G.** Colocalization of GlyR immunoreactivity (gold particles) in a PKC $\gamma$  immunoreactive interneuron (DAB reaction). Inset: higher magnification of the box. It shows that gold particles are close to the plasma membrane. Scale bars = 2  $\mu$ m. A, B, E and F: Cell nuclei are drawn in blue, presynaptic elements in magenta and postsynaptic ones in green or black (DAB precipitate).

**Figure 5.** Subcellular localization of PKC $\gamma$  immunoreactivity at the electron microscopic level. **A, B:** PKC $\gamma$  immunoreactivity (DAB reaction) in an egg-shaped (A) and fusiform (B) PKC $\gamma$  immunoreactive interneurons. Scale bars = 2  $\mu$ m. **C.** PKC $\gamma$  immunoreactivity (gold

particles) in PKC $\gamma$  immunoreactive dendrites. Scale bars = 200 nm. Both techniques demonstrate that PKC $\gamma$  immunoreactivity is predominantly located at plasma membranes (arrows). **D.** Examples of perisynaptic and presumably endosomal (frequently close to asymmetric synapses; red arrow) localizations of PKC $\gamma$  immunoreactivity (gold particles). Scale bars = 200 nm. **E.** Frequency histogram of the distance between PKC $\gamma$  immunogold particles and synaptic clefts. The non linear Lorentzian regression is shown (red line; 3 rats, 15 synapses, 182 particles). PKC $\gamma$  immunoreactivity was very rarely encountered in active zones but frequently formed clusters in the perisynaptic space. A-D: Nuclei are drawn in blue, nucleoli in red, presynaptic elements in magenta and dendrites/postsynaptic elements in green.

**Figure 6.** Subcellular localization of PKC $\gamma$  immunoreactivity in MDH interneurons and cerebellar Purkinje cells. **A, C:** Light microscopic image from a transverse section through MDH (A) and from a coronal section through cerebellar cortex (C) immunostained for PKC $\gamma$ . Arrow points to the nucleus, double arrows to the plasma membrane and arrowhead to the perykaryon. Insets show higher magnifications of the respective selected neurons. Scale bars = 20  $\mu$ m. **B and D:** Confocal images of PKC $\gamma$  immunoreactivity of respectively a MDH lamina II<sub>i</sub> interneuron (B) and cerebellar Purkinje cell (D). Gray values in F and G have been measured along the white lines in B and C, respectively. Magenta lines indicate changes in cellular compartment: plasma membrane membrane, perykaryon or presumable nucleus. Scale bars = 10  $\mu$ m. **F, G:** PKC $\gamma$  gray levels measured in cells B and D, respectively. Changes in cell compartment are indicated with dotted lines. **E:** Bar histogram of the relative subcellular localization (plasma membrane: filled bars; perykaryon: empty bars) of PKC $\gamma$  immunoreactivity in MDH lamina II<sub>i</sub> interneurons or Purkinje cell. Data are shown as mean  $\pm$  SEM (n=10 per group). \*\*\*, p<0.0001. \*\*, p<0.001. Mb, plasma membrane.

TABLES

**Table 1. Primary antibodies used in this study**

Antigen	Immunogen	Species, type, manufacturer	Dilution	Reference
GABA <sub>A</sub>	Extracellular domain of the $\beta$ 2 & $\beta$ 3 subunits of the GABA <sub>A</sub> receptor	Mouse monoclonal, Millipore (Molsheim, France), MAB 341	1 :100 (EM)	(Waldvogel et al., 2010)
GlyR $\alpha$	Spinal cord glycine receptor $\alpha$ 1-subunit (aa 96-105)	Mouse monoclonal, Synaptic System (Goettingen, Germany), SS 146011	1 :200 (EM)	(Miraucourt et al., 2007)
NeuN	NeuN protein	Mouse monoclonal, Millipore (Molsheim, France), MAB 377	1 :1000 (IF)	(Lorenzo et al., 2008)
PKC $\gamma$	C-terminal variable region (aa 684-697) of PKC $\gamma$	Mouse monoclonal, Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France), P 8083	1 :4000 (IF/EM)	(Yevseyenkov et al., 2009)
PKC $\gamma$	C-terminal variable region (aa 679-697)of PKC $\gamma$	Rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), sc-211	1 :5000 (IF) 1 :1000 (EM)	(Miraucourt et al., 2007)
VGLUT3	C-terminal region (aa 564-588) of VGlut3	Guinea-pig polyclonal, Hioki. H. (Kyoto, Japan)	1 :500 (IF/EM)	(Seal et al., 2009)

**Table 2.** Secondary antibodies used in this study

Detection	Host	Immunogen	Manufacturer	Cat. No.	Dilution
Cy2	goat	anti-mouse	Jackson, Newmarket, UK	115-225-003	1:200
Cy2	goat	anti-rabbit	Jackson, Newmarket, UK	111-225-003	1:200
Cy3	goat	anti-mouse	Jackson, Newmarket, UK	115-165-003	1:200
Cy3	goat	anti-rabbit	Jackson, Newmarket, UK	111-165-003	1:200
HRP	goat	anti-mouse	DAKO, Glostrup, Denmark	P0447	1:100
HRP	swine	anti-rabbit	DAKO, Glostrup, Denmark	P0399	1:100
Ultrasmall immunogold	goat	anti-mouse	Aurion, Wageningen, The Netherlands	800-022	1:100
Ultrasmall immunogold	goat	anti-guinea-pig	Aurion, Wageningen, The Netherlands	800-144	1:100

**Table 3.** Composition of cocktails of primary and secondary antibodies

Type of microscopy	Staining	Primary antibody	Secondary antibody
Fluorescence	single	mouse PKC $\gamma$	Cy2 goat anti-mouse
	single	guinea-pig VGLUT3	Cy3 goat anti-guinea-pig
	double	rabbit PKC $\gamma$	Cy2 goat anti-rabbit
Electron		mouse NeuN	Cy3 goat anti-mouse
	single	mouse PKC $\gamma$	HRP goat anti-mouse
	single	mouse PKC $\gamma$	Ultrasmall nanogold goat anti-mouse
	double	rabbit PKC $\gamma$	HRP swine anti-rabbit
		mouse GlyRa	Ultrasmall nanogold goat anti-mouse
	double	rabbit PKC $\gamma$	HRP swine anti-rabbit
		mouse GABA $_A$	Ultrasmall nanogold goat anti-mouse
	double	mouse PKC $\gamma$	HRP goat anti-mouse
		guinea-pig VGlut3	Ultrasmall nanogold goat anti-guinea-pig

**Table 4.** Neurons of Lamina I, Ilo, Ili, III-IV that express NeuN and/or PKC $\gamma$

	Number of NeuN-IR cells counted	Number of PKC $\gamma$ -IR cells counted	Number of NeuN-IR cells / 100 $\mu\text{m}^2$	Number of PKC $\gamma$ -IR cells / 100 $\mu\text{m}^2$	Distribution of NeuN-IR cells (%)	Distribution of PKC $\gamma$ -IR cells (%)	% of NeuN-IR cells that express PKC $\gamma$
I	8 (5-10)	1 (0-1)	14 (7-23)	1 (0-2)	2 (1-3)	3 (3-3)	8 (0-20)
Ilo	70 (51-83)	5 (2-8)	47 (39-58)	3 (2-5)	21 (16-24)	14 (6-25)	7 (4-12)
Ili	61(41-69)	18 (12-24)	34 (23-41)	10 (6-12)	19 (15-21)	52 (38-65)	30 (17-39)
III-IV	189 (158-227)	11 (8-13)	24 (21-28)	1 (1-2)	58 (55-59)	32 (25-41)	6 (5-6)

Results are represented as mean values from 4 rats, with range in parentheses.

FIGURES

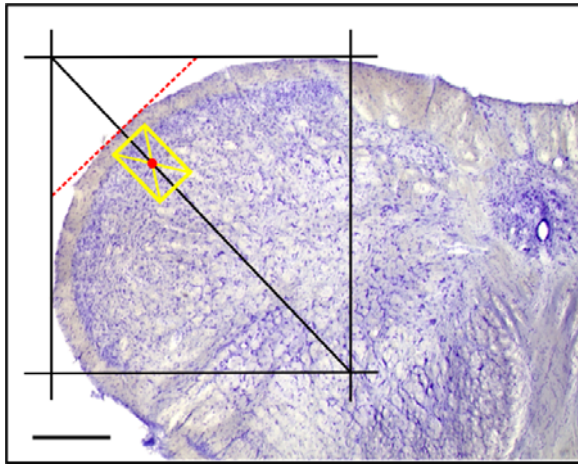


Figure 1



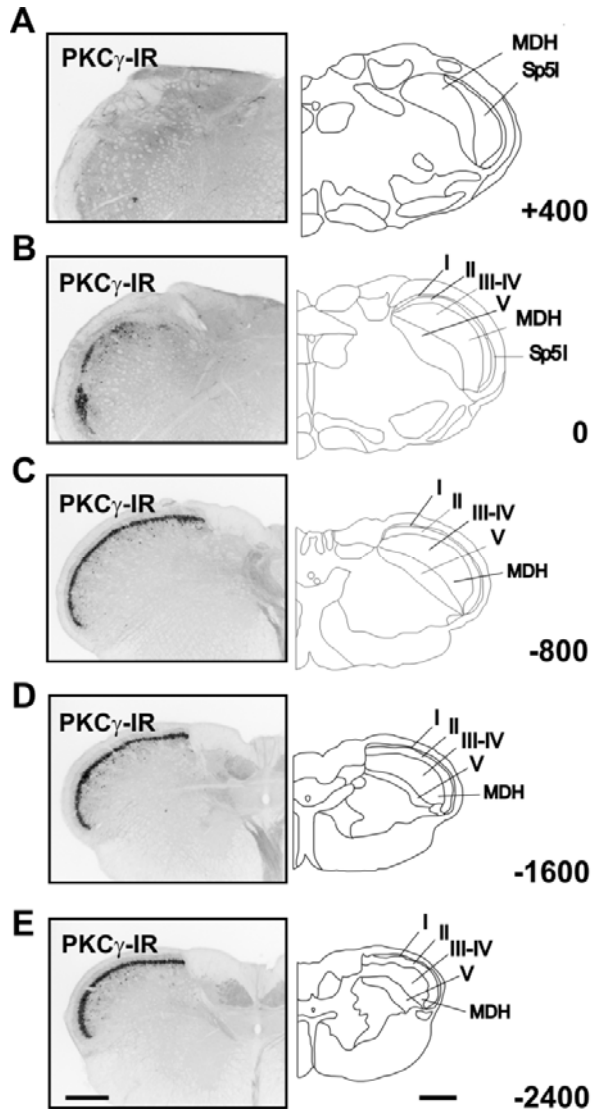


Figure 2

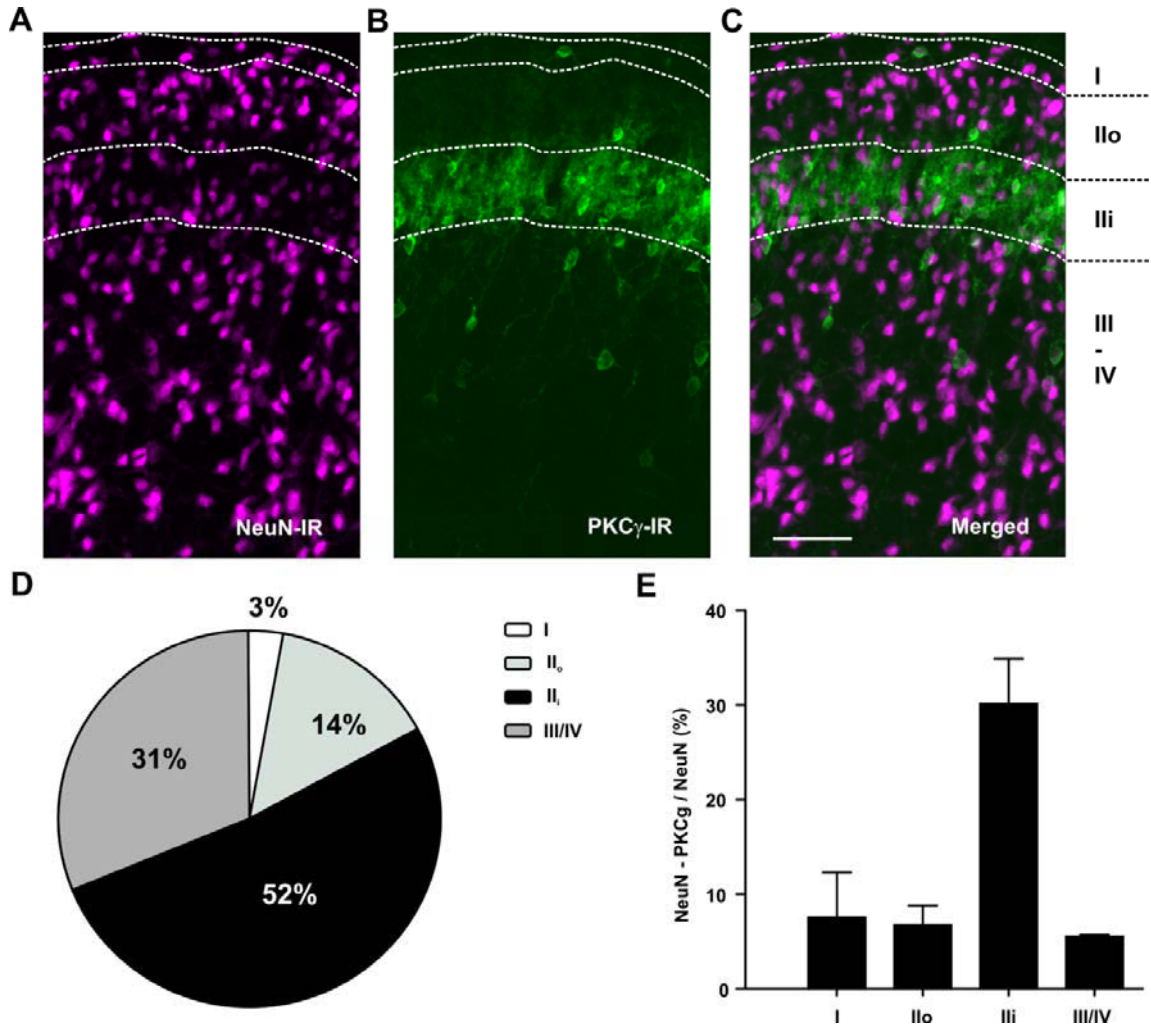


Figure 3

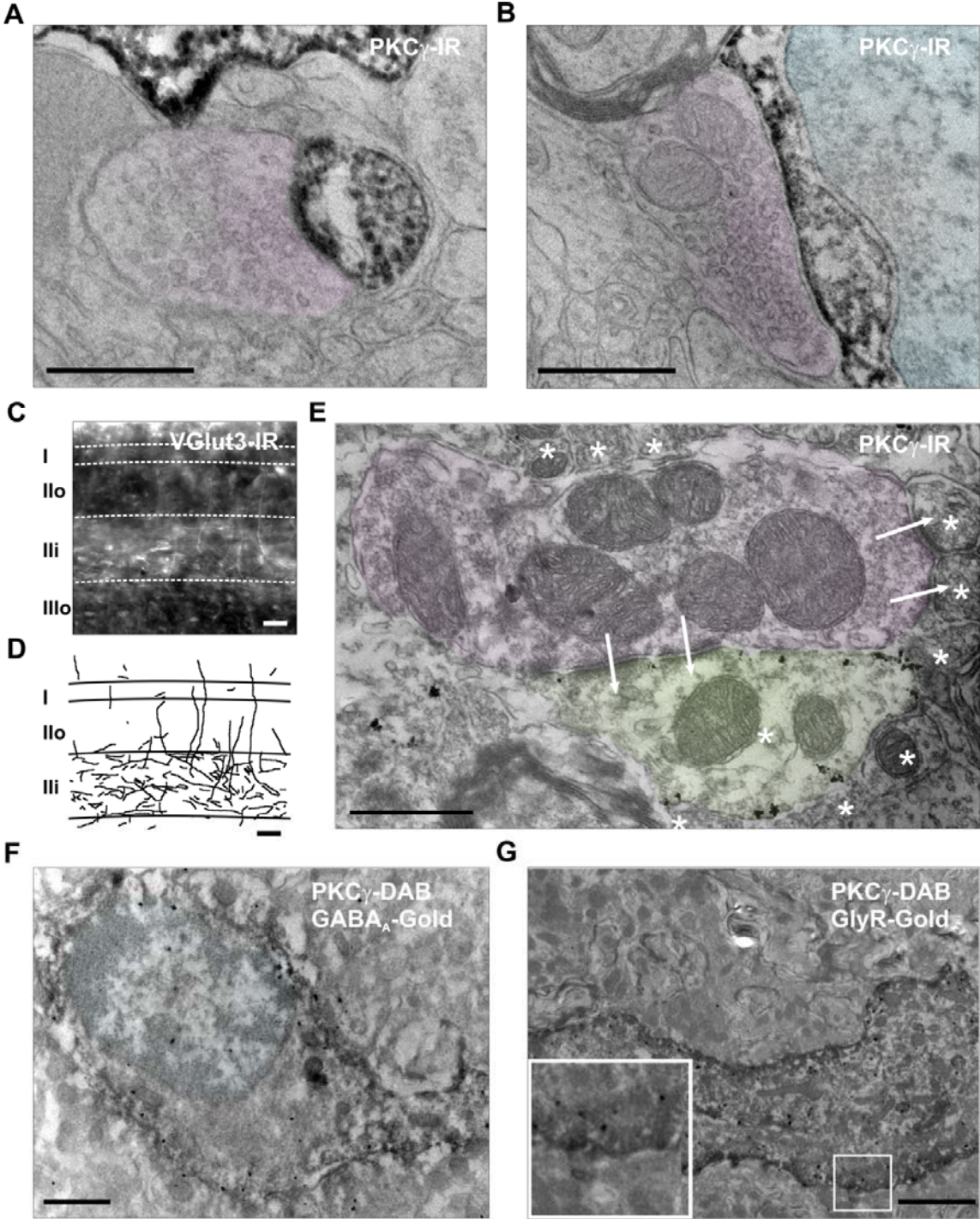


Figure 4

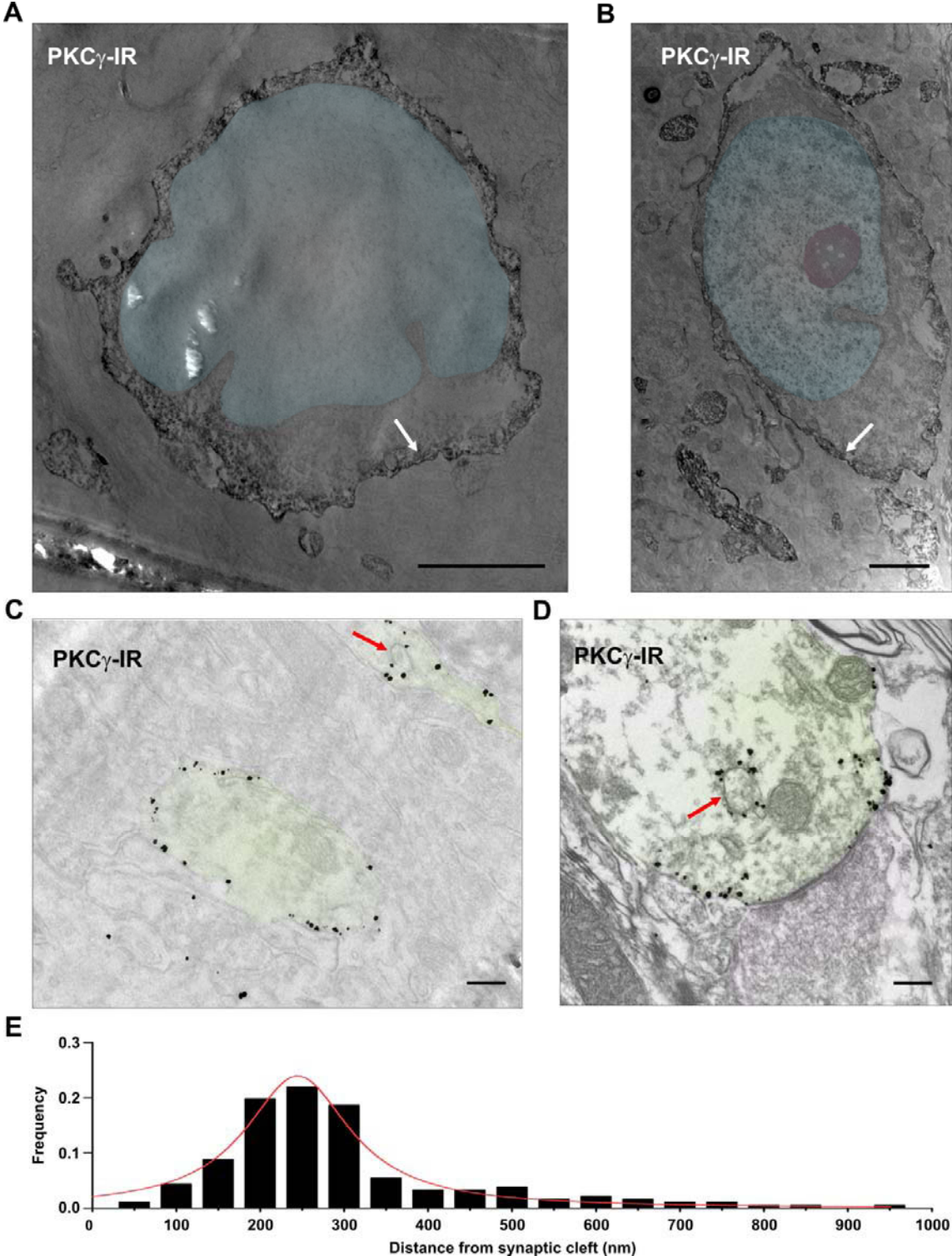


Figure 5



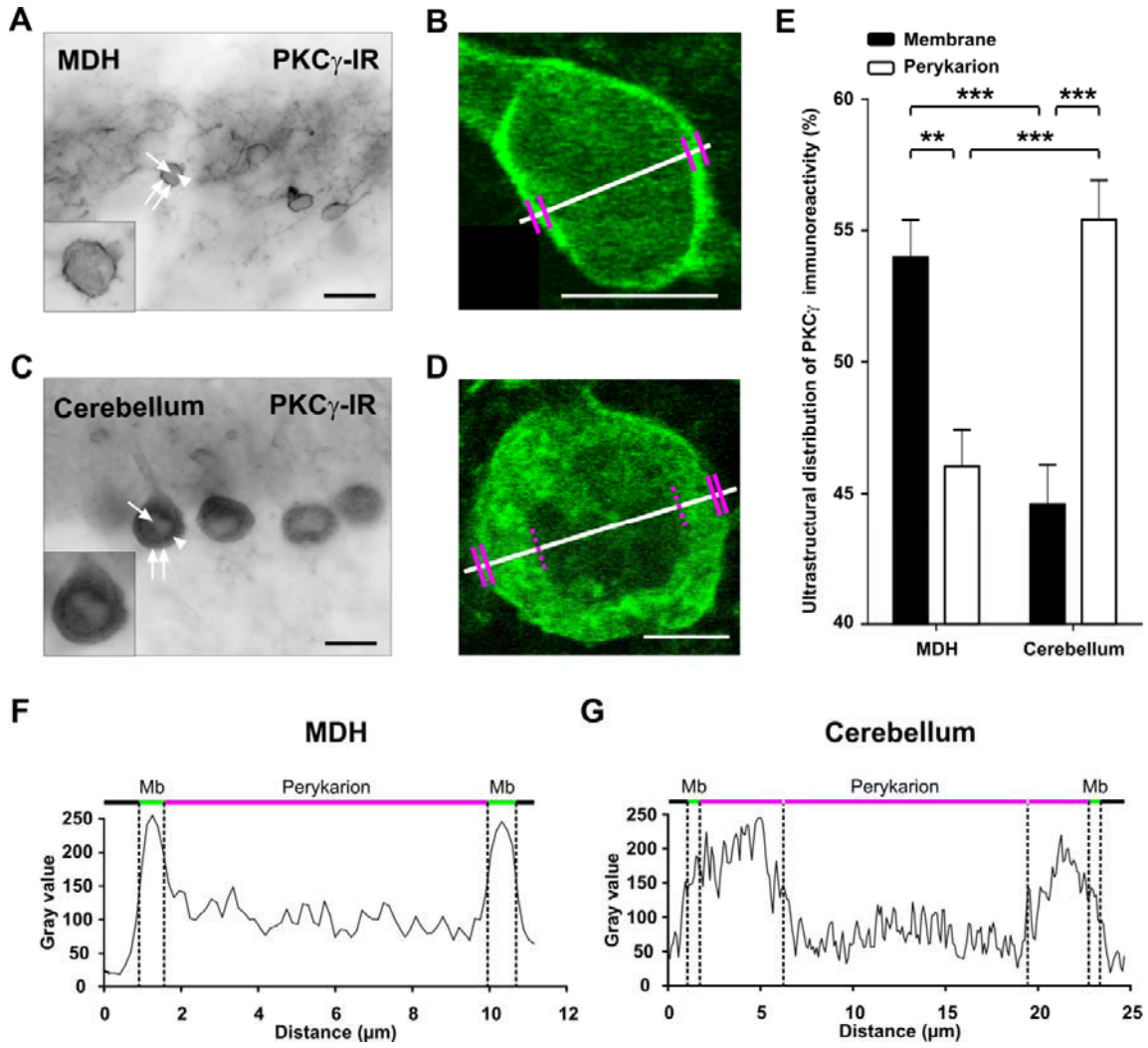


Figure 6

## CHAPITRE 4 : DISCUSSION GENERALE

*« Deux excès : exclure la raison, n'admettre que la raison. »*

*Pascal, Blaise*

**1. ALLODYNIE MECANIQUE : UN RESEAU NEURONAL SPECIFIQUE**

Les résultats obtenus dans le chapitre 2 mettent en évidence l'existence de deux réseaux neuronaux impliqués respectivement dans la douleur spontanée induite par injection sous-cutanée de capsaïcine et dans l'allodynie mécanique statique. Il semble donc que seuls les neurones des couches superficielles soient activés sélectivement par des stimulations nociceptives alors que les neurones de couche III ne sont activés que par des stimulations tactiles. En effet, dans différents modèles de douleurs, seuls les neurones des couches superficielles expriment le marqueur d'activité Fos (pour revue voir Coggeshall, 2005) ou p-ERK après injection sous cutanée de formol (Karim et al., 2001 ; Wei et al., 2006), de capsaïcine (Ji et al., 1999 ; Wei et al., 2006), d'huile de moutarde (Hunt et al., 1987), de CFA (Ji et al., 2002a ; Adwanikar et al., 2004) ou après lésion nerveuse périphérique (Cruz et al., 2005b) ou stimulations électrique (Ji et al., 1999) ou thermique (Hunt et al., 1987) nociceptives. Au contraire, lorsqu'une stimulation cutanée mécanique ou électrique non nociceptive est appliquée à la suite d'une inflammation ou d'une lésion nerveuse, les neurones activés sont situés dans les couches superficielles I et IIe mais aussi dans les couches plus profondes III et IIIe (Wang et al., 2004a ; Hao et al., 2005 ; Cruz et al., 2005b). Ce réseau polysynaptique, silencieux en condition physiologique (Wei et al., 2006 ; Miraucourt et al., 2007), est contrôlé par une puissante inhibition synaptique (Narikawa et al., 2000 ; Baba et al., 2003 ; Torsney and MacDermott, 2006) permettant de séparer le tact de la nociception. L'activation d'un tel réseau silencieux semble donc être liée à une fonction biologique protectrice, permettant d'éviter tout contact extérieur sur une zone inflammée, favorisant ainsi le processus de guérison. Si cette hypothèse est correcte, le réseau neuronal activé par une stimulation tactile lors de l'allodynie mécanique devrait s'éteindre après réparation de la zone inflammée. Il serait donc

intéressant d'étudier l'activité neuronale de la corne dorsale plusieurs heures après l'injection sous-cutanée de capsaïcine. Dans ce cas, une stimulation mécanique non nociceptive ne devrait plus être capable d'activer les neurones situés dans les couches I, IIe, Iii et IIIe.

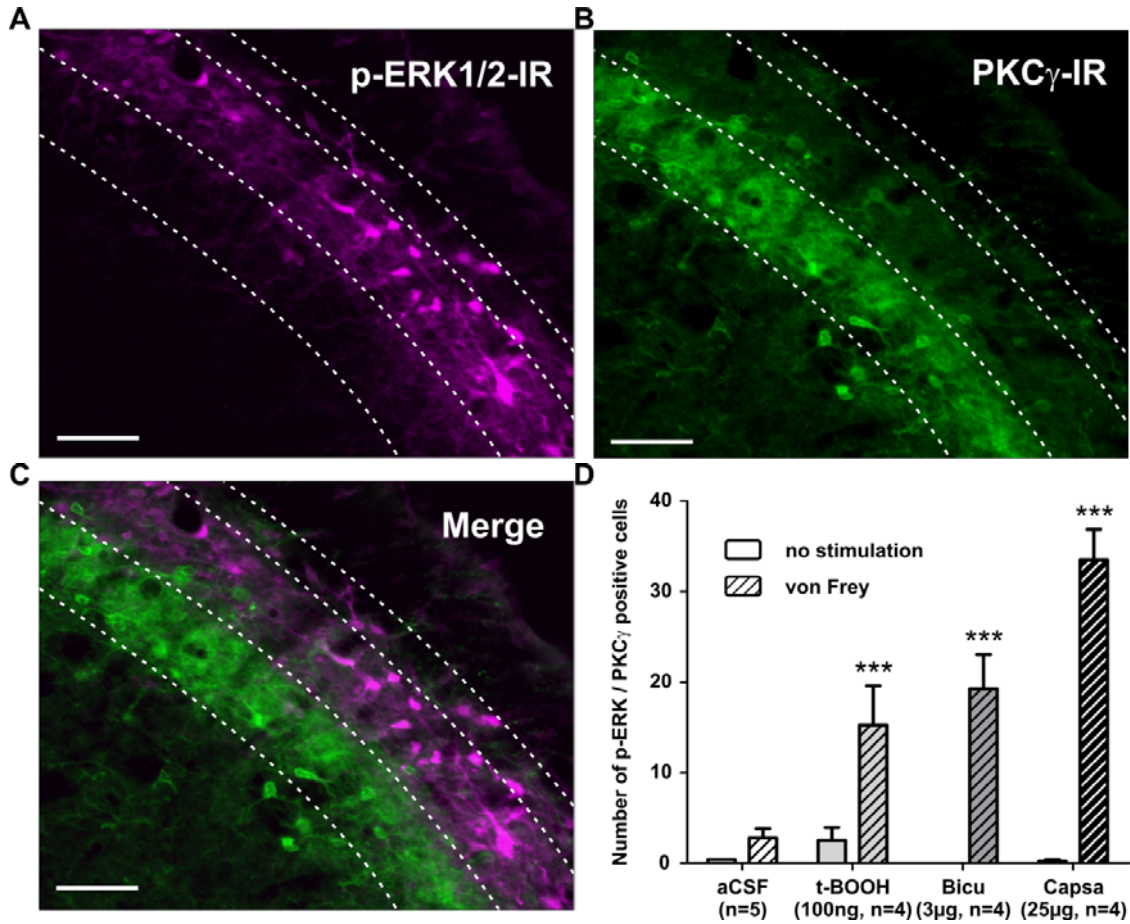
L'injection sous-cutanée de capsaïcine (25 $\mu$ g / 25 $\mu$ l) produit une douleur spontanée transitoire suivie d'une allodynie mécanique statique, ces deux symptômes étant liés à des réseaux neuronaux différents. Ce modèle de douleur utilisé dans notre étude semble donc particulièrement intéressant dans le but de faire le lien entre un mécanisme cellulaire particulier et une réponse comportementale donnée. Par exemple, il a été suggéré que l'allodynie mécanique statique, contrairement à l'hypersensibilité thermique ou la douleur spontanée, semble insensible à la morphine et à la mise en jeu des récepteurs opioïdes  $\mu$  (Dickenson and Sullivan, 1986 ; Attal et al., 2002 ; Eisenberg et al., 2006 ; Scherrer et al., 2009) mais ces résultats sont controversés (Lee et al., 1995 ; Field et al., 1999a ; Gonzalez et al., 2000). De plus, il a récemment été suggéré que l'allodynie mécanique statique est sensible à l'activation des récepteurs opioïdes  $\delta$  présents sur les fibres non nociceptives ainsi que dans la couche Iii, alors que l'hypersensibilité thermique reste inchangée dans ces conditions (Scherrer et al., 2009) mais ces résultats sont également controversés (Field et al., 1999a ; Field et al., 1999b ; Wang et al., 2010). Compte tenu de la séparation des réseaux neuronaux activés respectivement lors de la douleur spontanée ou de l'allodynie mécanique (résultats présents, Miraucourt et al., 2009), il serait donc intéressant d'étudier l'effet de l'activation des récepteurs  $\mu$  ou  $\delta$  sur la douleur spontanée induite par injection sous-cutanée de capsaïcine et sur l'expression de l'allodynie mécanique statique, ainsi que sur l'activité neuronale de la corne dorsale dans ces conditions.



## 2. ALLODYNIE MECANIQUE : INTERNEURONES PKC $\gamma$

Le réseau neuronal activé lors de l'allodynie mécanique, qu'elle soit statique (résultats présents) ou dynamique (Miraucourt et al., 2007), fait intervenir les interneurones PKC $\gamma$  de la couche Iii. Ces interneurones n'expriment normalement pas les marqueurs d'activité Fos ou p-ERK suite à une stimulation mécanique, qu'elle soit nociceptive ou non, sauf si celle-ci est prolongée comme une marche de 90 minutes (Neumann et al., 2008). Cependant, les interneurones PKC $\gamma$  expriment ces deux marqueurs d'activité après une stimulation mécanique légère dans des conditions pathologiques (résultats présents, (Miraucourt et al., 2007). Il semble donc que les interneurones PKC $\gamma$  ne puissent être activés que lors d'une allodynie mécanique, qu'elle soit d'origine neuropathique (Ma and Quirion, 2001), induite par injection intracisternale de strychnine (Miraucourt et al., 2007), de t-BOOH ou de bicuculline (nos résultats) ou par injection sous-cutanée de capsaïcine (nos résultats, Figure 27).

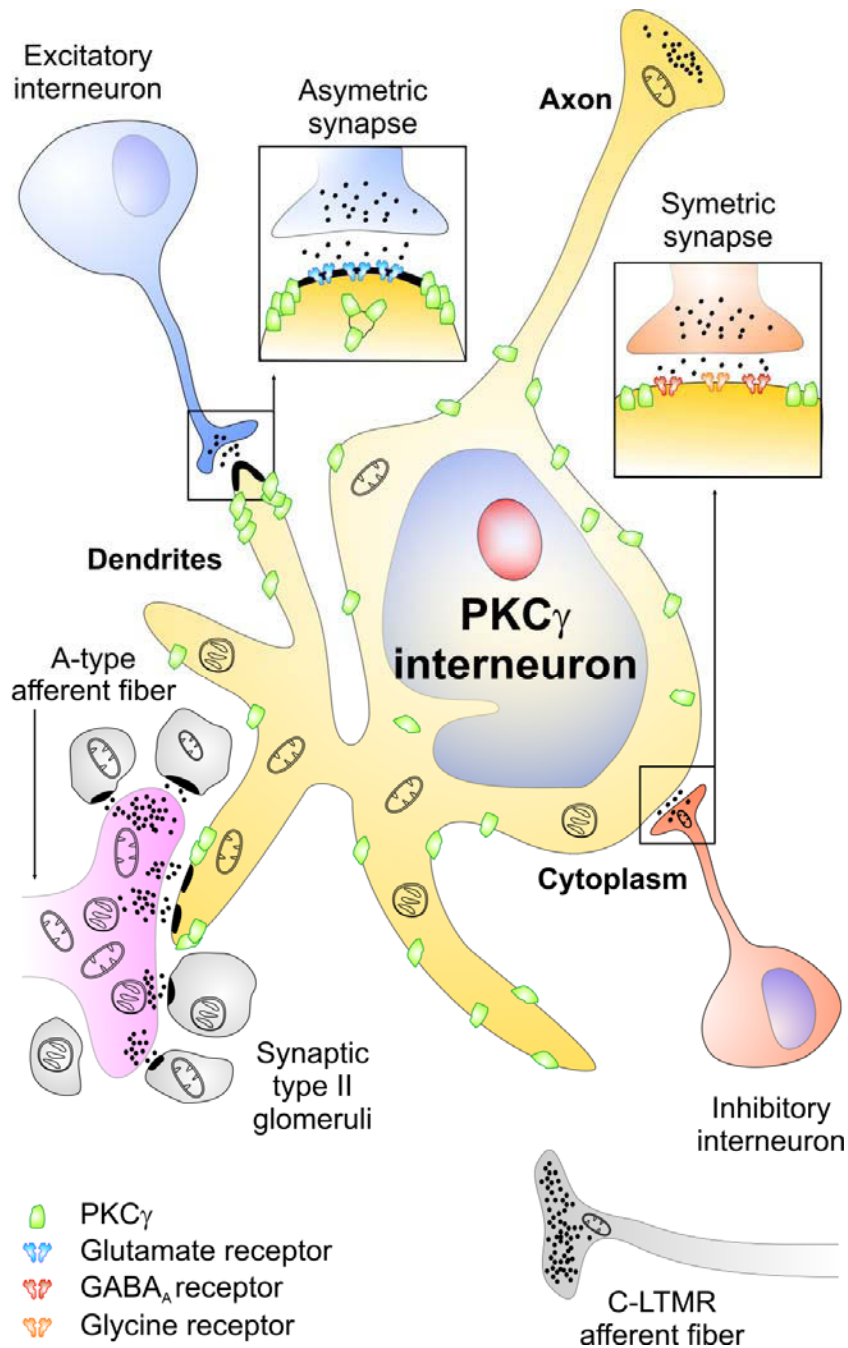
Les résultats obtenus au cours de cette thèse démontrent que la PKC $\gamma$  est indispensable à l'expression de l'allodynie mécanique, mais n'intervient pas dans la douleur spontanée. Cette particularité de la PKC $\gamma$  observée ici confirme les résultats similaires obtenus à l'aide d'animaux dont le gène codant pour la PKC $\gamma$  a été génétiquement supprimé (Malmberg et al., 1997b). De même, la stimulation des fibres nociceptives par la capsaïcine n'active pas les interneurones PKC $\gamma$  (Figure 27). Cette observation est en accord avec nos données de microscopie électronique montrant que les interneurones PKC $\gamma$  de la couche Iii ne sont pas contactés par des fibres possédant des vésicules à cœur dense et ne sont pas impliqués dans les glomérules de type I. Cette dernière étude a également révélé l'absence de synapses de fibres exprimant le VGLUT3 sur les interneurones PKC $\gamma$ . Les fibres C peptidergiques et non-peptidergiques ainsi que les fibres



**Figure 27 : Expression de p-ERK dans les neurones PKC $\gamma$ .** A, B et C. Immunomarquages des neurones p-ERK (A), PKC $\gamma$  (B) et superposition de A et B après injections sous-cutanée de capsaïcine (25 $\mu$ g). D. Quantification du nombre de neurones doublement marqués p-ERK / PKC $\gamma$  après injections intraciternales de aCSF, t-BOOH (100ng), bicuculline (3 $\mu$ g) ou sous-cutanée de capsaïcine (25 $\mu$ g), avec ou sans stimulation mécanique statique non nociceptive. Seule une stimulation mécanique légère après traitement au t-BOOH, à la bicuculline ou à la capsaïcine est capable d'induire une phosphorylation de ERK dans les neurones PKC $\gamma$ . \*\*\* P<0,001. Echelles = 50 $\mu$ m.

A $\delta$  nociceptives ne peuvent donc pas activer directement les interneurons PKC $\gamma$ . Ainsi, les interneurons PKC $\gamma$  ne peuvent être activés que par des stimulations tactiles impliquant les fibres A non nociceptives dont les terminaisons centrales forment des glomérules synaptiques de type II (résultats présents, Neumann et al., 2008). La présence de synapses de fibres A $\beta$  sur les interneurons PKC $\gamma$  a été démontrée dans une étude récente (Hughes et al., 2003 ; Neumann et al., 2008) mais l'existence de synapses impliquant les fibres A $\delta$  non nociceptives sur les interneurons PKC $\gamma$  reste encore à déterminer. Cependant, compte tenu du fait que, d'une part, les interneurons PKC $\gamma$  semblent être les premiers neurones de la voie polysynaptique de la corne dorsale impliquée dans l'allodynie mécanique statique (leur inhibition empêchant l'activation de cette voie), et d'autre part que l'allodynie mécanique statique implique l'activation de fibres A $\delta$  et C non nociceptives (voir chapitre 1), il est vraisemblable que les fibres A $\delta$  se terminent effectivement sur les interneurons PKC $\gamma$  (Figure 28).

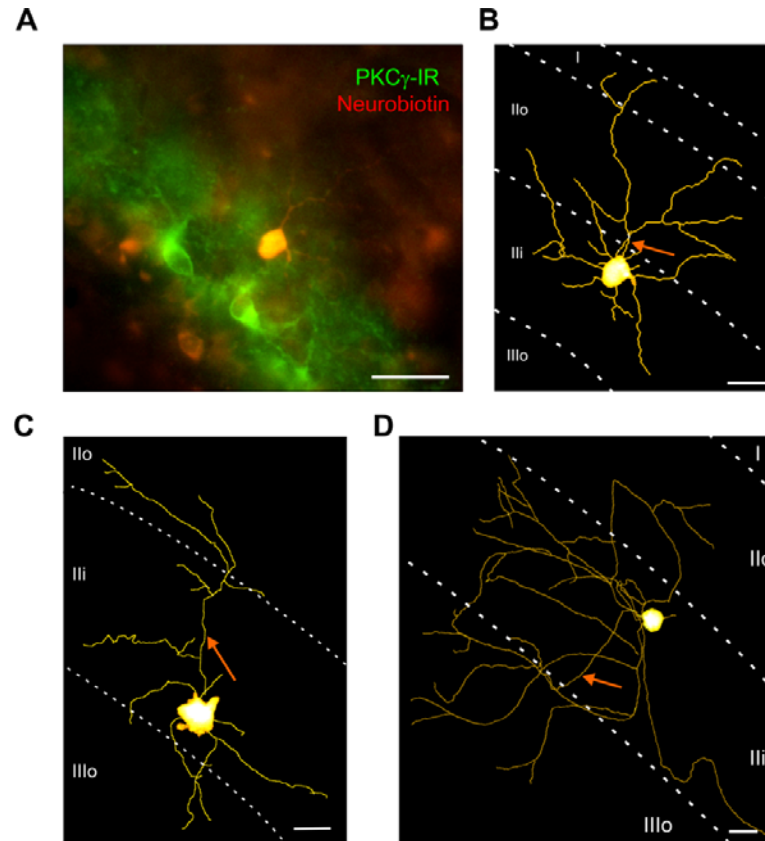
La localisation si spécifique de la PKC $\gamma$  dans la couche Iii de la corne dorsale semble étroitement liée à une fonction de barrière entre couches superficielles et couches profondes, et plus généralement entre tact et nociception. Cependant quel est le réseau neuronal activé en aval de la PKC $\gamma$  ? Il a été démontré que la transmission synaptique dans les couches I et II se fait uniquement dans un axe ventro-dorsal (Lu and Perl, 2005). Lorsque l'on observe l'immunoréactivité de la PKC $\gamma$  dans la couche Iii de la corne dorsale, celle-ci est confinée dans un neuropil dense au sein de la couche Iii et est globalement absente dans la couche I ou Iie (résultats présents, Polgar et al., 1999a). Par conséquence, il semblerait que les interneurons PKC $\gamma$  contactent d'autres interneurons situés également dans la couche Iii. Cependant, du fait de la localisation exclusivement postsynaptique de la PKC $\gamma$  dans la corne dorsale (résultats présents, Mori et al., 1990), les



**Figure 28 : Schéma hypothétique de l'environnement synaptique des interneurons PKC $\gamma$ .** Les interneurons PKC $\gamma$  possèdent des synapses asymétriques axo-dendritiques et des synapses asymétriques axo-somatiques. Ces interneurons sont contactés par des fibres afférentes primaires de type A formant des glomérules synaptiques de type II. Les fibres C-LTMR exprimant le VGLUT3 se projettent dans l'environnement cellulaire des interneurons PKC $\gamma$  mais ne contactent pas ces derniers. Au niveau postsynaptique, la PKC $\gamma$  est majoritairement membranaire, localisée en clusters autour de l'espace synaptique. La présence de récepteurs GABA $_A$  et de récepteurs à la glycine suggère que les interneurons PKC $\gamma$  peuvent être contrôlés par des courants inhibiteurs GABAergiques et glycinergiques.

prolongements axonaux des neurones PKC $\gamma$ , et donc la localisation de leurs cibles potentielles, sont inconnus. Pour répondre à cette problématique, j'ai effectué une série de marquages de neurones de la couche Iii de la corne dorsale à l'aide d'un traceur neuronal en utilisant des techniques d'électrophysiologie *in vitro*. Le phénotype PKC $\gamma$  de ces neurones marqués a ensuite été révélé *a posteriori* par une analyse en immunohistochimie. Ces neurones ont ensuite été reconstruits en trois dimensions à l'aide d'une analyse en microscopie confocale. Au total, 16 neurones ont été correctement marqués avec la neurobiotine. Parmi ces neurones, 1 était localisé dans la couche Iie, 7 étaient localisés dans la couche Iii mais n'exprimaient pas la PKC $\gamma$  et les 8 restants étaient des neurones PKC $\gamma$  de la couche Iii. La morphologie de ces neurones n'était pas homogène et regroupait des neurones de type « central cell » et « radial cell » mais jamais « islet cell » ou « vertical cell ». Un des neurones PKC $\gamma$  n'a pas pu être classé dans aucune de ces catégories (Figure 29). Les interneurones PKC $\gamma$  semblent posséder une arborisation dendritique confinée majoritairement dans la couche Iii. Les prolongements axonaux de ces interneurones semblent s'étendre sur le plan dorso-ventral et se terminent dans les couches Iie et I. Si ces résultats se confirment, cela indiquerait que les interneurones PKC $\gamma$  de la couche Iii sont potentiellement capables d'activer des neurones de couches plus superficielles, et de transformer le tact en douleur.

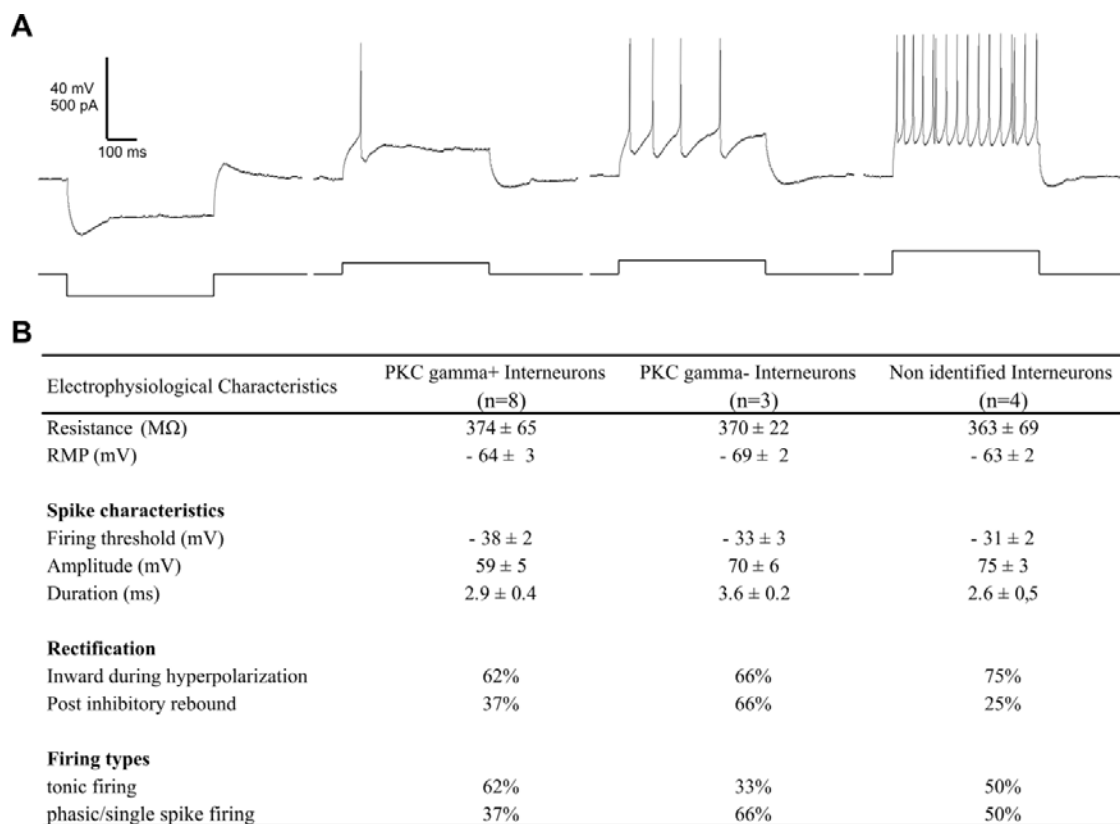
Le rôle exact de la PKC $\gamma$  dans la transformation du tact en douleur est cependant encore difficile à déterminer. Comme énoncé dans le chapitre 1, peu d'études se sont intéressées à la fonction de la PKC $\gamma$  dans la corne dorsale. Par ailleurs, les caractéristiques des interneurones PKC $\gamma$  dans la corne dorsale sont inconnues. Afin de répondre à cette problématique, j'ai voulu caractériser les propriétés électrophysiologiques passives des interneurones PKC $\gamma$  de la corne dorsale médullaire. Lors de cette étude préliminaire, j'ai



**Figure 29 : Morphologies des neurones PKC $\gamma$  de la couche III.** A. Photographie d'un neurone PKC $\gamma$  rempli avec de la neurobiotine. B, C et D. Reconstructions en trois dimensions de neurones PKC $\gamma$  remplis avec de la neurobiotine. Les neurones PKC $\gamma$  ont majoritairement une morphologie de type « radial cells » (B et C). Certains neurones PKC $\gamma$  sont cependant morphologiquement inclassables (D). Les axones de ces neurones (flèches) se projettent vers les couches superficielles I et (B) / ou (C) IIe. Echelles = 20  $\mu$ m (A) et 10  $\mu$ m (B-D).

pu observer que les interneurons PKC $\gamma$  de la couche Iii semblent avoir un profil de décharge majoritairement de type tonique, et phasique pour un tiers d'entre eux. A l'inverse, les autres neurones de la couche Iii semblent présenter un mode de décharge majoritairement de type phasique, et tonique pour un tiers d'entre eux. Aucun neurone présentant un profil de décharge décalé n'a été identifié dans la couche Iii. Les propriétés électrophysiologiques passives des interneurons PKC $\gamma$ , incluant leur résistance de membrane, leur potentiel de repos, leur seuil de décharge, l'amplitude des potentiels d'action qu'ils émettent et la longueur de ces potentiels d'action ne semblent pas différentes des autres neurones présents dans la couche Iii. Les interneurons PKC $\gamma$ , comme les autres neurones de la couche Iii, semblent posséder des canaux ioniques responsables de l'activation d'un courant rectifiant entrant lors de leur hyperpolarisation. Cependant, la fréquence d'apparition d'un rebond post-inhibiteur semble plus réduite concernant les interneurons PKC $\gamma$  par rapport aux autres neurones de la couche Iii (Figure 30). Les interneurons PKC $\gamma$  possèderaient-ils certaines caractéristiques électrophysiologiques propres, éventuellement liées à leur fonction particulière ? Ces résultats nécessitent cependant d'être confirmés.

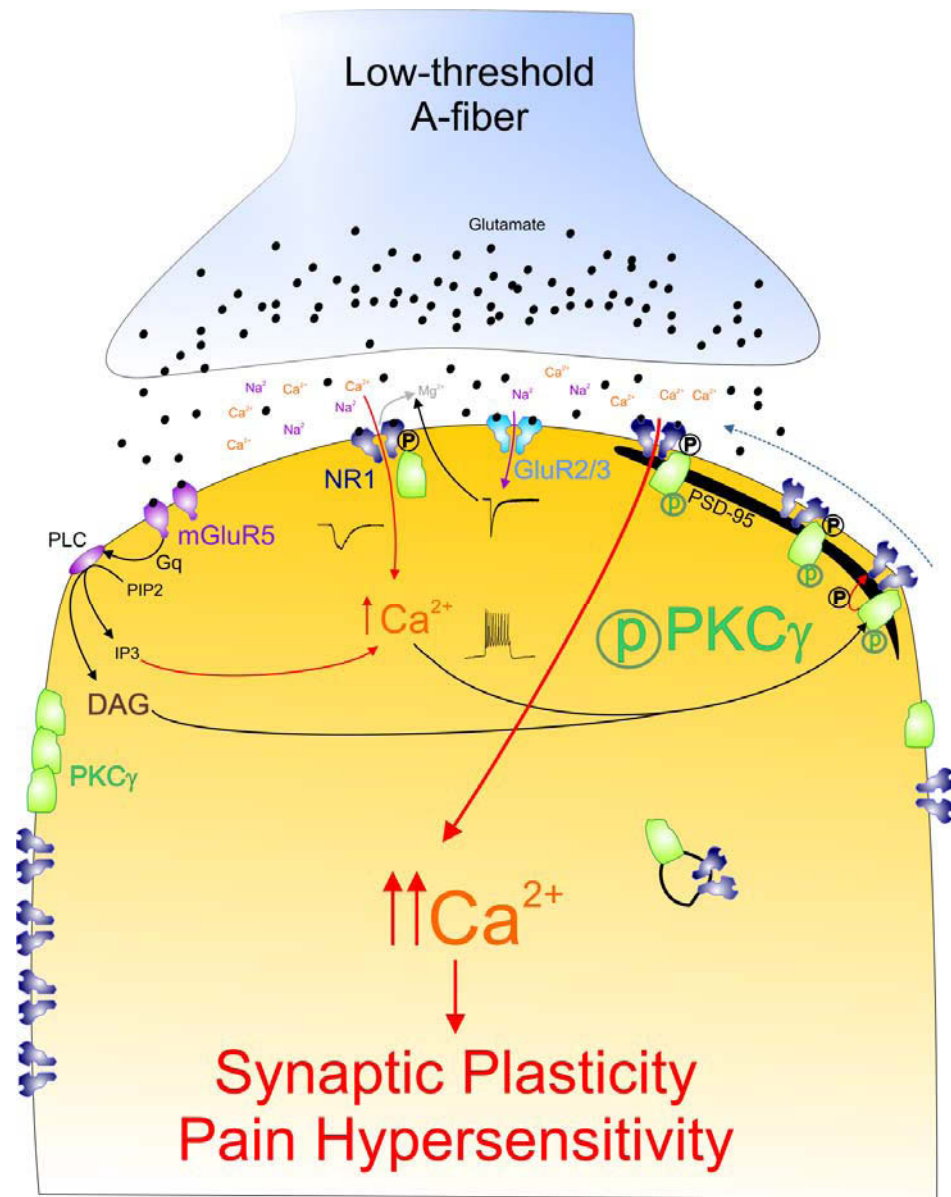
Les résultats présentés dans le chapitre 3 permettent également de mieux comprendre le rôle fonctionnel de la PKC $\gamma$  dans la corne dorsale. En effet, il apparaît que la PKC $\gamma$  est située majoritairement au niveau des membranes postsynaptiques chez un animal naïf. Ce résultat était inattendu compte-tenu du dogme relativement admis selon lequel les PKCs sont localisées dans le cytoplasme en condition basale mais sont transloquées vers la membrane lorsqu'elles sont activées (Sakai et al., 1997). La PKC $\gamma$  de la corne dorsale est-elle active en conditions basales ? Les résultats obtenus par western blot au cours de cette thèse semblent discréditer cette hypothèse. En effet, lors d'une stimulation mécanique après injection sous-cutanée de capsaïcine, la forme phosphorylée (active) de la PKC $\gamma$  est



**Figure 30 : Propriétés électrophysiologiques des interneurons PKCγ. A.** Profil de décharge tonique d'un interneurone PKCγ. Lorsqu'il est hyperpolarisé, ce neurone présente un courant rectifiant entrant. **B.** Propriétés électrophysiologiques passives des interneurons PKCγ comparés aux autres neurones de la couche Iii. Les interneurons PKCγ semblent posséder un profil de décharge majoritairement tonique. Les interneurons PKCγ ne semblent pas posséder de caractéristiques électrophysiologiques propres à cette population neuronale.



surexprimée de manière significative. Il semble donc que l'adressage à la membrane de la PKC $\gamma$  et sa phosphorylation (activation) sont deux événements indépendants sur le plan temporel. Les PKCs ont été impliquées dans l'adressage de récepteurs à la membrane, notamment AMPA et NMDA, lors d'une potentialisation synaptique (Lynch, 2004 ; Ruscheweyh et al., 2011 ; Sandkuhler and Gruber-Schoffnegger, 2012). Il est communément admis que cet adressage à la membrane, via une phosphorylation par la PKC, se fait de manière verticale, du cytosol vers la membrane (Li et al., 1999a). Cependant, il a également été démontré que les PKCs étaient impliquées dans les mouvements horizontaux des récepteurs, entre l'espace synaptique et extrasynaptique, mécanisme indispensable au renforcement synaptique (Groc et al., 2004 ; Groc et al., 2009 ; Bard et al., 2010). Par ailleurs, il a récemment été suggéré que la PKC $\gamma$  serait impliquée dans le complexe synaptique lié à la protéine PSD-95 (Huang et al., 2012), cette dernière jouant un rôle majeur dans le trafic membranaire de récepteurs au niveau synaptique (Dosemeci et al., 2007). Enfin, l'inhibition de la PKC $\gamma$  permet de diminuer les courants excitateurs de type NMDA (Li et al., 2005) nécessaires à la plasticité synaptique, à l'hypersensibilité mécanique et à l'activation du réseau neuronal impliqué dans l'allodynie mécanique (Miraucourt et al., 2007 ; Sandkuhler and Gruber-Schoffnegger, 2012). Compte-tenu de la localisation extrasynaptique de la PKC $\gamma$  dans la corne dorsale, il est donc possible que la PKC $\gamma$  joue un rôle important dans le transport membranaire des récepteurs NMDA de l'espace extrasynaptique vers l'espace synaptique, ou de l'adressage à la membrane d'un pool de récepteurs NMDA situé proche de la synapse (Kielland et al., 2009) (Figure 31).



**Figure 31 : Schéma hypothétique du rôle de la PKC $\gamma$  au niveau des épines dendritiques postsynaptiques.** Suite à une libération présynaptique de glutamate par les fibres périphériques, les récepteurs AMPA possédant les sous-unités GluR2/3 s'ouvrent et laissent entrer des ions Na<sup>+</sup> responsables d'un courant entrant et d'une dépoliarisation membranaire. Cette dépoliarisation permet de libérer les pores des canaux NMDA bloqués par des ions Mg<sup>2+</sup>. L'ouverture des canaux NMDA possédant la sous-unité NR1 permet une entrée importante de calcium augmentant ainsi la concentration calcique intracellulaire. Cette augmentation de calcium couplée à l'augmentation de DAG, par l'intermédiaire de l'activation des récepteurs glutamatergiques métabotropiques mGluR5, permet la phosphorylation de la PKC $\gamma$  localisée en clusters extrasynaptiques. La PKC $\gamma$  activée permet la phosphorylation des récepteurs NMDA extrasynaptiques et leur transport vers l'espace synaptique par l'intermédiaire du complexe protéique PSD-95. Les conséquences de l'activation d'un important courant NMDA permet d'augmenter suffisamment le calcium intracellulaire pour induire une plasticité synaptique responsable d'une hyperexcitabilité neuronale liée à une hypersensibilité mécanique

### 3. ALLODYNIE MECANIQUE : STATIQUE / DYNAMIQUE

Les résultats obtenus au cours de cette thèse démontrent que l'injection sous-cutanée de capsaïcine est responsable de l'apparition d'une allodynie mécanique statique, sans composante dynamique. De même, les injections intracisternales de t-BOOH ou de bicuculline n'induisent qu'une allodynie mécanique de type statique. Ces résultats ainsi que ceux obtenus précédemment au laboratoire (Miracourt et al., 2007) semblent indiquer que les deux types d'allodynie mécaniques, statique et dynamique, sont liés à des mécanismes différents impliquant respectivement une désinhibition segmentaire GABAergique ou glycinergique. Cette dichotomie de l'allodynie mécanique vis-à-vis de l'inhibition segmentaire avait déjà été suggérée par des travaux réalisés au laboratoire montrant que seule une stimulation mécanique statique permettait de modifier la pression artérielle d'animaux traités avec de la bicuculline alors que seule une stimulation mécanique dynamique permettait de modifier la pression artérielle d'animaux traités avec de la strychnine (Miracourt et al., 2007 ; Miracourt et al., 2009). En parallèle, comme énoncé au chapitre 1, les deux types d'allodynie mécaniques semblent faire intervenir des fibres périphériques différentes. L'allodynie mécanique dynamique impliquerait les fibres non nociceptives de type A $\beta$  et l'allodynie mécanique statique, les fibres non nociceptives de types A $\delta$  et C activables à bas seuil. Au niveau segmentaire, les deux types d'allodynie font intervenir des neurones de la couche I, IIe, IIi et IIIe (résultats présents, Miracourt et al., 2007). De même, les interneurons PKC $\gamma$  de la couche IIi sont impliqués dans l'allodynie mécanique statique et dynamique. Cependant, à l'heure actuelle, il n'est pas possible de déterminer si ces deux réseaux sont superposables ou parallèles. Néanmoins, le réseau impliqué lors de l'allodynie mécanique dynamique n'implique pas les neurones NK1 de la couche I (Miracourt et al., 2009). L'allodynie mécanique statique,

contrairement à l'allodynie mécanique dynamique, peut être réduite après injection sous-cutanée d'un antagoniste NK1 (Gonzalez et al., 2000). Par conséquent, il semble que l'implication des neurones NK1 de la couche I dans le réseau neuronal activé lors de l'allodynie mécanique statique dans nos conditions nécessite de futures investigations. Les interneurons PKC $\gamma$  de la couche III, jouant un rôle important dans l'allodynie mécanique, portent le récepteur GABA<sub>A</sub> et le récepteur à la glycine (résultats présents, Miraucourt et al., 2007). Compte tenu du fait que l'allodynie mécanique statique semble être liée à une désinhibition GABAergique et l'allodynie mécanique dynamique à une désinhibition glycinergique, il serait particulièrement intéressant d'étudier la présence de ces deux récepteurs sur une même population neuronale. Si, à l'inverse, il existe deux populations d'interneurones PKC $\gamma$ , cela mettrait en évidence l'existence de deux voies parallèles liées respectivement à l'allodynie mécanique statique et dynamique.

#### 4. CAUSE DE L'ALLODYNIE MECANIQUE STATIQUE

Comme énoncé au cours du chapitre 1, plusieurs hypothèses peuvent expliquer les mécanismes responsables de l'allodynie mécanique statique. Selon Woolf, l'allodynie pourrait être une conséquence de modifications morphologiques et phénotypiques des fibres A $\beta$  de la corne dorsale (von Hehn et al., 2012). Ces fibres seraient capables de contacter les neurones nociceptifs des couches superficielles après lésion périphérique ou de libérer des neuropeptides sur les neurones de la couche III positifs au NK1. Il est peu probable que ce phénomène soit responsable de l'allodynie mécanique statique observée dans nos conditions. En effet, d'une part le décours temporel de l'allodynie induite par la capsaïcine n'est pas compatible avec le temps nécessaire à une pousse axonale (Han et al., 2012), et d'autre part peu de neurones activés étaient localisés dans la couche III lors de l'allodynie mécanique statique dans nos conditions.

##### 4.1. POTENTIALISATION DES SYNAPSES EXCITATRICES ?

Il est envisageable que l'activation du réseau polysynaptique impliqué dans l'allodynie mécanique statique fasse suite à une potentialisation hétérosynaptique des synapses présentes sur les neurones de la couche III. Cette hypothèse est en accord avec le fait que la capsaïcine provoque une augmentation de l'amplitude des courants postsynaptiques excitateurs miniatures dans 27 % des neurones de la couche III *in vitro* (Pan and Pan, 2004). Cependant, nos résultats démontrent que les neurones PKC $\gamma$  sont strictement nécessaires à l'expression de l'allodynie mécanique statique ainsi qu'à l'activation du réseau neuronal qui lui est associé. Cependant, la PKC $\gamma$  exprimée exclusivement au niveau postsynaptique (Mori et al., 1990, nos résultats) révèle une arborisation dendritique de ces neurones confinée au sein de la couche III (Polgar et al., 1999a, nos résultats), cette dernière n'étant pas contactée par les fibres sensibles à la capsaïcine (Tominaga et al.,

1998). Chez la souris, des récepteurs TRPV1 ont cependant été retrouvés dans la couche Iii mais sont exclusivement localisés au niveau de la partie dorsale de la couche Iii où se projettent les fibres C non peptidergiques IB4-positives (Guo et al., 1999), alors que les interneurons PKC $\gamma$  sont situés plus ventralement (Neumann et al., 2008). Il est donc possible que la potentialisation des neurones de la couche Iii observée par l'équipe de Pan s'effectue sur une autre population neuronale que les interneurons PKC $\gamma$ . Cependant, l'hypothèse d'une potentialisation synaptique des interneurons PKC $\gamma$  par l'intermédiaire de cellules gliales ou de substances diffusibles ne peut pas être exclue. Néanmoins, il semble qu'une activation astrocytaire ou microgliale n'apparaisse que plusieurs heures voire plusieurs jours après une injection sous-cutanée de capsaïcine et n'interviendrait donc pas dans l'activation du réseau polysynaptique observée lors de l'allodynie mécanique statique dans nos conditions (Chen et al., 2009). Enfin, il ne semble pas que la potentialisation synaptique des interneurons PKC $\gamma$  par des facteurs diffusibles comme les ROS soit possible. En effet, l'application de ROS sur des tranches de moelle épinière n'induit pas de potentialisation synaptique des interneurons excitateurs (ni des interneurons inhibiteurs) dans la substance gélatineuse *in vitro* (Yowtak et al., 2011). L'activation du réseau polysynaptique observée après injection sous-cutanée de capsaïcine et stimulation mécanique statique non nociceptive ne semble donc pas être la conséquence d'une potentialisation homosynaptique ou hétérosynaptique de synapses excitatrices dans la corne dorsale. Néanmoins, cela n'exclut pas la possibilité qu'un tel mécanisme participe à l'activation du réseau dans son ensemble. Une potentialisation synaptique excitatrice des interneurons PKC $\gamma$  ne semble simplement pas possible pour expliquer l'activation de cette voie polysynaptique.

#### 4.2. DESINHIBITION SEGMENTAIRE

Une potentialisation synaptique excitatrice des interneurons PKC $\gamma$  étant difficile à déterminer, une diminution des contrôles inhibiteurs segmentaires pourrait expliquer l'allodynie mécanique statique observée dans nos conditions. Plusieurs données électrophysiologiques supportent cette hypothèse. Bien que les résultats des études électrophysiologiques intracellulaires soient controversés, il a été montré que la capsaïcine active des terminaisons nerveuses présynaptiques mais aussi des interneurons de la corne dorsale, majoritairement GABAergiques. En effet, des récepteurs TRPV1 ont été identifiés sur 77% des neurones exprimant la GAD67 dans la substance gélatineuse, et sur 25% de neurones n'exprimant pas la GAD67 (Kim et al., 2012b). De plus, un effet de l'application de capsaïcine *in vitro* par un mécanisme postsynaptique, en présence de tétradotoxine (bloquant la génération de potentiels d'action) a été reporté (Pan and Pan, 2004). Ainsi, plusieurs études ont reporté une augmentation de la fréquence des courants inhibiteurs spontanés ou miniatures (Zhou et al., 2007 ; Ferrini et al., 2007 ; Zhou et al., 2008 ; Ferrini et al., 2010) après application de capsaïcine. A l'inverse certains neurones de la couche II semblent répondre à la capsaïcine par une diminution de fréquence de ces courants (Zhou et al., 2007). D'autres encore ne subissent aucune modification des courants inhibiteurs après traitement à la capsaïcine (Yang et al., 1998 ; Yang et al., 1999 ; Zhou et al., 2007 ; Zhou et al., 2008).

Compte tenu de l'hétérogénéité des neurones de la couche II (voir chapitre I), il semble difficile de formuler des hypothèses à partir de résultats obtenus par électrophysiologie *in vitro*, sans connaître ni la localisation des neurones enregistrés (couche IIe ou Iii), ni la nature de ces neurones (excitateurs ou inhibiteurs). En effet, une diminution de l'inhibition sur un neurone excitateur aura tendance à augmenter l'excitabilité du réseau neuronal, alors que cette même diminution de l'inhibition sur un

neurone inhibiteur aura l'effet inverse. Néanmoins, deux récentes publications suggèrent que la capsaïcine faciliterait la transmission inhibitrice glycinergique (68% des neurones enregistrés) et déprimerait la transmission inhibitrice GABAergique dans la couche II (Zhou et al., 2007 ; Zhou et al., 2008). Cette dissociation pourrait expliquer la présence d'une allodynie mécanique statique sans allodynie mécanique dynamique après injection sous-cutanée de capsaïcine (résultats présents) ou en condition neuropathique (Ochoa and Yarnitsky, 1993).

#### 4.3. ORIGINE DE LA DESINHIBITION

L'origine de la désinhibition, comme énoncé au chapitre 1, peut être expliquée selon plusieurs hypothèses. L'implication des voies descendantes d'origine supraspinale dans la désinhibition segmentaire n'a pas été testée expérimentalement dans nos conditions, mais les données de la littérature semblent indiquer que ces contrôles joueraient davantage un rôle dans la chronicisation des douleurs plutôt que dans leur initiation (Burgess et al., 2002 ; Porreca et al., 2002 ; Zhang et al., 2009 ; De Felice et al., 2011). Une désinhibition par apoptose neuronale est également peu probable. En effet, l'allodynie mécanique statique observée dans nos conditions apparaît rapidement et ne coïncide pas avec le temps nécessaire à la mise en jeu d'une voie apoptotique (Kerr et al., 1972 ; Wang and Qin, 2010). De plus, cette allodynie est de courte durée et transitoire, ce qui ne laisse pas sous-entendre qu'une perte neuronale puisse jouer un rôle dans nos conditions.

La désinhibition segmentaire, si elle a lieu, a donc une origine présynaptique (diminution de la libération ou augmentation de la recapture de neurotransmetteurs inhibiteurs) ou postsynaptique (diminution de l'expression ou du pouvoir hyperpolarisant de récepteurs inhibiteurs postsynaptiques). Cependant, aucune modification de l'amplitude des courants inhibiteurs miniatures dans la couche II n'a été observée après



traitement à la capsaïcine in vitro (Zhou et al., 2007 ; Ferrini et al., 2007 ; Zhou et al., 2008 ; Ferrini et al., 2010). Par conséquent, il semblerait que les mécanismes responsables de la désinhibition observée après traitement à la capsaïcine soit uniquement d'origine présynaptique.

#### 4.4. CAUSES DE LA DESINHIBITION

Les causes de la désinhibition segmentaire après lésion périphérique représentent probablement un des axes majeurs de la Recherche sur les mécanismes physiopathologique de la douleur. De nombreux médiateurs comme l'adénosine, la nocistatine, la somatostatine, les cannabinoïdes endogènes, les opioïdes, les ROS ou le GABA lui même peuvent induire une diminution de la libération de GABA dans la corne dorsale (Yowtak et al., 2011 ; Zeilhofer et al., 2012). Le travail effectué au cours de cette thèse associe l'allodynie mécanique statique à une désinhibition GABAergique dépendante d'une surproduction de ROS après stimulation excessive des fibres C. Cette hypothèse est basée sur plusieurs observations. D'une part, les résultats obtenus après injection intracisternale de bicuculline ou du donneur de ROS, t-BOOH, démontrent l'apparition d'une allodynie uniquement statique et l'activation d'un réseau polysynaptique impliquant les interneurons PKC $\gamma$  similaire à celui observé lors de l'allodynie mécanique statique induite par injection sous-cutanée de capsaïcine. D'autre part le piègeur de ROS, PBN, dont l'effet peut être bloqué par l'antagoniste GABA<sub>A</sub>, la bicuculline (Yowtak et al., 2011), permet de prévenir l'allodynie mécanique statique et l'activation du réseau polysynaptique qui lui est associé, après injection sous-cutanée de capsaïcine. Enfin, les données de la littérature suggèrent que les ROS, produits en quantité importante après injection de capsaïcine (Schwartz et al., 2008) ou lors de lésions neuropathiques (Schwartz et al., 2009), ne modifieraient pas la transmission synaptique

excitatrice mais entrainerait une diminution de la libération de GABA par un mécanisme présynaptique (Yowtak et al., 2011). Le mécanisme d'action des ROS sur la transmission synaptique inhibitrice dans la corne dorsale n'est pas connu à ce jour. De plus, les ROS regroupent une famille de molécules et d'enzymes diverses agissant sur de nombreuses cibles par plusieurs mécanismes (Maher and Schubert, 2000). Un des meilleurs exemples illustrant la complexité des mécanismes d'action des ROS dans la douleur est probablement le NO. Depuis plus de 25 ans, de nombreuses études ont été réalisées concernant l'implication ou les mécanismes d'action du NO dans de nombreuses fonctions physiologiques et physiopathologiques (Janicki and Jeske-Janicka, 1999 ; Droge, 2002) de sorte qu'aujourd'hui, près de 700 articles traitant du NO sont publiés chaque année (recherche PubMed, mot clé : nitric oxide). Le NO a été impliqué dans toutes les formes de douleurs, qu'elles soient physiologiques ou pathologiques, d'origine inflammatoire ou neuropathique, périphériques ou centrales, spinales ou trigéminales, ainsi que dans toutes les modalités, qu'elles soient mécaniques ou thermiques (Cury et al., 2011 ; Fan et al., 2012). Selon les publications, le NO peut être analgésique ou proalgique en fonction du territoire sur lequel il agit, de sa concentration et du milieu intracellulaire auquel il est confronté (Cury et al., 2011). Bien que le rôle du NO dans la douleur soit indubitable, la compréhension de ses mécanismes d'action est encore largement méconnue aujourd'hui. De récentes publications s'intéressant à la compréhension du double rôle du NO dans la nociception et l'analgésie (Cury et al., 2011) ou celle concernant les douleurs orofaciales (Fan et al., 2012) soulignent la complexité des fonctions et des mécanismes d'actions du NO. De ce fait, si la compréhension des mécanismes d'action d'une seule molécule engendre un tel niveau de complexité, il apparait difficile de pouvoir expliquer les mécanismes d'action des ROS qui regroupent une famille de molécules.

Cependant, il a récemment été suggéré que les ROS étaient impliqués dans la plasticité synaptique de la corne dorsale par le mécanisme suivant : l'activation de neurones par les récepteurs NMDA permettrait une augmentation importante de calcium intracellulaire, celui-ci étant entraîné vers le milieu intra-mitochondrial par l'intermédiaire d'unitransporteurs. L'augmentation du calcium dans les mitochondries entraînerait une surproduction de ROS responsables d'une plasticité synaptique. Dans ce mécanisme, les superoxydes joueraient un rôle prépondérant (Kim et al., 2011). De manière intéressante, la plasticité synaptique intervenant dans l'hippocampe ou dans l'amygdale font intervenir non pas les superoxydes mais leurs dérivés, les peroxydes d'hydrogène (Kamsler and Segal, 2003), après dismutation par la SOD2 (Brookes et al., 2004). A l'inverse, l'inhibition de la SOD2 dans la corne dorsale entraîne une hyperalgésie mécanique après injection sous-cutanée de capsaïcine, alors que l'activation de la SOD2 empêche cette hypersensibilité (Schwartz et al., 2009). Comment les superoxydes modifient-ils la transmission GABAergique sans modifier la transmission inhibitrice glycinergique ou la transmission excitatrice dans la corne dorsale ? Compte tenu de la composition chimique du GABA ( $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{NH}_2$ ), de la glycine ( $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$ ) ou du glutamate ( $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$ ), il est peu probable que les superoxydes agissent préférentiellement sur le GABA en raison d'une plus forte affinité moléculaire. De manière intéressante, il a été démontré que les neurones de la corne dorsale colibèrent du GABA et de l'ATP (Jo and Schlichter, 1999). Cette particularité n'est pas retrouvée dans la transmission glutamatergique (Jo and Schlichter, 1999) et n'a jamais été reporté dans la transmission glycinergique. D'autre part, les superoxydes sont responsables d'une diminution du gradient de proton exercé sur la chaîne respiratoire mitochondriale suivie d'une diminution de la production d'ATP (Talbot et al., 2004 ; Pryde and Hirst, 2011). La sélectivité de l'action des ROS sur les neurones GABAergique de la corne dorsale est-elle

liée à une diminution de la production d'ATP et/ou de la colibération de GABA et d'ATP ? A ce point, il semble que de futures investigations sont nécessaires afin de comprendre le rôle des superoxydes dans les voies de synthèse ou de libération du GABA.

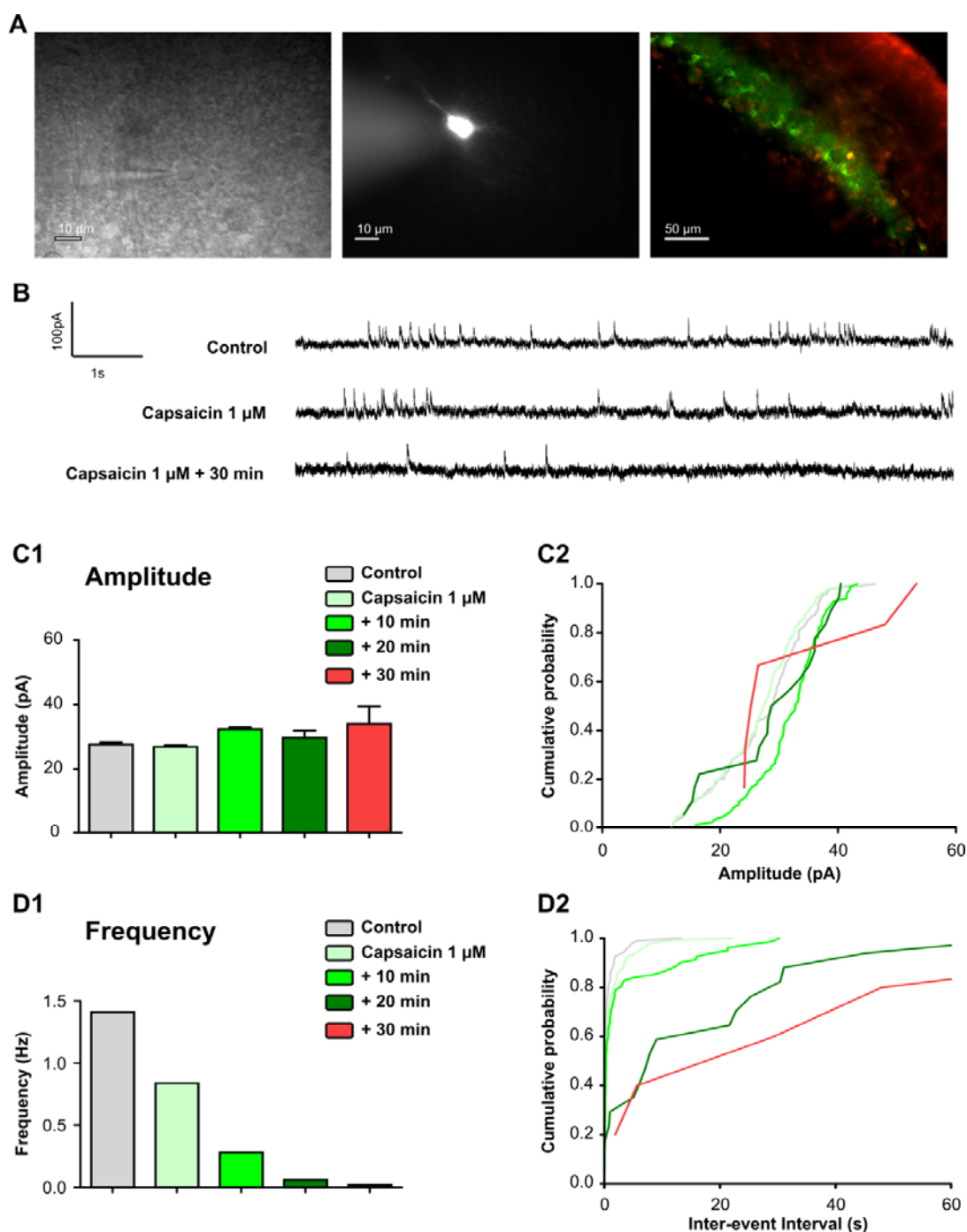
L'allodynie mécanique statique observée après injection sous-cutanée de capsaïcine n'est que partiellement réduite par le PBN à la dose utilisée au cours de cette thèse. En raison des effets locomoteurs délétères potentiellement inductibles par une dose supérieure, il n'a pas été possible d'étudier l'effet d'un blocage plus important des ROS sur l'allodynie mécanique statique observée après injection sous-cutanée de capsaïcine. Cependant, il est possible que les ROS ne soient pas la seule source responsable d'une désinhibition GABAergique. En effet, bien qu'aucune diminution de l'amplitude des courants postsynaptiques excitateurs miniatures n'ait été reportée après traitement à la capsaïcine, ni dans la couche IIe, ni dans la couche III (Pan and Pan, 2004), une récente publication rapporte que la capsaïcine serait capable d'induire une dépression des synapses excitatrices présentes sur les neurones GABAergiques (Kim et al., 2012b). Il est donc possible que la désinhibition GABAergique induite par la capsaïcine résulte d'une diminution de l'excitabilité des neurones GABAergiques par les fibres nociceptives ainsi qu'une diminution de la libération de GABA dans ces neurones, par les ROS (Figure 32).

Il est important de noter que l'hypothèse d'une désinhibition induite par les ROS après injection sous-cutanée de capsaïcine n'est pas démontrée de manière directe dans les travaux présentés dans cette thèse. Ainsi, bien que ces résultats soient soutenus par les données de la littérature, une approche différente est nécessaire afin de confirmer qu'une désinhibition GABAergique dépendante des ROS se produit effectivement sur les interneurons PKC $\gamma$  après traitement à la capsaïcine. Les dernières expériences que j'ai pu réaliser par électrophysiologie *in vitro* afin de confirmer, ou d'infirmer, cette hypothèse,



sont encourageantes. Dans cette étude préliminaire, j'ai cherché à caractériser les modifications de courants inhibiteurs s'exerçant sur les neurones PKC $\gamma$  après traitement à la capsaïcine *in vitro*. Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe aucune méthode publiée dans la littérature permettant de cibler visuellement, morphologiquement ou électrophysiologiquement les interneurones PKC $\gamma$ . Pour une raison encore inconnue, les constructions génétiques permettant d'exprimer une protéine fluorescente comme la GFP sous le contrôle du promoteur de la PKC $\gamma$  de la corne dorsale à l'état adulte ont toutes échouées (Sakai et al., 1997 ; Sakai et al., 2004 ; Ding et al., 2005). De ce fait, il n'est pas possible d'utiliser une approche traditionnelle permettant de placer une électrode d'enregistrement sur un neurone directement identifiable sous microscope par fluorescence en utilisant une technique de patch-clamp (Heinke et al., 2004 ; Hughes et al., 2012). Cependant, étant donnée la proportion des interneurones PKC $\gamma$  dans la couche Ili démontrée dans le chapitre 3 (environ un tiers), la probabilité d'enregistrer un interneurone PKC $\gamma$  en plaçant une électrode « en aveugle » dans la couche Ili s'élève, en théorie, à 1 sur 3. J'ai donc effectué une analyse des courants inhibiteurs spontanés s'exerçant sur des neurones de la couche Ili dans des tranches de tronc cérébral perfusées pendant cinq minutes avec de la capsaïcine par une technique de patch-clamp (whole cell) sans prendre en compte, dans un premier temps, le phénotype cellulaire. Dans un deuxième temps, le phénotype PKC $\gamma$  des neurones enregistrés et préalablement remplis à l'aide d'un traceur neuronal (la neurobiotine) contenu dans la pipette d'enregistrement, a été révélé par immunofluorescence. Les résultats préliminaires obtenus lors de ces enregistrements électrophysiologiques *in vitro* semblent indiquer que les courants inhibiteurs s'exerçant sur les interneurones PKC $\gamma$  de la couche Ili seraient diminués après traitement à la capsaïcine, par un mécanisme présynaptique (Figure 33). Si ce résultat se confirme, cela indiquerait que les neurones PKC $\gamma$  subissent effectivement une

désinhibition après traitement à la capsaïcine. Le rôle des ROS lors de cette désinhibition des interneurones PKC $\gamma$  devra également être confirmé.



**Figure 33 : Effet de l'application de capsaïcine 1  $\mu$ M sur les courants postsynaptiques inhibiteurs (IPSCs) dans les neurones PKC $\gamma$  de la couche III. A.** Photographies représentant un neurone PKC $\gamma$  visible par contraste infrarouge, injection intracellulaire de dextran fluorescent ou double marquage immunofluorescent PKC $\gamma$  / neurobiotine. **B.** Enregistrements montrant les IPSCs d'un neurone PKC $\gamma$  en condition contrôle, immédiatement après application de capsaïcine (1  $\mu$ M) et 30 minutes après capsaïcine. **C.** Quantifications de l'amplitude (C) et de la fréquence (D) des IPSCs sous forme de moyennes (C1 et D1) ou de probabilités cumulées (C2 et D2) en condition contrôle, immédiatement après application de capsaïcine (1  $\mu$ M) et 30 minutes après capsaïcine. La fréquence mais pas l'amplitude des IPSCs est réduite après traitement à la capsaïcine.



## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'ensemble du travail présenté ici a permis de mettre en évidence les mécanismes et les réseaux neuronaux segmentaires responsables de l'allodynie mécanique statique. L'implication fondamentale et spécifique de la PKC $\gamma$  lors de l'allodynie mécanique fait de cette protéine une cible thérapeutique prioritaire permettant de traiter l'allodynie mécanique lors de douleurs trigéminales. Il est aujourd'hui clair qu'une molécule unique capable de traiter l'ensemble des douleurs chroniques relate d'une vision utopique et incohérente avec la réalité biologique. En effet, un patient souffrant d'un type de douleur particulier peut présenter plusieurs symptômes. Plusieurs patients souffrants d'une même pathologie peuvent présenter des symptômes différents. Enfin, un même symptôme peut avoir différentes étiologies (Dallel and Voisin, 2001 ; Baron et al., 2010). Ainsi, dans une recherche de traitement thérapeutique, il semble nécessaire de diagnostiquer un symptôme particulier en clinique et d'essayer d'en comprendre la mécanistique plutôt que de considérer un traitement de douleurs chroniques dans un cadre plus général.

Il est également important de noter que les résultats présentés dans cette thèse ne signifient pas qu'ils soient transposables à tous les types d'allodynie mécanique statiques observés en clinique. Il apparait donc important de continuer les investigations concernant l'implication de la PKC $\gamma$  dans d'autres types de douleur. De même, il est très probable que d'autres mécanismes que ceux présentés ici, d'origine suprasegmentaire notamment, viennent s'ajouter lors de la chronicisation de la douleur. De prochaines études visant à déterminer l'implication de la PKC $\gamma$  dans l'induction ou la maintenance de douleurs chroniques apparait donc indispensable. Enfin, de prochaines investigations visant à traiter l'allodynie mécanique par inhibition de la PKC $\gamma$  par un traitement curatif plutôt que préventif devront être envisagées.

## CHAPITRE 5 : ANNEXES

*« La science consiste à oublier ce qu'on croit savoir, et la sagesse à ne pas s'en soucier. »*

*Charles Nodier*

## ANNEXE 1

**SUPPLEMENTARY MATERIAL AND METHODS (in vitro Electrophysiology)****Animals**

Adult Sprague–Dawley rats (30 - 40 days) were obtained from Charles River (L'Arbresle, France) and maintained in a controlled environment (light on 19.00 - 7.00, 22°C). Water and food were provided *ad libitum*. Rats were housed 3-4 per cage. All efforts were made to minimize the number of animals used. The experiments followed the ethical guidelines of the International Association for the Study of Pain and ethical guidelines of the Directive 2010/63/UE of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purpose. Animals were randomly assigned to control or treated groups.

**Slice preparation**

Rats were deeply anaesthetized with urethane (1.5g/kg i.p.). The whole brain, including the upper cervical region of spinal cord, was carefully removed and placed into an icecold (4°C) solution containing (in mM): 205 sucrose, 3.5 KCl, 7.0 MgCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11 D-glucose, and 0.5 CaCl<sub>2</sub>, (pH 7.4) bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. The dura mater was removed and serial transverse slices (350 µm) were cut from the brain stem using a vibroslice (VT1200 S, Leica Microsystèmes SAS, Nanterre, France). Transverse slices containing the Sp5C were cut from the region between the spinal cord at cervical level and the Sp5I. Slices were incubated at 30°C in an artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM): 130 NaCl, 3 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgSO<sub>4</sub>, 0.6 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 10 glucose (pH 7.4), bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>, for a 45 min recovery period.

**Patch-clamp recordings**

Slices were transferred to a recording chamber (volume  $\approx 1$  ml) and held down with a platinum wire formed into a C-shape that supported transverse nylon fibres. The chamber was mounted on an upright microscope fitted with fluorescence optics (Axioskop 2, Carl Zeiss SAS, Le Pecq, France) and linked to a Hamamatsu digital camera ORCA-ER. Slices were continuously perfused at 3.0 ml/min with the aCSF solution maintained at room temperature ( $\approx 25^\circ\text{C}$ ). The lamina II has a distinct translucent appearance and can be easily distinguished under the microscope using a X10 objective lens. Because there is no clear demarcation between lamina IIo and IIi, we arbitrarily divided the lamina II in the spinal cord into two equal divisions from the dorsal to ventral boundaries. Recordings were made from neurons in the substantia gelatinosa of Sp5C, lying about 50  $\mu\text{m}$  from the trigeminal spinal tract. Then, neurons in lamina IIi were focused and visualized using a X60 water-immersion objective lens with combined infrared and differential interference.

Patch pipettes were pulled from borosilicate glass tubing (Sutter Instrument, Novato, CA, USA) and filled with an internal solution containing (in mM): 135 K-gluconate, 4 NaCl, 2  $\text{MgCl}_2$ , 10 HEPES, 0.2 EGTA, 2.5 ATP- $\text{Na}_2$ , 0.5 GTP- $\text{Na}_2$ , neurobiotin (0.05%) (292 mOsm), pH adjusted to 7.35. Pipette resistances ranged from 5–7  $\text{M}\Omega$ .

Recordings were performed using patch-clamp technique in whole-cell configuration and both voltage and current-clamp modes were used. Signals were recorded using an EPC10 amplifier (HEKA, Lambrecht/Pfalz, Germany) and Patch Master v2x65 acquisition software. Voltage clamp data were low pass filtered at 3 kHz and digitized at 10 kHz. Liquid junction potentials were not subtracted. Series resistance was monitored throughout the experiments and was not compensated. Data were discarded if series resistance varied more than  $\pm 20$   $\text{M}\Omega$ . Only data from neurons that maintained a resting membrane potential more negative than -50mV were analysed.

Spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSC) were recorded at a holding potential of +10 mV. To determine the effect of capsaicin on sIPSC to lamina III neurons, 1  $\mu$ M capsaïcine (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was bath applied into the slice for 5 minutes after recording sIPSC for 5 minutes as control. Recording was made for another 30 minutes to determine long-term effect of capsaïcine on sIPSC.

### **Neuron morphology**

At the end of the recording section, slices were transferred to 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate-buffered solution, pH 7.4, before storage overnight at 4°C. Slices were washed with 0.05 M Tris-buffered saline (TBS) and incubated 4 h at room temperature with Avidin DCS-rhodamine (1:400, Vector Laboratories, Les Ulis, France). After washing the slices 4 x 5 min with TBS, they were placed in 5% normal goat serum (NGS) diluted in TBS containing 0.25% bovine serum albumin (BSA) and 0.3 % Triton X-100 (TBS-BSA-T) for 2 h before incubation in a monoclonal mouse primary antibody directed against PKC $\gamma$  (1:4000, Sigma-Aldrich) diluted in TBS-BSA-T overnight at 4°C. After 4 washes with TBS for 5 min, slices were incubated with a Cy2 conjugated goat anti-mouse secondary antibody (1:200, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA) diluted in TBS-BSA-T for 2 h at room temperature. After 4 washes in TBS, slices were transferred onto gelatinized slides before being coverslipped with DPX mountant for histology. Slices were analyzed with a Zeiss LSM 510 confocal laser scanning microscope by using 488- and 543-nm excitation laser light. In order to suppress emission cross-talk, the microscope was configured to perform all scanning in sequential mode. Z-series were scanned at x63 magnifications with an oil immersion lens and a z-step of 0.37  $\mu$ m. The z-series were first examined with the Zeiss LSM image examiner<sup>®</sup>. Each image was then analyzed with Fiji-ImageJ 1.47 program (<http://rsbweb.nih.gov/ij> ; (Schindelin et al., 2012)). 3D-reconstruction was performed using the 3D-viewer plug-in

(Schmid et al., 2010). PKC $\gamma$  and neurobiotin immunoreactive neurons were analyzed using the simple neurite tracer plug-in (Longair et al., 2011).

### **Data analysis**

All data were analyzed offline using Clampfit 10.0 software (Axon instrument). The input resistance of the neurons was determined from the slope of the linear portion of the I-V relationship. The firing threshold was defined as the minimum voltage necessary to fire the cell. Repetitive firing properties were investigated with 800 ms long depolarizing current pulses of varying amplitudes. The amplitude of the action potential was measured from the point preceding the fast rising phase of the spike to the peak of the spike. To investigate the existence of an inward rectification current (“sag”) and a post inhibitory rebound, 800 ms hyperpolarizing current steps were applied to all the recorded neurons. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM.

# Curriculum Vitae

---

## Cédric PEIRS

Date of birth: 28/01/1985, Lille (FRANCE)

Citizenship: French

---

University Clermont1

PhD candidate

Inserm U1107 – Neuro-Dol - Trigeminal Pain and Migraine

Faculté de Chirurgie Dentaire, 63000 Clermont-Ferrand, France

Phone : +33-(0)4-7317-7316

Mobile : +33-(0)6-6558-5086

E-Mail : Cedric.peirs@gmail.com

### Current position

2012 | PhD candidate - Neurosciences - University Clermont 1

### Qualifications degree

- 2009 - 2012 | PhD in Neurosciences  
*University Clermont 1 (FRANCE) – Faculty of Dental Surgery*
- 2007 - 2009 | Master degree by Research in Cellular Biology and Physiopathology – rank 2/24  
*University Victor Segalen Bordeaux II (FRANCE) / University of Melbourne (AUSTRALIA)*

### Grants

- 2009 - 2012 | Doctoral grant delivered by the Department of National Education, Research and Technology (MENRT) – FRANCE
- 2012 | Grant for international congress (FENS) delivered by the council of Auvergne - FRANCE
- 2011 | International visitor fellowship delivered by Auvergne University - FRANCE
- 2008 - 2009 | International visitor fellowship delivered by Howard Florey Institute - AUSTRALIA

### Work Experience

- 2009 - 2012 | PhD in Neurosciences. INSERM U929 – Faculty of Dental Surgery (Clermont-Ferrand, FRANCE) | Neurobiology of the trigeminal pain | Team DALLEL, Supervisor Pr Radhouane DALLEL. *Topic: PKCy Interneurons and trigeminal mechanical allodynia*
- 2009 | Master degree. NEUROPEPTIDES GROUP – Howard Florey Institute (Melbourne, AUSTRALIA) | Relaxin Team | Team GUNDLACH, Supervisor Pr/A Andrew GUNDLACH. *Topic: The RLX3/RXFP3 system in the lateral hypothalamic area (LHA) and its influence for the circadian food anticipatory activity (FAA) in rats*

- 2008 | Master degree. INSERM U916 - Bergonié Institute (Bordeaux, FRANCE)| Validation and Identification of new targets in oncology | Team ICHAS, Supervisor Dr Francesca ICHAS-DE GIORGI. *Topic: Anticancer effect of Aplidine<sup>TM</sup> by JNKs pathway in sarcoma*
- 2007 | Optional training course in degree. INSERM U862 - François Magendie Institute (Bordeaux, FRANCE)| Physiopathologies des réseaux médullaires | Team NAGY, Supervisor Pr Marc LANDRY. *Topic: Post-transcriptional regulation of 14-3-3 $\zeta$  protein by micro-RNAs in neuropathic pain*
- 2006 | Voluntary training course. INSERM E358 - François Magendie Institute (Bordeaux, FRANCE)| Physiopathologies des réseaux médullaires | Team NAGY, Supervisor Dr Alexandre FAVEREAUX. *Topic: Role of Galanin receptor in nociceptive transmission of pain in spinal cord dorsal horn.*

#### Teaching Experience

- 2010 - 2012 | Associate teacher in Physiology – University Institute of Technology – Clermont-Ferrand, FRANCE
- 2007 - 2008 | Associate teacher in Biology - High school Georges Leygue – Villeneuve-sur-lot, FRANCE

#### Student supervision

- Master | Nathalie BOURGOIS. *Topic: Role of ROS in trigeminal mechanical allodynia*
- Master | Candice DELBET. *Topic: Study of GABAergic dysfunctions during mechanical allodynia*
- Honors | Kim LE KAN. *Topic: Role of ROS in trigeminal mechanical allodynia*

#### Other Experiences

- 2009 - 2012 | Elected Student in scientific committee of the doctoral school for Life Sciences, Health, Agronomics, Environment - Clermont-Ferrand - FRANCE
- 2007 - 2009 | Elected Student in central committee of the University Bordeaux II (Committee of Studies and of University life) - FRANCE
- 2007 - 2008 | Vice President of AEBBCB (Association of Students in Biochemistry and Cellular Biology of Bordeaux) – FRANCE

#### Skills

- Electrophysiology: Patch-clamp recording in whole cell and loose patch, analysis of single cell morphology by biocytin tracing
- Imaging: Analysis of single, double and triple immunohistochemistry by photonic, confocal and electron microscopy
- Cellular Biology: Cell culture of human and murine cell lines, vectorial cloning by transfection and transduction, immunohistochemistry
- Molecular Biology: Analysis of genomic expression by polymerase chain reaction (PCR), quantitative analysis of transcriptional expression of mRNA and microRNA by quantitative PCR (qPCR), semi-quantitative analysis of protein expression in cellular culture and tissue by Western blot using chemiluminescence and photofluorescence, genomic sequencing by Sanger method, vectorial recombination



- Surgery: French degree in animal experimentation Level 1, cannulation and cerebral microinjection
- Behavior: Analysis of pain hypersensitivity, food intake and locomotor activity in rats
- Informatics PC: Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint) and scientific software (PatchMaster, Fusion, Bio-1D, Etho Vision, LSM Image, ImageJ, Fiji, Photoshop, Corel Draw, Prism, Endnote, Reference manager)
- Others: French, English, Spanish, French driver licenses A, A1 and B

#### Publications:

- Miraucourt LS, **Peirs C**, Dallel R, Voisin DL: Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through astrocyte-derived D-serine. *Pain*. 2011 Jun;152(6):1340-8.
- **Peirs C**, Patil S, Artola A, Landry M, Dallel R: Protein kinase C gamma neurons in the rat medullary dorsal horn: distribution and synaptic inputs of these neurons, and subcellular localization of the enzyme. *Submitted*.
- **Peirs C**, Bourgois N, Artola A, Dallel R: Capsaicine induces secondary static mechanical allodynia through ROS production, GABAergic disinhibition and PKC $\gamma$  activation in the rat medullary substantia gelatinosa. *In preparation*.

#### Communications:

- **Peirs C**, Bourgois N, Artola A, Dallel R: How can touch turn into pain: PKC $\gamma$  neurons. Doctoral school symposium. Clermont-Ferrand (FRANCE), May 2012.
- **Peirs C**, Bourgois N, Artola A, Dallel R: Segmental mechanisms of trigeminal mechanical allodynia: the role of Reactive Oxygen Species (ROS). 8th Annual Symposium of the INSERM research network on Pain. Clermont-Ferrand (FRANCE), March 2012.
- **Peirs C**, Bourgois N, Artola A, Dallel R: Between touch and pain: PKC $\gamma$  interneurons. 7<sup>th</sup> Research Day. Clermont-Ferrand (FRANCE), December 2011.
- **Peirs C**, Ma S, Gundlach AL: Does the RLX3/RXFP3 system in the lateral hypothalamic area (LHA) influence circadian food anticipatory activity (FAA) in rats? Relaxin symposium. Melbourne (AUSTRALIA), May 2009.

#### Posters:

- **Peirs C**, Patil S, Landry M, Artola A, Dallel R: Organization and anatomical properties of Protein Kinase C gamma interneurons in the medullary dorsal horn. 8th FENS Forum of Neuroscience. Barcelona (SPAIN), July 2012.
- **Peirs C**, Descheemaeker A, Artola A, Dallel R: How can touch become pain: the short-circuit PKC $\gamma$ . Doctoriales 2011. Saint-Nectaire (FRANCE), June 2011.
- **Peirs C**, Pham-Dang N, Artola A, Dallel R: Activation of protein kinase C in the medullary dorsal horn produces mechanical hypersensitivity through superficial laminae nociceptive-specific NK1 receptor-negative neurons. 10e Colloque of the French Neuroscience Society. Marseille (FRANCE), May 2011.

ANNEXE 3

Le résultats présentés au chapitre 3 ont été soumis le 09 octobre 2012 dans le but d'une publication dans le journal *Journal of Comparative Neurology*. Le manuscrit a été jugé par deux rapporteurs. Une révision du manuscrit a été demandée le 05 Novembre 2012. La date limite de resoumission a été portée au 04 Mai 2013.

**Manuscripts I Have Co-Authored**

Manuscript ID	Manuscript Title	Date Created	Date Submitted	Status
JCN-12-0290	Protein kinase C gamma neurons in the rat medullary dorsal horn: distribution and synaptic inputs of these neurons, and subcellular localization of the enzyme [ <a href="#">View Submission</a> ]	09-Oct-2012	09-Oct-2012	JA: <a href="#">Gordon, Adam</a> ▪ Conditional Reject (RER) (05-Nov-2012) ▪ <a href="#">Due on: 04-May-2013</a>

05-Nov-2012

Dear Prof. Dallel:

Your manuscript,

JCN-12-0290 "Protein kinase C gamma neurons in the rat medullary dorsal horn: distribution and synaptic inputs of these neurons, and subcellular localization of the enzyme"

has now been reviewed by our scientific referees and the comments are enclosed.

Your paper has been reviewed by two reviewers, who raised several issues regarding your study and as such we are not able to accept your study in its current form. The first reviewer is rather critical, especially in respect to your quantitative EM results and insufficient figure resolution (Fig. 4). Also, the specificity controls, as pointed out by the reviewer, are insufficient, because you cannot cite the work of others to verify the specificity of your own antibodies. You will have to comply with the requirements of JCN in the way you report antibodies and we encourage you to refer to our policy and antibody table attached.

You will also have to follow our guidelines for figure preparation more closely. Each panel needs to be identified by an alphabetical label that has to be placed on the panel directly, so as to minimize the amount "white space" in a plate to the profit of the microphotographs themselves.

Note that your last figure misspells "perikaryon" as "perikarion". Please check whether this appears elsewhere in your figures or text.

If you think you can meet the criticisms of the reviewers, you may resubmit, but your new submission will need a positive rereview of both reviewers, as well as of the associate editor. Please note that lack of such a positive rereview will lead to your paper not being published in JCN.

If you choose to revise this work extensively and resubmit it, the manuscript will be sent to two referees. If you do resubmit, please follow the instructions for resubmission in Journal of Comparative Neurology Guide for Authors.

Also, for the convenience of the reviewer and editors, may we ask that you use the Track Changes function in Word, or a similar word-processing function, to highlight the changes you make in your revised resubmission. In addition, please upload a clean copy of your revised text, in which the change tracking feature is turned off, as some reviewers prefer using that for their evaluation.

If you resubmit this paper, please be sure to upload the next draft of your manuscript as A REVISION by clicking on "Manuscripts with Decisions" in your Author Center on our Manuscript Central website. Then, in the lower right corner of the screen, click on "Create a Revision" next to the information for JCN-12-0290. Then, please proceed through the screens that are provided, replacing existing files with revised ones, as necessary.

Thank you for your submission to Journal of Comparative Neurology.

Sincerely,

Prof. Gert Holstege  
Associate Editor, Journal of Comparative Neurology

Dr. Patrick Hof  
Editor-in-Chief, Journal of Comparative Neurology

You can upload your revised manuscript and submit it through your Author Center. Log into <http://mc.manuscriptcentral.com/jcn> and enter your Author Center, where you will find your manuscript title listed under "Manuscripts with Decisions."

When submitting your revised manuscript, you will be able to respond to the comments made by the referee(s) in the space provided. You can use this space to document any changes you make to the original manuscript. JCN policy requires all resubmissions to be returned within three months.

IMPORTANT: We have your original files. When submitting (uploading) your revised manuscript, please delete the file(s) that you wish to replace and

then upload the revised file(s). Please note that submitting a revision of your manuscript does not guarantee eventual acceptance.

Reviewer: 1

Comments for the Authors

By use of light- and electron microscopic immunocytochemistry, this study set out to unravel the cellular and subcellular localization of PKC $\gamma$  in rat medullary dorsal horn. The LM analysis is sound and shows that PKC $\gamma$  is found in about 1/3 of the neurons in lamina III. The EM analysis, on the other hand, has clear shortcomings that detract from the overall impact of this investigation. Some specific comments:

1. A main problem is the qualitative nature of the EM analysis. Thus, several of the major conclusions lack adequate support by quantitative data. That the majority of synapses on PKC $\gamma$  positive neurons are asymmetric and that these neurons receive myelinated primary afferents - but no unmyelinated or VGLUT3 immunoreactive ones - are conclusions that need to be justified by carrying out a more detailed quantitative analysis than the one in hand. In the analysis referred to on p. 14, a total of 35 synaptic appositions were included. This low n is insufficient. Also, the sampling strategy is not described.
2. Some of the electron micrographs (Fig. 4F & G, in particular) lack sufficient resolution.
3. The criteria for assigning gold particles to the plasma membrane (p. 16) are not adequately described. The term "perisynaptic space" (used on p. 16 and elsewhere) is unorthodox and should be replaced by a more appropriate term.
4. Fig. 6 is difficult to interpret. It looks as if the term "perikarion" (I assume this should read "perikaryon") is used as a synonym for nucleus (legend: "perikarion or presumable nucleus"). This is incorrect.
5. The list of references is incomplete. In particular, earlier immunogold analyses of PKC $\gamma$  are highly relevant and should be cited. The paper of Oyasu et al. ( J Histochem Cytochem. 2008 Mar;56(3):253-65) and Cardell et al. (Neuroscience. 1998 Feb;82(3):709-25) are among these.
6. The comparison with Purkinje cells is not well justified. Also, the discussion of previous literature is misleading, in the absence of reference to relevant literature (Cardell et al; see # 5 above).
7. The final conclusion in the Abstract ("These results confirm...") suggests that functional analyses were performed. Rephrasing is required.
8. Specificity controls are inadequate and do not conform to the requirements of the Journal. It is not sufficient to refer to control experiments performed by others: specificity controls must be an integrated part of the study.
9. The section on Data and statistical analysis (p. 12) is difficult to grasp and must be rewritten for clarity. The equations must be explained. What is "ultrastructural repartition" of total fluorescence?

Reviewer: 2

Comments for the Authors

This is a well presented and clearly written manuscript, aiming at characterizing synaptic inputs onto one specific population of spinal interneurons, namely the cells expressing PKC $\gamma$ , located in lamina III, and implicated in mechanical allodynia.

Overall the work is convincing and the conclusions are supported by the data, especially from immunoelectron microscopy. However, even though the authors have been very thorough in their work, the presentation and quantification of the data appears somewhat minimalistic, notably all data included in figure 4. This figure contains 3 sets of key results: distribution on symmetric/asymmetric synapses onto PKC $\gamma$ -positive cells; absence of unmyelinated terminals and absence of VGLUT3-positive terminals, presence of both GABAAR (beta2,3 subunit) and GlyR (a1 subunit). As a reader, I would feel more comfortable if these important data and their illustrations were more detailed and extensive, and supported by some form of quantification.

**ANNEXE 4**

Au cours de mon travail de thèse, j'ai eu l'occasion de participer aux travaux des Pr Radhouane Dallel et Pr Daniel Voisin pour compléter des expériences sur un modèle de douleur induite par désinhibition glycinergique segmentaire afin de démontrer l'implication des astrocytes dans l'allodynie mécanique dynamique chez le rat. Les résultats sont présentés dans un article publié dans *Pain*.



## Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through astrocyte-derived D-serine

Loïse S. Miraucourt<sup>a,b,c,d</sup>, Cédric Peirs<sup>a,b</sup>, Radhouane Dallel<sup>a,b,\*</sup>, Daniel L. Voisin<sup>a,b,c,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Clermont Université, Université d'Auvergne, Neurobiologie de la douleur trigéminal, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>b</sup> Inserm, U929, F-63000 Clermont-Ferrand, CHU Clermont-Ferrand, Service d'Odontologie, F-63003 Clermont-Ferrand, France

<sup>c</sup> Inserm, U862, Neurocentre Magendie, F-33077 Bordeaux, France

<sup>d</sup> Université de Bordeaux, F-33077 Bordeaux, France

Sponsorships or completing interests that may be relevant to content are disclosed at the end of this article.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 August 2010

Received in revised form 13 January 2011

Accepted 7 February 2011

#### Keywords:

Allodynia  
Disinhibition  
Glycine  
Astrocyte  
D-Serine  
Pain

### ABSTRACT

Glycine inhibitory dysfunction provides a useful experimental model for studying the mechanism of dynamic mechanical allodynia, a widespread and intractable symptom of neuropathic pain. In this model, allodynia expression relies on *N*-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs), and it has been shown that astrocytes can regulate their activation through the release of the NMDAR coagonist D-serine. Recent studies also suggest that astrocytes potentially contribute to neuropathic pain. However, the involvement of astrocytes in dynamic mechanical allodynia remains unknown. Here, we show that after blockade of glycine inhibition, orofacial tactile stimuli activated medullary dorsal horn (MDH) astrocytes, but not microglia. Accordingly, the glia inhibitor fluorocitrate, but not the microglia inhibitor minocycline, prevented allodynia. Fluorocitrate also impeded activation of astrocytes and blocked activation of the superficial MDH neural circuit underlying allodynia, as revealed by study of Fos expression. MDH astrocytes are thus required for allodynia. They may also produce D-serine because astrocytic processes were selectively immunolabeled for serine racemase, the D-serine synthesizing enzyme. Accordingly, selective degradation of D-serine with D-amino acid oxidase applied *in vivo* prevented allodynia and activation of the underlying neural circuit. Conversely, allodynia blockade by fluorocitrate was reversed by exogenous D-serine. These results suggest the following scenario: removal of glycine inhibition makes tactile stimuli able to activate astrocytes; activated astrocytes may provide D-serine to enable NMDAR activation and thus allodynia. Such a contribution of astrocytes to pathological pain fuels the emerging concept that astrocytes are critical players in pain signaling.

© 2011 International Association for the Study of Pain. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Dynamic mechanical allodynia is a widespread and intractable symptom of neuropathic pain for which there is a lack of effective therapy [9]. We recently provided a novel perspective on the mechanisms of this symptom by showing that a simple switch in trigeminal glycine synaptic inhibition can turn touch into pain by unmasking innocuous input to superficial dorsal horn nociceptive-specific neurons [31,32]. The transfer of input is mediated through a local excitatory neural circuit [31]. We also showed that the selectivity and morphine resistance of the removal of glycine inhibition paradigm adequately reflect the clinical characteristics

of dynamic mechanical allodynia [32]. Furthermore, we and others have shown that in this model, allodynia expression relies on *N*-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs; [31,39,54,66]). Over the last few years, accumulating evidence has proven that astrocytes can regulate NMDAR activation through Ca<sup>2+</sup>-dependent release of the amino acid D-serine [16,36]. It is now obvious that D-serine is a gliotransmitter that serves as an endogenous ligand of NMDAR [35,48]. Indeed, activation of NMDARs requires binding of glutamate at their glutamate-binding site, but also of a coagonist, such as D-serine, at their strychnine-insensitive glycine-binding site. As such, glia derived D-serine can control NMDAR activity and synaptic memory [16,40,67]. It could thus contribute to NMDAR-dependent pain mechanisms [1,68].

Recent studies also suggest that astrocytes potentially contribute to chronic pain [47,49]. In response to trauma to, or inflammation of, peripheral nerves resulting in neuropathic pain, spinal cord astrocytes are activated. This is reflected by increased expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) by astrocytes

\* Corresponding authors. Address: Inserm, U929, Neurobiologie de la douleur trigéminal, Faculté de Chirurgie Dentaire, 11 boulevard Charles de Gaulle, 63000 Clermont-Ferrand, France. Tel.: +33 5 57 57 37 35; fax: +33 5 57 57 37 50.

E-mail addresses: radhouane.dallel@u-clermont1.fr (R. Dallel), daniel.voisin@inserm.fr (D.L. Voisin).



[14]. Astrocyte activation correlates with behavioral hyperalgesia [8], and conversely, astrocyte inhibition attenuates pain hypersensitivity [38]. However, the exact relation of astrocyte activation with individual symptoms in these models is unknown. Further work is thus needed to increase our knowledge of pain-generating mechanisms and their translation into symptoms, with the hope to design optimal treatments [4,6]. Upon activation, astrocytes can release a variety of chemical mediators and gliotransmitters such as ATP, glutamate, or D-serine [3,27,64]. This, as well as other changes in astrocyte properties [47], may contribute to pain mechanisms. However, the involvement of astrocytes and gliotransmitters in dynamic mechanical allodynia remains unknown. Here, we investigated the role of medullary dorsal horn (MDH) astrocytes and of D-serine in the orofacial dynamic mechanical allodynia induced by removal of glycine inhibition. We first asked whether dorsal horn astrocytes and microglia are activated after glycine disinhibition. Second, we tested the effect of glial inhibition upon dynamic mechanical allodynia. Our first results allowed to conclude that MDH astrocytes are required for allodynia. We also found that they selectively express D-serine racemase, the synthesizing enzyme for D-serine. We thus further explored the possible role of D-serine in dynamic mechanical allodynia using an enzyme that degrades D-serine selectively. We found that D-serine is critical for dynamic mechanical allodynia expression.

## 2. Methods

### 2.1. Animals

Adult male Sprague–Dawley rats (180–280 g) were obtained from Charles River (L'Arbresle, France) or Janvier (Le Genest-St-Isle, France) and maintained in a controlled environment (lights on 08:00–20:00, 22 °C) with food and water freely available. They were housed 3–4 per cage. All efforts were made to minimize the number of animals used. The experiments followed the ethical guidelines of the International Association for the Study of Pain and the European Community Council directive of November 24, 1986 (86/609/EEC). Experimental procedures were approved by the local institutional animal care and use committee (UFR d'Odontologie, Université d'Auvergne-Clermont).

### 2.2. Experiments

The following experiments were performed: (1) Morphological measurements of astrocyte and microglia activation by innocuous stimuli after removal of glycine inhibition; (2) effect of inhibition of the MDH neuronal network involved in dynamic mechanical allodynia after removal of glycine inhibition upon astrocyte activation; (3) effect of astrocyte inactivation by fluorocitrate upon pain behaviors induced after removal of glycine inhibition; (4) effect of astrocyte inactivation by fluorocitrate upon Fos expression induced after removal of glycine inhibition; (5) effect of astrocyte inactivation by fluorocitrate upon morphological response of astrocytes induced after removal of glycine inhibition; (6) effect of microglia inactivation by minocycline upon pain behaviors induced after removal of glycine inhibition; (7) effect of microglia inactivation by minocycline upon pain behaviors during the orofacial formalin test; (8) immunocytochemical localization of serine racemase in astrocytes; (9) effects of selective degradation of D-serine on pain behaviors induced after removal of glycine inhibition; (10) effects of selective degradation of D-serine on Fos expression induced after removal of glycine inhibition; (11) effects of D-serine following fluorocitrate on pain behaviors induced after removal of glycine inhibition; and (12) behavioral effects of D-serine alone.

### 2.3. Chemicals, drugs, antibodies

Unless specifically stated, all chemicals were obtained from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). Artificial cerebrospinal fluid (aCSF) consisted of: 150 mM Na<sup>+</sup>, 3 mM K<sup>+</sup>, 0.8 mM Mg<sup>2+</sup>, 1.4 mM Ca<sup>2+</sup>, 155 mM Cl<sup>-</sup>, pH 7.4, 295 mosmol kg<sup>-1</sup>. Strychnine, an effective antagonist at the inhibitory glycine receptor, was injected intracisternally (40 µg in 5 µL aCSF for morphological experiments, 10 µg in 5 µL aCSF for behavioral experiments). To inhibit activation of the MDH network involved in dynamic mechanical allodynia after removal of glycine inhibition [31], we used the selective protein kinase C gamma (PKCγ) inhibitor KIG31-1 that was obtained from Kai Pharmaceuticals (San Francisco, CA). It is conjugated to Tat, a peptide carrier, via a cysteine-cysteine bond at its N terminus. KIG31-1 competes with activated PKCγ for binding to the isoenzyme-specific docking proteins, receptors for activated C kinase. This strategy prevents PKCγ translocation in an isoenzyme-specific manner [12,34]. Linking of KIG31-1 to Tat enables efficient transfer of the peptide into cells [7]. KIG31-1 (500 pmol in 5 µL aCSF) or vehicle alone (Tat carrier peptide in 5 µL aCSF) were injected intracisternally. Fluorocitrate (DL-fluorocitric acid barium salt), an inhibitor of glia metabolism [13,15,18] (2 nmol in 5 µL aCSF with 0.1% dimethyl sulfoxide [DMSO]), minocycline (minocycline hydrochloride), a selective metabolic inhibitor of microglia [49,57] (100 µg in 5 µL aCSF with 0.1% DMSO), or vehicle alone (5 µL aCSF 0.1% with DMSO) were injected intracisternally. For experiments investigating the effect of selective D-serine degradation, we used D-amino acid oxidase (DAAO), an enzyme that selectively induces degradation of D-serine [26]. DAAO (0.17 U in 5 µL aCSF with flavin adenine dinucleotide, the coenzyme for DAAO-FAD) or vehicle alone (5 µL aCSF with FAD) were injected intracisternally.

Rabbit polyclonal anti-GFAP primary antibody was obtained from Dako (Trappes, France), mouse anti-GFAP primary antibody from Sigma, mouse monoclonal primary antibody OX-42 directed against CD11b/c from Cedarlane (Burlington, Canada), rabbit polyclonal anti-Fos primary antibody from Oncogene Science (San Diego, CA), and rabbit primary antibody directed against serine racemase from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Secondary antibodies were goat anti-rabbit IgG conjugated to Cy2 or to Cy3, goat anti-mouse IgG conjugated to Cy2, biotinylated goat anti-rabbit IgG, all from Jackson ImmunoResearch (Newmarket, UK).

### 2.4. Anesthesia, intracisternal injections

For morphological experiments, rats were anesthetized deeply with urethane (1.5 g/kg i.p.) as previously described [60]. Twenty minutes after the injection, the depth of the anesthesia was tested before the first intracisternal injection was performed. For behavioral experiments, the intracisternal injections were performed while the animals were briefly (<3 min) anesthetized by using a mask with 2% halothane. In all cases, intracisternal injections were carried out with a 10-µL Hamilton syringe.

### 2.5. Morphological experiments

#### 2.5.1. Innocuous stimuli

Innocuous stimuli of the right upper lip were applied with a soft paintbrush at 0.5 stroke/s for 2 min (glia activation) or 10 min (Fos expression).

#### 2.5.2. Timing

In experiment 1, 8 rats that received strychnine and 8 rats that receive vehicle alone were stimulated 5 min after and killed either 3 or 40 min after the end of stimulus application. Eight other rats that received strychnine and 8 other rats that receive vehicle alone



were not stimulated and were killed either 10 or 47 min after intracisternal injection. In experiment 2, KIG31-1 ( $n = 4$ ) or appropriate vehicle ( $n = 4$ ) was injected 30 min before strychnine. Rats were stimulated and killed 3 min later, as in experiment 1. In experiment 4, fluorocitrate ( $n = 4$ ) or appropriate vehicle ( $n = 4$ ) was injected 60 min before strychnine. Rats were stimulated and killed 120 min after the end of stimulus application. In experiment 5, fluorocitrate ( $n = 4$ ) or appropriate vehicle ( $n = 4$ ) was injected 60 min before strychnine. Rats were stimulated and killed 3 min later, as in experiment 1. In experiment 8, rats ( $n = 3$ ) were not stimulated and not injected intracisternally before being killed. In experiment 10, DAAO or appropriate vehicle was injected 15 min before strychnine. Rats were stimulated and killed 120 min after the end of stimulus application.

### 2.5.3. Immunocytochemistry

In all cases, rats were killed at appropriate time under deep anesthesia and perfused transcardially with warm (37 °C) heparinized saline (25 IU heparin/mL) followed by cold (10 °C) phosphate-buffered solution (0.1 M, pH 7.6) containing 4% paraformaldehyde and 0.03% picric acid for 15 min. The brainstem was then removed and transferred into phosphate-buffered solution containing 30% sucrose at 4 °C and left overnight. Coronal sections (30  $\mu$ m) were cut on a freezing microtome and collected in a 0.05 M Tris-buffered saline (TBS) before being processed. In experiments 1, 2, and 5 (glia activation), free-floating brainstem sections were placed in 2% normal goat serum for 1 h before incubation at room temperature in a rabbit primary antibody directed against GFAP (1:2,000, 24 h). In experiment 1, an additional set of sections were placed in a mouse monoclonal primary antibody OX-42 directed against CD11b/c (1:2,000, 24 h). According to the case, immunoreactivity was revealed by using Cy2 conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse (1:200) secondary antibody (30 min at room temperature). In experiments 4 and 10 (Fos expression), free-floating brainstem sections were placed in 2% normal goat serum for 1 h before incubation at 4 °C in a rabbit antibody directed against Fos (1:1,000, 48 h), and a secondary biotinylated goat antirabbit antibody (1:400, 2 h). Immunoreactivity for Fos was visualized with nickel-DAB. In experiment 8, free-floating brainstem sections were placed in 2% normal goat serum for 1 h, before incubation at room temperature in a mixture of mouse primary antibody directed against GFAP (1:2,000, 24 h) and rabbit primary antibody directed against serine racemase (1:200, 24 h). Immunoreactivity was revealed by using a mixture of Cy2 conjugated goat anti-mouse (1:200) and Cy3-conjugated goat anti-rabbit (1:400) secondary antibodies (30 min at room temperature). In all cases, sections were rinsed in TBS several times, between and after each incubation. Finally, sections were transferred onto gelatinized slides before being coverslipped with DPX mountant for histology. All immunolabels were diluted in TBS containing 0.25% bovine serum albumin and 0.3% Triton X-100. Specificity controls consisted of the omission of the primary antibody and incubation of sections in inappropriate secondary antibodies. In all these control experiments, no specific staining was evident. A few selected sections were mounted separately and slightly counterstained with cresyl violet to help delineate the limits of the MDH.

### 2.5.4. Fos expression analysis

Computer-assisted bright-field images of representative labeling were obtained by a CCD color video camera (Sony DXC-950P) connected to a Nikon Optiphot-2 microscope. Images were exported to Adobe PhotoShop (CS2) to adjust brightness and contrast before adjusting the image scale. Fos immunoreactive nuclei were counted in each rat according to their location in the different laminae of the MDH from 5 different sections, each taken at a given rostrocaudal plane within the MDH between  $-360$  and

$-1800$   $\mu$ m from the MDH-trigeminal interpolaris nucleus junction [55]. Intervals of 360  $\mu$ m between planes ensured that cells were counted only once. Counts were performed by an experimenter who was blinded to the experimental group. The delineation of the MDH was based upon the Paxinos and Watson atlas [41] and our own myeloarchitectural atlas. Counts were expressed in functionally related laminae as determined by our previous work [31]. The data is expressed as the sum of the total number of labeled cells counted from all 5 sections that were analyzed in each animal.

### 2.5.5. Glia activation analysis

GFAP and OX-42 immunofluorescence was analyzed with a Leica DMR microscope coupled with a CCD Coolsnap HQ camera with a FITC filter set. Image processing and morphometric analysis were performed with the Metamorph 7.0 program. The procedure consisted of 3 steps: (1) acquisition of images with a 20 $\times$  objective; (2) 2-D deconvolution and thresholding; and (3) morphometric calculations in delineated laminae. Thresholding of images was made to obtain positive vs negative pixel in a 0–4095 grayscale. A threshold that did not affect either the complexity or the integrity of the cell was selected and light positive objects were then considered for their shape in 2 dimensions and extracted from the rest of the image. Morphometric measurements were automated on Metamorph software after delineation and discrimination of MDH laminae. Measurements were performed by an experimenter who was blind to the experimental group. Mean relative values of total area superficialities of immunofluorescence for the delineated areas were calculated from the sum of total area superficialities measured from 5 different sections in each rat. Each section was taken at a given rostrocaudal plane within the MDH at intervals of 360  $\mu$ m. Values were expressed in percentage in functionally related laminae as determined by our previous work [31]. The percentage value thus represents the proportion of the surface that is GFAP immunopositive.

### 2.6. Behavioral testing

To investigate the effects of fluorocitrate and minocycline on dynamic mechanical allodynia [31], animals received an intracisternal injection of either fluorocitrate ( $n = 5$ ), vehicle alone ( $n = 8$ ), or minocycline ( $n = 5$ ). Half an hour after recovery (<2 min), rats were placed in an observation field (0.6  $\times$  0.6 m square) under red light for a 30-min habituation session. During this period, rats were adapted to the observation field and red light. The experimenter also reached into the cage to apply gentle air puffing on the face of the animal, to which animals responded with only a simple detection, showing a nonaversive response rated at  $1 \pm 0.1$  (see below). Immediately after the 30-min habituation period, animals received an intracisternal injection of either aCSF ( $n = 3$ ) or strychnine ( $n = 15$ ). After recovery (<2 min), rats were placed in the observation field under red light for a 30-min period test. Gentle air puffing (1-s duration) was applied every 3 min onto the orofacial region by using a calibrated pump by a first experimenter. Stimulation was carried out when the rat was in a sniffing, no-locomotion state: with 4 paws placed on the ground, neither moving nor freezing. The distance to the target from which the stimulus was applied varied from 2 to 5 cm. The tip of the pump was moved toward the target from behind the animal so that it could not see it. Each series of stimulation consisted of 5 air puffs applied every 10 s.

For experiments investigating the effect of selective D-serine degradation, rats underwent the habituation session first and immediately after received an intracisternal administration of DAAO ( $n = 5$ ) or vehicle alone ( $n = 5$ ). They were then left in individual cages under red light in a quiet room for 15 min. At this time, they received an intracisternal injection of strychnine. The next part of the procedure was as in the groups above.



To investigate the effect of D-serine in conditions of astrocyte inactivation, animals received an intracisternal injection of fluorocitrate (n = 5) 1 h before they were injected with 10 µg strychnine associated with 100 µg D-serine in 5 µL aCSF. The rest of the procedure was as in the fluorocitrate group (see above). An additional control group of rats (n = 5) received an intracisternal injection of 100 µg D-serine in 5 µL aCSF only.

In all cases, the behavioral responses were observed and quantified by a second experimenter according to the method developed by Vos et al. [61]. The evaluating experimenter was blind to the experimental group. A rat response to mechanical stimulation consisted of one or more of the following elements: (1) detection, rats turn head toward stimulus; (2) withdrawal reaction, rats turn head away or pulls it briskly backward when stimulation is applied (a withdrawal reaction is assumed to include a detection element preceding the head withdrawal and therefore consists of 2 responses elements); (3) escape/attack, rats avoid further contact with the stimulus, either passively by moving their body away from the stimulus, or actively by attacking the tip of the pump or the hair; (4) asymmetric grooming, rats display an uninterrupted series of at least 3 wash strokes directed to the stimulated area. The following rank-ordered descriptive responses categories were formulated according to the study by Vos et al. [61]: no response, nonaversive response, mild aversive response, strong aversive response, prolonged aversive behavior. Each category was given a score (0–4) that was based on the number of observed response elements. According to Vos et al. [61], the score was assumed to reflect the magnitude of the aversiveness evoked by the mechanical stimulation. Score was equal to zero in case of absence of response. A mean score value was then calculated for each stimulation series.

In an additional series of experiments, we tested the effects of intracisternal minocycline on the pain behavior evoked during the orofacial formalin test [45]. Formalin (50 µL, 1.5% solution) was injected subcutaneously through a 27-gauge needle into the center of the right vibrissa pad as quickly as possible, with only minimal animal restraint. After injection, the animals were immediately placed back in the test box for a 45-min observation period. The recording time was divided into 15 blocks of 3 min, and a nociceptive score was determined for each block by measuring the number of seconds that the animals spent rubbing the injected area with the forepaw. Movements of the ipsilateral forepaw were accompanied by the movements of the contralateral forepaw. A video camera was used to record the rubbing response. Analysis of the behavior was made by an investigator, who was blinded to the animal's group assignment. One hour before the orofacial formalin test, rats received an intracisternal injection of minocycline (n = 6) or vehicle alone (n = 6) as described above.

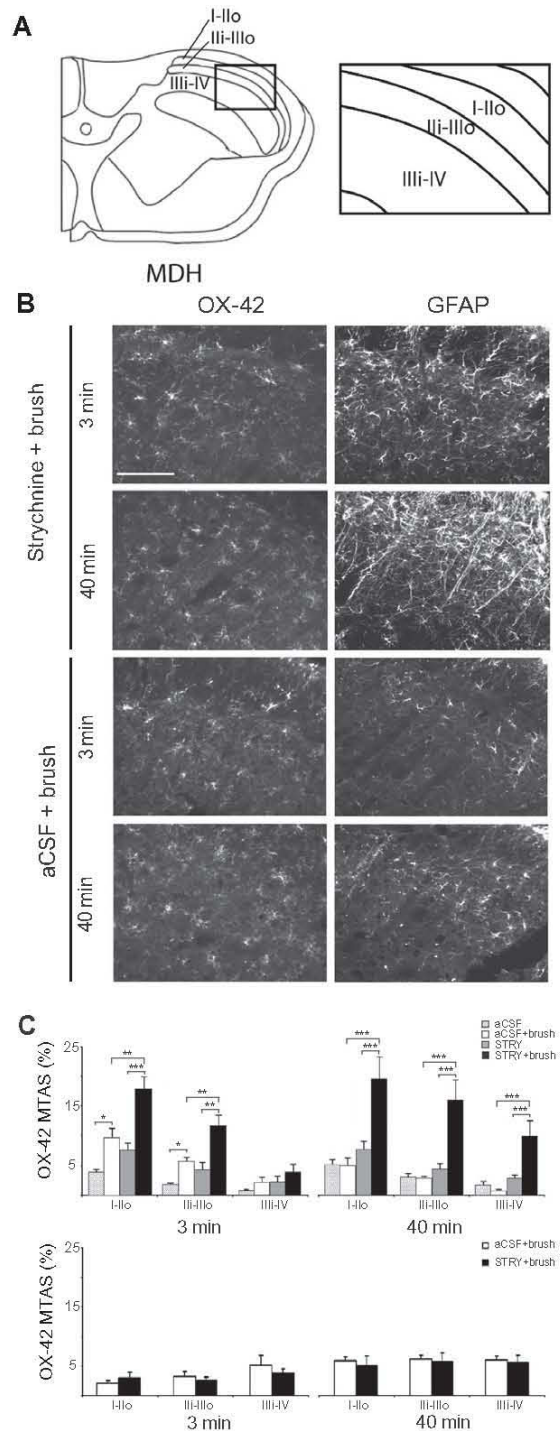
2.7. Statistical analysis

To assess potential differences between groups (immunocytochemistry and orofacial formalin test), Student *t* tests (2-tailed) were performed. Changes in GFAP labeling were analyzed by a 2-way ANOVA with post hoc comparisons using Bonferroni *t* test. Behavioral changes in response to lip brushing were analyzed with 1-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test. Differences were considered significant at *P* < .05. Results are expressed as mean ± SEM.

3. Results

3.1. After removal of glycine inhibition, tactile stimuli activate dorsal horn astrocytes, but not microglia

We used GFAP immunolabeling [53] and OX-42 [23,44] to uncover astrocyte and microglia activation, respectively, in response



**Fig. 1.** After removal of glycinergic inhibition dynamic innocuous input activates dorsal horn astrocytes, not microglia. (A) Schematic diagram of a coronal section of the MDH illustrating the approximate location at which images were taken. (B) GFAP and OX-42 immunofluorescence in the ipsilateral MDH of aCSF- and strychnine-injected anesthetized rats at 2 different times after the stimulation (light brushing of the ipsilateral lip). Bar = 150 µm. (C) Mean (±SEM) total area superificies (MTAS) of GFAP and OX-42 immunofluorescence in the different laminae of the ipsilateral MDH following or not light brushing of the lip in aCSF- and strychnine-injected rats (n = 4/group). \**P* < .05, \*\**P* < .01, \*\*\**P* < .001.

to tactile stimuli after removal of glycine inhibition. Soft brushing of upper lip after intracisternal strychnine injection resulted in fast,



strong astrocyte activation in the MDH, as shown by morphometric analysis of GFAP (Fig. 1). We conducted a 2-way analysis of variance on the mean GFAP immunofluorescence surfaces with soft brushing and strychnine as factors. There was no interaction between the 2 factors at 3 min, and a significant interaction was present at 40 min in all areas. At 3 min, GFAP immunofluorescence surfaces in the ipsilateral side of the MDH of brush-stimulated, strychnine-injected animals (n = 4) were significantly higher than in animals that received aCSF associated with brushing (n = 4) and than in rats that received strychnine but no brushing of the lip (n = 4) in the area comprising lamina I and outer II (laminae I-IIo) (Fig. 1C), as well as in the area comprising inner lamina II (Ili) and outer lamina III (IIIo). In these areas, lip brushing by itself also resulted in significant increase in GFAP immunofluorescence surfaces (Fig. 1C). In the area comprising lamina inner III (IIIi) and IV GFAP immunofluorescence, surfaces were not different between the different groups of rats. At 40 min, GFAP immunofluorescence surfaces in the ipsilateral side of the MDH of brush-stimulated, strychnine-injected animals (n = 4) were significantly higher than in animals that received aCSF associated with brushing (n = 4) and than in rats that received strychnine but no brushing of the lip (n = 4), in the areas comprising laminae I-IIo, Ili-IIIo and IIIi-IV (Fig. 1C). In contrast, after intracisternal strychnine, soft brushing of the upper lip did not result in microglia activation in the MDH, as shown by morphometric analysis of OX-42 immunofluorescence at 3 and 40 min (Fig. 1). This set of data suggests that after removal of glycine inhibition, tactile stimuli strongly activated MDH astrocytes, but not microglia.

We investigated the role of neural input in astrocyte activation after removal of glycine inhibition by using selective inhibition of protein kinase C gamma, which is known to prevent allodynia induced by removal of glycine inhibition and dorsal horn neuron activation [31]. Selective inhibition of protein kinase C gamma prevented astrocyte activation in brush-stimulated, strychnine-injected animals (Fig. 2). These results show that astrocyte activation required neural activity triggered by peripheral input.

3.2. The allodynia induced by removal of glycine inhibition requires astrocyte activation

To investigate the functional involvement of astrocyte activation in the allodynia induced by removal of glycine inhibition, we used the glia inhibitor fluorocitrate [13] and the microglia inhibitor minocycline [49,57]. As previously reported [31,32], intracisternal injection of strychnine (10 µg in 5 µL vehicle) produced a dramatic face dynamic mechanical allodynia with the highest mean score reaching 3.0 ± 0.5 (n = 5) on a scale ranging from 0 to 4 (Fig. 3A). Allodynia started immediately after the injection and lasted for

15 min. Intracisternal administration of fluorocitrate (2 nM in 5 µL vehicle, n = 5) 1 h before strychnine injection resulted in a drastic reduction in the maximal score of nociceptive responses of about 56% (Fig. 3A). Fluorocitrate also prevented astrocyte activation measured by morphometric analysis (Fig. 4). Scores in animals that received a preemptive administration of minocycline (100 µg in 5 µL vehicle, n = 5, Fig. 3A) 1 h before strychnine were not significantly different from scores in control rats that received vehicle only (Fig. 3A, n ± 5). As previously reported [45], subcutaneous injection of formalin into the vibrissa pad caused a 2-phase nociceptive rubbing response: an early, short-lasting phase 1 and a late long-lasting phase 2. In rats that received a preemptive intracisternal injection of vehicle (n = 6), duration of phase 1 (0–3 min) and phase 2 (15–33 min) rubbing were 23 ± 8 and 203 ± 27 s, respectively. Intracisternal administration of minocycline (100 µg in 5 µL vehicle, n = 6) did not affect phase 1 (20 ± 9 s) but significantly reduced phase 2 by -65 ± 8% (71 ± 15 s; P < .002). To summarize, glia inhibition with fluorocitrate, but not microglial inhibition with minocycline, almost totally prevented the strychnine-induced allodynia in freely moving rats. Fluorocitrate also impeded activation of astrocytes.

As previously reported [31,32], after intracisternal injection of strychnine (40 µg in 5 µL aCSF) in urethane-anesthetized rats, soft brushing of the upper lip (10 min, 0.5 Hz) resulted in strong ipsilateral Fos expression in the superficial laminae of the MDH (Fig. 3B), but not in the deep laminae, and not in the contralateral side. Fos expression was predominant in laminae I-IIo and in laminae IIIi-IIIo. Intracisternal administration of fluorocitrate (2 nM in 5 µL vehicle, n = 4) 1 h before strychnine injection (40 µg in 5 µL aCSF) resulted in a dramatic reduction in brush-induced Fos expression in the MDH of urethane-anesthetized rats (Fig. 3B). Compared to control animals that received preemptive intracisternal injection of vehicle alone (n = 4), Fos expression was reduced by 78% and 81% in lamina I-IIo and Ili-IIIo, respectively (P < .001). These results show that astrocyte inhibition in the dorsal horn can prevent the development of the allodynia induced by removal of glycine inhibition and activation of the underlying dorsal horn circuit as well.

3.3. The allodynia induced by removal of glycine inhibition requires D-serine

Because the allodynia induced by removal of glycine inhibition is NMDAR dependent [31], we hypothesized that the gliotransmitter D-serine, which is a coagonist of NMDAR, could be involved. To provide grounds to this hypothesis, we sought to localize D-serine synthesizing enzyme, serine racemase, by immunocytochemistry. In the superficial MDH, immunoreactivity for serine racemase

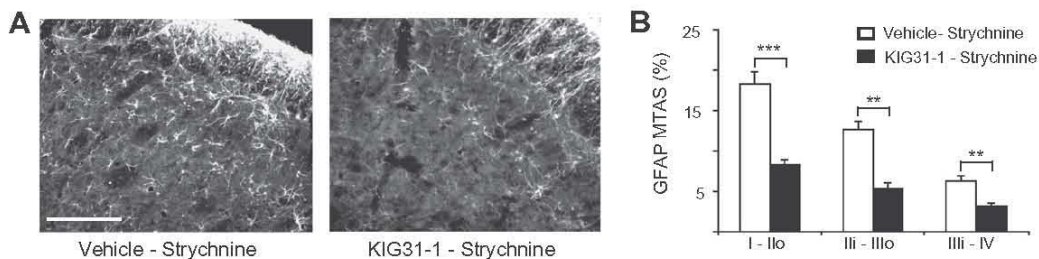
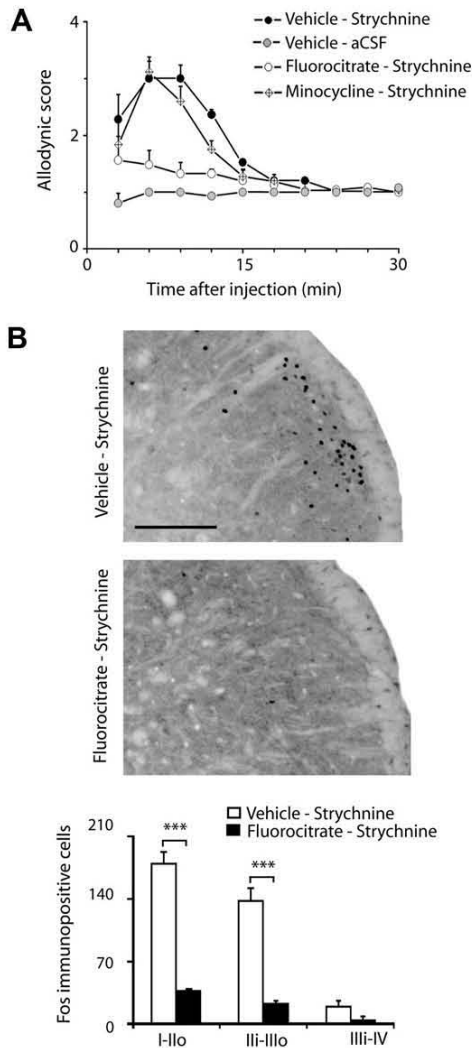


Fig. 2. Inactivation of the dorsal horn neural circuit involved in allodynia blocks astrocyte activation. (A) Images of GFAP fluorescence immunolabeling in the MDH of Tat-carrier (Vehicle) and PKCγ inhibitor (KIG31-1) injected rats. Tat-carrier and KIG31-1 were preemptively administered in anaesthetized rats 30 min before intracisternal injection of strychnine (40 µg in 5 µL). Rats were stimulated 5 min after strychnine injection and sacrificed at 3 min after the end of stimulation. The stimulation consisted in light brushing of the ipsilateral lip. Bar = 150 µm. (B) Bar histograms summarizing mean (±SEM) total area superfices (MTAS) of GFAP immunofluorescence in the different laminae of the ipsilateral MDH of Tat-carrier (Vehicle) and PKCγ inhibitor (KIG31-1) injected rats (see A; n = 4/group). I-IIo: laminae I and outer II; Ili-IIIo: laminae inner II and outer III; IIIi-IV: laminae inner III and IV; \*\*P < .01, \*\*\*P < .001.





**Fig. 3.** Allodynia induced by removal of glycine inhibition requires astrocyte activation. (A) Time course of changes in behavioral responses (mean  $\pm$  SEM) evoked by air puffs applied on the face of aCSF- ( $n = 3$ ) or strychnine-injected rats ( $n = 15$ ). Rats were intracisternally injected with fluorocitrate, minocycline, or vehicle 1 h before strychnine ( $n = 5$ /group). Fluorocitrate significantly reduced the allodynic score increases induced by strychnine. (B) Top: images of Fos positive cell nuclei in the MDH of a vehicle-injected rat and a fluorocitrate-injected rat; bar = 200  $\mu$ m. Bottom: Fos expression in the different laminae of the ipsilateral MDH following light brushing of the lip after intracisternal strychnine in vehicle- and fluorocitrate-injected animals ( $n = 4$ /group); mean ( $\pm$ SEM) sum of the total number of labeled cells counted from all 5 sections that were analyzed in each animal. \*\*\* $P < .001$ . I-IIo: laminae I and outer II; III-IIIo: laminae inner II and outer III; IIIi-IV: laminae inner III and IV.

was present in astrocytic processes only ( $n = 3$ ), although not all processes displayed immunoreactivity for serine racemase (Fig. 5A). In our dual labeling experiments, there was no presence of immunoreactivity for serine racemase outside GFAP immunoreactive processes. D-Serine is thus a putative gliotransmitter in the MDH. We next tested D-serine implication in the allodynia induced by removal of glycine inhibition.

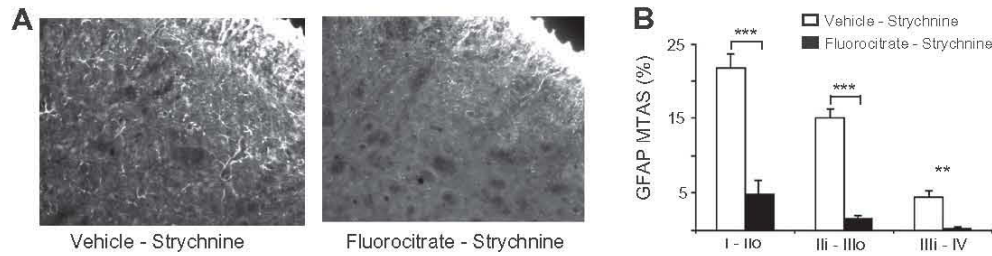
First, we found that intracisternal administration of DAAO, which induces a selective degradation of D-serine, 15 min before intracisternal strychnine injection (0.17 U in 5  $\mu$ L vehicle,  $n = 5$ ), resulted in a drastic reduction in the maximal scores of nociceptive responses of 54% in freely moving animals (Fig. 5B). Preemptive

intracisternal injection of vehicle alone (FAD aCSF) did not change the score of nociceptive responses after strychnine (Fig. 5B). Second, we found that intracisternal administration of DAAO (0.17 U in 5  $\mu$ L vehicle,  $n = 4$ ) 15 min before the strychnine injection (40  $\mu$ g in 5  $\mu$ L aCSF) resulted in a dramatic reduction in brush-induced Fos expression in the MDH of urethane-anesthetized rats (Fig. 5C). Compared to control animals that received preemptive intracisternal injection of vehicle alone (FAD aCSF,  $n = 4$ ), Fos expression was reduced by 47% and 51% in lamina I-IIo and in lamina III-IIIo, respectively (Fig. 5C). Removal of D-serine through selective inhibition of D-serine synthesis with DAAO thus prevented strychnine-induced allodynia and activation of the underlying dorsal horn circuit as well. In addition, intracisternal administration of exogenous D-serine (100  $\mu$ g in association with strychnine, in 5  $\mu$ L aCSF) restored the allodynia induced by removal of glycine inhibition in conditions of astrocyte inactivation (Fig. 5B). Intracisternal injection of D-serine alone did not evoke allodynia (Fig. 5B). Altogether, these findings showed that D-serine was critical for abnormal pain signaling in the dorsal horn after removal of glycine inhibition.

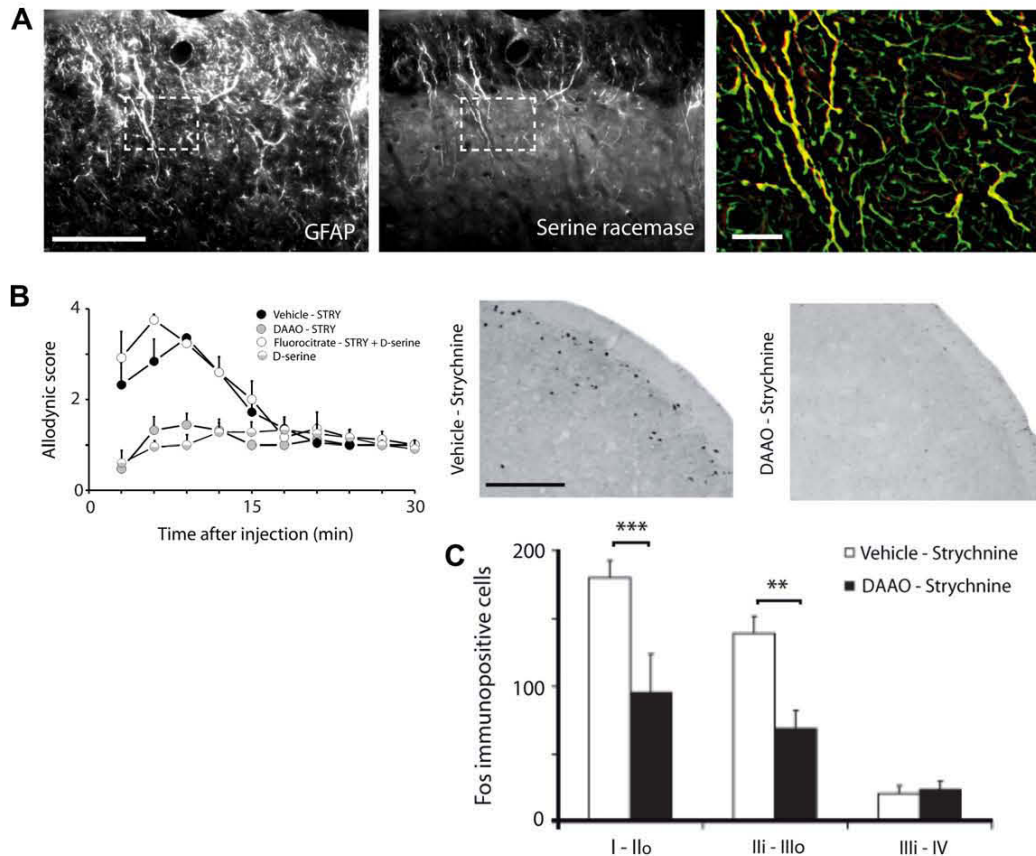
#### 4. Discussion

The present work provides the first evidence that astrocytes play a pivotal role in the mechanisms of dynamic mechanical allodynia. It suggests that after dysfunction of dorsal horn glycinergic inhibition, astrocytes can be activated by innocuous neuronal signaling, then backsignal to neurons through D-serine release, allowing NMDAR signaling and expression of allodynia. Such a contribution of astrocytes and D-serine to pathological pain fuels the concept that astrocytes are critical players in pain signaling.

We and others have already shown that dynamic mechanical allodynia can be modeled acutely and reversibly by intrathecal or intracisternal strychnine [5,31,32,39,50,66]. Removal of glycine inhibition operates at the segmental level and is selective for innocuous somatosensory input [51,52]. We demonstrated that after removal of glycine inhibition, touch can excite dorsal horn neurons that normally respond to noxious stimuli only [31,32]. This, together with convergent findings by others [2,10,11,20, 21,58], emphasized the role of disinhibition in pathological pain. We also found that the switch is mediated through a local excitatory neural circuit [31]. Finally, we showed that removal of glycine inhibition provides a selective, morphine-resistant, and clinically relevant model for dynamic mechanical allodynia [32]. The present work further suggests that astrocytes play a pivotal role in the mechanisms of dynamic mechanical allodynia induced by removal of glycine inhibition. As shown by morphometric analysis of GFAP and OX-42 immunofluorescence, after removal of glycine inhibition, tactile stimuli activated dorsal horn astrocytes, but not microglia. Large increases in GFAP immunofluorescence superficially were rapidly present and such fast increases in GFAP immunofluorescence signal are in line with the known ability of GFAP filaments to assemble or disassemble quickly [37]. Although a slight activation was found in the superficial laminae early after brushing alone, increases in GFAP labeling were preeminent when tactile stimuli were applied in condition of removal of glycine inhibition, which suggests that astrocyte activation was functionally related to activity in the neuronal afferent pathway and did not simply result from removal of inhibition. The effects of selective inhibition of PKC $\gamma$  provided further confirmation that astrocyte activation was triggered by neural activity in the dorsal horn. PKC $\gamma$  is an important contributor to the increased pain sensitivity that occurs after injury and is expressed selectively in a subpopulation of lamina II interneurons of the dorsal horn [25]. The great majority of cells with PKC $\gamma$  are likely to be excitatory interneurons [43].



**Fig. 4.** Inhibition of glia metabolism blocks astrocyte activation. (A) Images of GFAP fluorescence immunolabeling in the MDH of vehicle- and fluorocitrate-injected rats. Fluorocitrate (2 nmol in 5  $\mu$ L) and vehicle (5  $\mu$ L) were preemptively administered in anaesthetized rats 1 h before intracisternal injection of strychnine (40  $\mu$ g in 5  $\mu$ L). Rats were stimulated 5 min after strychnine injection and sacrificed at 3 min after the end of stimulation. The stimulation consisted in light brushing of the ipsilateral lip; bar = 150  $\mu$ m. (B) Bar histograms summarizing mean ( $\pm$ SEM) total area superficialities (MTAS) of GFAP immunofluorescence in the different laminae of the ipsilateral MDH of vehicle- and fluorocitrate-injected rats (see A; n = 4/group). I - Ilo: laminae I and outer II; IIIi - IIIo: laminae inner II and outer III; IIIi - IV: laminae inner III and IV; \*\*\*P < .001.



**Fig. 5.** Allodynia induced by removal of glycine inhibition requires D-serine. (A) GFAP and serine racemase immunofluorescence signals in the rat MDH. The magnified image on the right shows selective coexpression (yellow) of serine racemase (red) in GFAP profiles (green). Bars = 100  $\mu$ m (left and middle), 10  $\mu$ m (right). (B) Time course of changes in behavioral responses (mean  $\pm$  SEM, n = 5/group) evoked by air puffs applied on the face of strychnine injected rats. Rats were intracisternally injected with DAAO or vehicle 15 min before strychnine or with fluorocitrate 1 h before strychnine associated with D-serine or with D-serine alone. DAAO significantly reduced the allodynic score increases induced by strychnine. (C) Top: images of Fos positive cell nuclei in the MDH of a vehicle-injected rat and a DAAO-injected rat; bar = 200  $\mu$ m. Bottom: Fos expression in the different laminae of the ipsilateral MDH following light brushing of the lip after intracisternal strychnine in control- and DAAO-injected animals (n = 4/group); mean ( $\pm$ SEM) sum of the total number of labeled cells counted from all 5 sections that were analyzed in each animal. \*\*P < .01, \*\*\*P < .001. I - Ilo: laminae I and outer II; IIIi - IIIo: laminae inner II and outer III; IIIi - IV: laminae inner III and IV.

Furthermore, PKC $\gamma$  activation is a critical step in the gating of tactile input to nociceptive specific neurons during glycine inhibitory dysfunction [31]. PKC $\gamma$  interneurons could provide the drive to astrocyte activation in the strychnine model as well as in chronic pain models. In line with our findings, Wang et al. [62] recently showed that neuronal and astrocytic activations are closely related with the maintenance of neuropathic pain through a reciprocal cross-talk. In our model, however, astrocyte activation lasted long-

er (more than 40 min) than allodynia in conscious rats (about 15 min), which suggests that it was not sufficient by itself to induce the symptom and that concomitant neuronal disinhibition was necessary.

Early evidence showed an increase in the astrocytic marker GFAP in L4 spinal cord in the chronic constriction injury neuropathic pain model [14]. Increased GFAP immunostaining was observed in the gray matter of the spinal cord ipsilateral to the



lesion and specific to spinal segments in which the sciatic nerve is distributed. Since then, astrocytic activation, as shown by GFAP labeling, peptide S100 beta overexpression [8,38,42,56], or ERK phosphorylation [24,69], has been steadily demonstrated in different models of neuropathic pain. In the various neuropathic pain models, however, it is clear that activation of spinal microglia is critical to the production of pain and appears before that of astrocytes [49,63]. Because the microglial response to nerve injury precedes the astrocyte reaction, it has been speculated that a direct path of communication may exist between these 2 glial cell types to coordinate their sequential temporal patterns of activation [49]. This was clearly not the case in the model of allodynia induced by removal of glycine inhibition as shown by the lack of microglia activation at early and late times. Dynamic mechanical allodynia could thus be selectively linked to astrocyte activation.

In accordance with our morphological findings, allodynia induced by removal of glycine inhibition was prevented by intracisternal administration of the glia inhibitor fluorocitrate, while minocycline, an inhibitor more selective for microglia, was without effect. Although fluorocitrate, which suppresses the metabolic activity of astrocytes, might indirectly suppresses surrounding neuronal activity because neurons need astrocytes to function properly, it must be noted that after fluorocitrate, the rats were still able to detect air puffing as much as control animals (Fig. 3A). This suggests that fluorocitrate did not suppress the related neuronal activity. We also tested the possibility that the absence of an effect of minocycline on allodynia was due to the fact that minocycline might have not penetrated the neural tissue. This possibility was ruled out because intracisternally injected 100 µg minocycline significantly reduced pain behavior during the second phase of the orofacial formalin test. Accordingly, in a different rat model of pain facilitation, intrathecal administration of a similar dose of minocycline (50 µg) 30 min before the stimulus abolished the induced allodynia [22]. In the model of allodynia induced by removal of glycine inhibition, astrocyte activation only is required for pain expression. Furthermore, as shown by the Fos study, fluorocitrate also prevented the activation of the dorsal horn circuit underlying allodynia. Accordingly, fluorocitrate has been found to be effective in blocking diverse models of allodynia including intraplantar zymosan [28], intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1 envelope glycoprotein GP120 [29], sciatic inflammatory neuropathy [30], nerve transection [38,46]. These data, together with our morphological findings, show that astrocyte activation is a necessary, although not sufficient step in the mechanisms of dynamic mechanical allodynia induced by dysfunction of dorsal horn glycinergic inhibition. We next searched for the mechanisms by which astrocyte activation promotes pain signaling in the dorsal horn.

Although past research has focused on the release of neuroexcitatory proinflammatory cytokines, prostaglandins and ATP by glia in chronic pain models [27,29,30] and more recently on astrocytic glutamate [3], we hypothesized that the gliotransmitter D-serine could be involved because allodynia induced by removal of glycine inhibition is NMDAR dependent [31,39,54,66]. It is now demonstrated that D-serine serves as an endogenous ligand at the strychnine-insensitive glycine site of NMDARs [35,36,48]. D-serine is synthesized by serine racemase in glial cells, sometimes in neurons [19,33], released from these cells upon activation of glutamatergic glial receptors and degraded by the astrocytic enzyme DAAO [26,65]. D-serine controls NMDAR activity and can govern NMDA-dependent synaptic plasticity [16,40,67]. High levels of DAAO have been demonstrated to exist in the MDH, where it is localized to astrocytes exclusively [17]. We found serine racemase to be expressed by MDH astrocytic processes only. Altogether, this suggests that in the MDH D-serine is a putative gliotransmitter of astrocytic origin.

We next asked whether allodynia induced by removal of glycine inhibition was dependent on D-serine. We found that removal of endogenous D-serine through selective degradation with DAAO prevented allodynia induced by removal of glycine inhibition and activation of the underlying dorsal horn circuit as well. D-serine presence is thus necessary to allow dynamic mechanical allodynia after removal of glycine inhibition. The allodynia could still be driven by excess release of glutamate as a result of the failure of local inhibitory inputs, and the astrocyte activation could be driven by the need to uptake this excess glutamate. Astrocyte inactivation, by blocking the glutamate–glutamine shuttle, would reduce neuronal glutamate release and consequently allodynia. However, in conditions where astrocytes were inactivated by fluorocitrate, exogenous D-serine restored allodynia. We can thus conclude that D-serine controls NMDAR activity in the dorsal horn in vivo during allodynia induced by removal of glycine inhibition, which provides a mechanism by which astrocyte activation contributes to pain signaling in the dorsal horn. Accordingly, it has been shown that D-serine released by astrocytes contributes to NMDAR-dependent dorsal horn long term potentiation and inhibition of D-serine reduces tetanically sciatic stimulation-induced mechanical allodynia in rats [68]. Because both neurons and astrocytes have been reported to express NMDARs [59], D-serine could also be acting on astrocytes to induce the release of another gliotransmitter such as purine or glutamate. However, astrocytes cannot be the only target of D-serine because exogenous D-serine recovered allodynia when astrocytes were inactivated by fluorocitrate.

To conclude, the present work provides the first arguments that glycine inhibitory dysfunction may turn touch into pain through astrocyte-derived D-serine. Such a contribution of astrocytes to pain signaling supports the idea that astrocytes and D-serine should be considered as interesting targets for new analgesics.

#### Conflict of interest statement

None of the authors has any conflict of interest to declare.

#### Acknowledgments

We thank J.P. Mothet, T. Papouin, S.H.R. Oliet, and V. Fénelon for reading of an earlier version of the article, C. Pujol (Bordeaux Imaging Center) for expertise in image analysis, and A.M. Gaydier for secretarial assistance. This work was supported by INSERM, Université Clermont-1, Université de Bordeaux, and studentships from the French Ministry for Research to LSM and CP.

#### References

- [1] Ahmadi S, Muth-Selbach U, Lauterbach A, Lipfert P, Neuhuber WL, Zeilhofer HU. Facilitation of spinal NMDA receptor currents by spillover of synaptically released glycine. *Science* 2003;300:2094–7.
- [2] Baba H, Ji RR, Kohno T, Moore KA, Ataka T, Wakai A, Okamoto M, Woolf CJ. Removal of GABAergic inhibition facilitates polysynaptic A fiber-mediated excitatory transmission to the superficial spinal dorsal horn. *Mol Cell Neurosci* 2003;24:818–30.
- [3] Bardoni R, Ghirri A, Zonta M, Betelli C, Vitale G, Ruggieri V, Sandrini M, Carmignoto G. Glutamate-mediated astrocyte-to-neuron signalling in the rat dorsal horn. *J Physiol* 2010;588:831–46.
- [4] Baron R. Mechanisms of disease: neuropathic pain—a clinical perspective. *Nat Clin Pract Neurol* 2006;2:95–106.
- [5] Beyer C, Roberts LA, Komisaruk BR. Hyperalgesia induced by altered glycinergic activity at the spinal cord. *Life Sci* 1985;37:875–82.
- [6] Campbell JN, Meyer RA. Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron* 2006;2:77–92.
- [7] Chen L, Wright LR, Chen CH, Oliver SF, Wender PA, Mochly-Rosen D. Molecular transporters for peptides: delivery of a cardioprotective epsilonPKC agonist peptide into cells and intact ischemic heart using a transport system, R(7). *Chem Biol* 2001;8:1123–9.
- [8] Colburn RW, Rickman AJ, DeLeo JA. The effect of site and type of nerve injury on spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Exp Neurol* 1999;157:289–304.

- [9] Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci* 2009;32:1–32.
- [10] Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 2005;438:1017–21.
- [11] Coull JA, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sik A, De Koninck P, De Koninck Y. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 2003;424:938–42.
- [12] Dorn 2nd GW, Mochly-Rosen D. Intracellular transport mechanisms of signal transducers. *Annu Rev Physiol* 2002;64:407–29.
- [13] Fonnun F, Johnsen A, Hassel B. Use of fluorocitrate and fluoroacetate in the study of brain metabolism. *Glia* 1997;21:106–13.
- [14] Garrison CJ, Dougherty PM, Kajander KC, Carlton SM. Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. *Brain Res* 1991;565:1–7.
- [15] Hassel B, Paulsen RE, Johnsen A, Fonnun F. Selective inhibition of glial cell metabolism in vivo by fluorocitrate. *Brain Res* 1992;576:120–4.
- [16] Henneberger C, Papouin T, Oliet SH, Rusakov DA. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 2010;463:232–6.
- [17] Horiike K, Tojo H, Arai R, Nozaki M, Maeda T. D-Amino-acid oxidase is confined to the lower brain stem and cerebellum in rat brain: regional differentiation of astrocytes. *Brain Res* 1994;652:297–303.
- [18] Hülsmann S, Oku Y, Zhang W, Richter DW. Metabolic coupling between glia and neurons is necessary for maintaining respiratory activity in transverse medullary slices of neonatal mouse. *Eur J Neurosci* 2000;12:856–62.
- [19] Kartvelishvili E, Shleper M, Balan L, Dumini E, Wolosker H. Neuron-derived D-serine release provides a novel means to activate N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 2006;281:14151–62.
- [20] Keller AF, Beggs S, Salter MW, De Koninck Y. Transformation of the output of spinal lamina I neurons after nerve injury and microglia stimulation underlying neuropathic pain. *Mol Pain* 2007;3:27.
- [21] Knabl J, Witschi R, Hösl K, Reinold H, Zeilhofer UB, Ahmadi S, Brockhaus J, Sergejeva M, Hess A, Brune K, Fritschy JM, Rudolph U, Möhler H, Zeilhofer HU. Reversal of pathological pain through specific spinal GABA<sub>A</sub> receptor subtypes. *Nature* 2008;451:330–4.
- [22] Ledebauer A, Sloane EM, Milligan ED, Frank MG, Mahony JH, Maier SF, Watkins LR. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain* 2005;115:71–83.
- [23] Ling EA, Kaur LC, Yick TY, Wong WC. Immunocytochemical localization of CR3 complement receptors with OX-42 in amoeboid microglia in postnatal rats. *Anat Embryol (Berl)* 1990;182:481–6.
- [24] Ma W, Quirion R. Partial sciatic nerve ligation induces increase in the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) in astrocytes in the lumbar spinal dorsal horn and the gracile nucleus. *Pain* 2002;99:175–84.
- [25] Malmberg AB, Chen C, Tonegawa S, Basbaum AI. Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC $\gamma$ . *Science* 1997;278:279–83.
- [26] Martineau M, Baux G, Mothet JP. D-Serine signalling in the brain: friend and foe. *Trends Neurosci* 2006;8:481–91.
- [27] McMahon SB, Cafferty WB, Marchand F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Exp Neurol* 2005;192:444–62.
- [28] Meller ST, Dykstra C, Gzybycki D, Murphy S, Gebhart GF. The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. *Neuropharmacology* 1994;33:1471–8.
- [29] Milligan ED, Mehmert KK, Hinde JL, Harvey LO, Martin D, Tracey KJ, Maier SF, Watkins LR. Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120. *Brain Res* 2000;861:105–16.
- [30] Milligan ED, Twining C, Chacur M, Biedenkapp J, O'Connor K, Poole S, Tracey K, Martin D, Maier SF, Watkins LR. Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *J Neurosci* 2003;23:1026–40.
- [31] Miraucourt LS, Dallel R, Voisin DL. Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through PKC $\gamma$  interneurons. *PLoS One* 2007;2:e1116.
- [32] Miraucourt LS, Moisset X, Dallel R, Voisin DL. Glycine inhibitory dysfunction induces a selectively dynamic, morphine-resistant, and neurokinin 1 receptor-independent mechanical allodynia. *J Neurosci* 2009;29:2519–27.
- [33] Miya K, Inoue R, Takata Y, Abe M, Natsume R, Sakimura K, Hongou K, Miyawaki T, Mori H. Serine racemase is predominantly localized in neurons in mouse brain. *J Comp Neurol* 2008;510:641–54.
- [34] Mochly-Rosen D, Gordon AS. Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB J* 1998;12:35–42.
- [35] Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady Jr RO, Linden DJ, Ferris CD, Rogawski MA, Snyder SH. D-Serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:4926–31.
- [36] Mothet JP, Pollegioni L, Ouanounou G, Martineau M, Fossier P, Baux G. Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:5606–11.
- [37] Nakamura Y, Takeda M, Angelides KJ, Tada K, Hariguchi S, Nishimura T. Assembly, disassembly, and exchange of glial fibrillary acidic protein. *Glia* 1991;4:101–10.
- [38] Okada-Ogawa A, Suzuki I, Sessle BJ, Chiang CY, Salter MW, Dostrovsky JO, Tsuboi Y, Kondo M, Kitagawa J, Kobayashi A, Noma N, Imamura Y, Iwata K. Astroglia in medullary dorsal horn (trigeminal spinal subnucleus caudalis) are involved in trigeminal neuropathic pain mechanisms. *J Neurosci* 2009;29:11161–71.
- [39] Onaka M, Minami T, Nishihara I, Ito S. Involvement of glutamate receptors in strychnine- and bicuculline-induced allodynia in conscious mice. *Anesthesiology* 1996;84:1215–22.
- [40] Panatier A, Theodosios DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, Oliet SH. Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* 2006;125:775–84.
- [41] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press; 1997.
- [42] Piao ZG, Cho IH, Park CK, Hong JP, Choi SY, Lee SJ, Lee S, Park K, Kim JS, Oh SB. Activation of glia and microglial p38 MAPK in medullary dorsal horn contributes to tactile hypersensitivity following trigeminal sensory nerve injury. *Pain* 2006;121:219–31.
- [43] Polgar E, Fowler JH, McGill MM, Todd AJ. The types of neuron which contain protein kinase C gamma in rat spinal cord. *Brain Res* 1999;833:71–80.
- [44] Qin M, Wang JJ, Cao R, Zhang H, Duan L, Gao B, Xiong YF, Chen LW, Rao ZR. The lumbar spinal cord glial cells actively modulate subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. *Neurosci Res* 2006;55:442–50.
- [45] Raboisson P, Dallel R. The orofacial formalin test. *Neurosci Biobehav Rev* 2004;28:219–26.
- [46] Raghavendra V, Tanga F, DeLeo JA. Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306:624–30.
- [47] Ren K. Emerging role of astroglia in pain hypersensitivity. *Jpn Dent Sci Rev* 2010;46:86–92.
- [48] Schell MJ, Molliver ME, Snyder SH. D-Serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3948–52.
- [49] Scholz J, Woolf CJ. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci* 2007;10:1361–8.
- [50] Sherman SE, Loomis CW. Morphine insensitive allodynia is produced by intrathecal strychnine in the lightly anesthetized rat. *Pain* 1994;56:17–29.
- [51] Sherman SE, Loomis CW. Strychnine-dependent allodynia in the urethane-anesthetized rat is segmentally distributed and prevented by intrathecal glycine and betaine. *Can J Physiol Pharmacol* 1995;73:1698–705.
- [52] Sherman SE, Loomis CW. Strychnine-sensitive modulation is selective for non-noxious somatosensory input in the spinal cord of the rat. *Pain* 1996;66:321–30.
- [53] Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010;119:7–35.
- [54] Sorkin LS, Puig S. Neuronal model of tactile allodynia produced by spinal strychnine: effects of excitatory amino acid receptor antagonists and a mu-opiate receptor agonist. *Pain* 1996;68:283–92.
- [55] Strassman AM, Vos BP. Somatotopic and laminar organization of fos-like immunoreactivity in the medullary and upper cervical dorsal horn induced by noxious facial stimulation in the rat. *J Comp Neurol* 1993;331:495–516.
- [56] Tanga FY, Raghavendra V, Nutile-McMenemy N, Marks A, DeLeo JA. Role of astrocytic S100beta in behavioral hypersensitivity in rodent models of neuropathic pain. *Neuroscience* 2006;140:1003–10.
- [57] Tikka TM, Koistinaho JE. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *J Immunol* 2001;166:7527–33.
- [58] Torsney C, MacDermott AB. Disinhibition opens the gate to pathological pain signaling in superficial neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord. *J Neurosci* 2006;26:1833–43.
- [59] Verkhratsky A, Kirchhoff F. NMDA receptors in glia. *Neuroscientist* 2007;13:28–37.
- [60] Voisin DL, Guy N, Chalus M, Dallel R. Nociceptive stimulation activates locus coeruleus neurons projecting to the somatosensory thalamus in the rat. *J Physiol* 2005;566:929–37.
- [61] Vos BP, Strassman AM, Maciewicz RJ. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *J Neurosci* 1994;14:2708–23.
- [62] Wang W, Wang W, Mei X, Huang J, Wei Y, Wang Y, Wu S, Li Y. Crosstalk between spinal astrocytes and neurons in nerve injury-induced neuropathic pain. *PLoS One* 2009;4:e6973.
- [63] Watkins LR, Maier SF. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:973–85.
- [64] Watkins LR, Milligan ED, Maier SF. Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci* 2001;24:450–5.
- [65] Wolosker H, Blackshaw S, Snyder SH. Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:13409–14.
- [66] Yaksh TL. Behavioral and autonomic correlates of the tactile evoked allodynia produced by spinal glycine inhibition: effects of modulatory receptor systems and excitatory amino acid antagonists. *Pain* 1989;37:111–23.
- [67] Yang Y, Ge W, Chen Y, Zhang Z, Shen W, Wu C, Poo M, Duan S. Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:15194–9.
- [68] Ying B, Lu N, Zhang YQ, Zhao ZQ. Involvement of spinal glia in tetanically sciatic stimulation-induced bilateral mechanical allodynia in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340:1264–72.
- [69] Zhuang ZY, Germer P, Woolf CJ, Ji RR. ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. *Pain* 2005;114:149–59.

CHAPITRE 6 : REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

*« Je n'ai jamais rencontré d'homme si ignorant qu'il n'eut quelque chose à m'apprendre. »*

*Galilée*



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abeliovich A, Chen C, Goda Y, Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S (1993a) Modified hippocampal long-term potentiation in PKC gamma-mutant mice. *Cell* 75:1253-1262.
2. Abeliovich A, Paylor R, Chen C, Kim JJ, Wehner JM, Tonegawa S (1993b) PKC gamma mutant mice exhibit mild deficits in spatial and contextual learning. *Cell* 75:1263-1271.
3. Adwanikar H, Karim F, Gereau RW (2004) Inflammation persistently enhances nociceptive behaviors mediated by spinal group I mGluRs through sustained ERK activation. *Pain* 111:125-135.
4. Ahn DK, Lim EJ, Kim BC, Yang GY, Lee MK, Ju JS, Han SR, Bae YC (2009) Compression of the trigeminal ganglion produces prolonged nociceptive behavior in rats. *Eur J Pain* 13:568-575.
5. Akinori M (1998) Subspecies of protein kinase C in the rat spinal cord. *Prog Neurobiol* 54:499-530.
6. Al Khater KM, Kerr R, Todd AJ (2008) A quantitative study of spinothalamic neurons in laminae I, III, and IV in lumbar and cervical segments of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 511:1-18.
7. Albe-Fessard D, Boivie J, Grant G, Levante A (1975) Labelling of cells in the medulla oblongata and the spinal cord of the monkey after injections of horseradish peroxidase in the thalamus. *Neurosci Lett* 1:75-80.
8. Aley KO, Messing RO, Mochly-Rosen D, Levine JD (2000) Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C. *J Neurosci* 20:4680-4685.
9. Ali Z, Meyer RA, Campbell JN (1996) Secondary hyperalgesia to mechanical but not heat stimuli following a capsaicin injection in hairy skin. *Pain* 68:401-411.
10. Almarestani L, Waters SM, Krause JE, Bennett GJ, Ribeiro-da-Silva A (2007) Morphological characterization of spinal cord dorsal horn lamina I neurons projecting to the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 504:287-297.
11. Alvarado LT, Perry GM, Hargreaves KM, Henry MA (2007) TRPM8 Axonal expression is decreased in painful human teeth with irreversible pulpitis and cold hyperalgesia. *J Endod* 33:1167-1171.
12. Alvarez FJ, Villalba RM, Carr PA, Grandes P, Somohano PM (2000) Differential distribution of metabotropic glutamate receptors 1a, 1b, and 5 in the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 422:464-487.
13. Amaral D (2000) The Functional Organization of Perception and Movement. In: *PRINCIPLES OF NEURONAL SCIENCE* (Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, eds), pp 338-349. McGraw-Hill Companies.

14. Anand P, Bley K (2011) Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. *Br J Anaesth* 107:490-502.
15. Andrew D, Craig AD (2001a) Spinothalamic lamina I neurones selectively responsive to cutaneous warming in cats. *J Physiol* 537:489-495.
16. Andrew D, Craig AD (2001b) Spinothalamic lamina I neurons selectively sensitive to histamine: a central neural pathway for itch. *Nat Neurosci* 4:72-77.
17. Andrew D, Greenspan JD (1999) Mechanical and heat sensitization of cutaneous nociceptors after peripheral inflammation in the rat. *J Neurophysiol* 82:2649-2656.
18. Andrew D, Krout KE, Craig AD (2003) Differentiation of lamina I spinomedullary and spinothalamic neurons in the cat. *J Comp Neurol* 458:257-271.
19. Antal M, Fukazawa Y, Eordogh M, Muszil D, Molnar E, Itakura M, Takahashi M, Shigemoto R (2008) Numbers, densities, and colocalization of AMPA- and NMDA-type glutamate receptors at individual synapses in the superficial spinal dorsal horn of rats. *J Neurosci* 28:9692-9701.
20. Antal M, Petko M, Polgar E, Heizmann CW, Storm-Mathisen J (1996) Direct evidence of an extensive GABAergic innervation of the spinal dorsal horn by fibres descending from the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience* 73:509-518.
21. Aronica E, Catania MV, Geurts J, Yankaya B, Troost D (2001) Immunohistochemical localization of group I and II metabotropic glutamate receptors in control and amyotrophic lateral sclerosis human spinal cord: upregulation in reactive astrocytes. *Neuroscience* 105:509-520.
22. Attal N, Guirimand F, Brasseur L, Gaude V, Chauvin M, Bouhassira D (2002) Effects of IV morphine in central pain: a randomized placebo-controlled study. *Neurology* 58:554-563.
23. Averill S, McMahon SB, Clary DO, Reichardt LF, Priestley JV (1995) Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons. *Eur J Neurosci* 7:1484-1494.
24. Azkue JJ, Mateos JM, Elezgarai I, Benitez R, Osorio A, Diez J, Bilbao A, Bidaurrezaga A, Grandes P (2000) The metabotropic glutamate receptor subtype mGluR 2/3 is located at extrasynaptic loci in rat spinal dorsal horn synapses. *Neurosci Lett* 287:236-238.
25. Baba H, Ji RR, Kohno T, Moore KA, Ataka T, Wakai A, Okamoto M, Woolf CJ (2003) Removal of GABAergic inhibition facilitates polysynaptic A fiber-mediated excitatory transmission to the superficial spinal dorsal horn. *Mol Cell Neurosci* 24:818-830.
26. Bantick SJ, Wise RG, Ploghaus A, Clare S, Smith SM, Tracey I (2002) Imaging how attention modulates pain in humans using functional MRI. *Brain* 125:310-319.
27. Bard L, Sainlos M, Bouchet D, Cousins S, Mikasova L, Breillat C, Stephenson FA, Imperiali B, Choquet D, Groc L (2010) Dynamic and specific interaction between synaptic NR2-NMDA receptor and PDZ proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:19561-19566.

28. Bardoni R, Ghirri A, Zonta M, Betelli C, Vitale G, Ruggieri V, Sandrini M, Carmignoto G (2010) Glutamate-mediated astrocyte-to-neuron signalling in the rat dorsal horn. *J Physiol* 588:831-846.
29. Barmack NH, Qian Z, Yoshimura J (2000) Regional and cellular distribution of protein kinase C in rat cerebellar Purkinje cells. *J Comp Neurol* 427:235-254.
30. Barnett ME, Madgwick DK, Takemoto DJ (2007) Protein kinase C as a stress sensor. *Cell Signal* 19:1820-1829.
31. Baron R (2006) Mechanisms of disease: neuropathic pain--a clinical perspective. *Nat Clin Pract Neurol* 2:95-106.
32. Baron R, Binder A, Wasner G (2010) Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurol* 9:807-819.
33. Basbaum AI (1999) Distinct neurochemical features of acute and persistent pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7739-7743.
34. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139:267-284.
35. Baseer N, Polgar E, Watanabe M, Furuta T, Kaneko T, Todd AJ (2012) Projection Neurons in Lamina III of the Rat Spinal Cord Are Selectively Innervated by Local Dynorphin-Containing Excitatory Neurons. *J Neurosci* 32:11854-11863.
36. Beggs S, Salter MW (2007) Stereological and somatotopic analysis of the spinal microglial response to peripheral nerve injury. *Brain Behav Immun* 21:624-633.
37. Beitz AJ (1982a) The nuclei of origin of brain stem enkephalin and substance P projections to the rodent nucleus raphe magnus. *Neuroscience* 7:2753-2768.
38. Beitz AJ (1982b) The sites of origin brain stem neurotensin and serotonin projections to the rodent nucleus raphe magnus. *J Neurosci* 2:829-842.
39. Benarroch EE (2001) Pain-autonomic interactions: a selective review. *Clin Auton Res* 11:343-349.
40. Benarroch EE (2010) Central neuron-glia interactions and neuropathic pain: overview of recent concepts and clinical implications. *Neurology* 75:273-278.
41. Beneng K, Renton T, Yilmaz Z, Yiangou Y, Anand P (2010) Sodium channel Na v 1.7 immunoreactivity in painful human dental pulp and burning mouth syndrome. *BMC Neurosci* 11:71.
42. Benison AM, Chumachenko S, Harrison JA, Maier SF, Falci SP, Watkins LR, Barth DS (2011) Caudal granular insular cortex is sufficient and necessary for the long-term maintenance of allodynic behavior in the rat attributable to mononeuropathy. *J Neurosci* 31:6317-6328.
43. Benoliel R, Birenboim R, Regev E, Eliav E (2005) Neurosensory changes in the infraorbital nerve following zygomatic fractures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 99:657-665.

44. Benoliel R, Eliav E (2008) Neuropathic orofacial pain. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 20:237-54, vii.
45. Bereiter DA, Hargreaves KM, Hu JW (2008) Trigeminal Mechanisms of Nociception: Peripheral and Brainstem Organization. pp 435-460.
- 45b. Berge TI (2002) Incidence of chronic neuropathic pain subsequent to surgical removal of impacted third molars. *Acta Odontol Scand* 60:108-112.
46. Berger JV, Knaepen L, Janssen SP, Jaken RJ, Marcus MA, Joosten EA, Deumens R (2011) Cellular and molecular insights into neuropathy-induced pain hypersensitivity for mechanism-based treatment approaches. *Brain Res Rev* 67:282-310.
47. Bessou P, Perl ER (1969) Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *J Neurophysiol* 32:1025-1043.
48. Bett K, Sandkuhler J (1995) Map of spinal neurons activated by chemical stimulation in the nucleus raphe magnus of the unanesthetized rat. *Neuroscience* 67:497-504.
49. Beyer C, Roberts LA, Komisaruk BR (1985) Hyperalgesia induced by altered glycinergic activity at the spinal cord. *Life Sci* 37:875-882.
50. Binshtok AM, Bean BP, Woolf CJ (2007) Inhibition of nociceptors by TRPV1-mediated entry of impermeant sodium channel blockers. *Nature* 449:607-610.
51. Bleakman D, Alt A, Nisenbaum ES (2006) Glutamate receptors and pain. *Semin Cell Dev Biol* 17:592-604.
52. Bolanowski SJ, Jr., Zwislocki JJ (1984) Intensity and frequency characteristics of pacinian corpuscles. II. Receptor potentials. *J Neurophysiol* 51:812-830.
53. Bon K, Wilson SG, Mogil JS, Roberts WJ (2002) Genetic evidence for the correlation of deep dorsal horn Fos protein immunoreactivity with tonic formalin pain behavior. *J Pain* 3:181-189.
54. Bouhassira D, Attal N (2007a) Définitions, classification et diagnostic. In: *Douleurs neuropathiques* (Brasseur L, Bouhassira D, Chauvin M, eds), pp 1-18. Paris: Arnette Groupe Liaisons.
55. Bouhassira D, Attal N (2007b) Etiologies et aspects cliniques. In: *Douleurs neuropathiques* (Brasseur L, Bouhassira D, Chauvin M, eds), pp 19-31. Paris: Arnette Groupe Liaisons.
56. Bouhassira D, Lanteri-Minet M, Attal N, Laurent B, Touboul C (2008) Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* 136:380-387.
57. Bowers BJ, Collins AC, Tritto T, Wehner JM (2000) Mice lacking PKC gamma exhibit decreased anxiety. *Behav Genet* 30:111-121.
58. Bowers BJ, Elliott KJ, Wehner JM (2001) Differential sensitivity to the anxiolytic effects of ethanol and flunitrazepam in PKCgamma null mutant mice. *Pharmacol Biochem Behav* 69:99-110.
59. Bowers BJ, Wehner JM (2001) Ethanol consumption and behavioral impulsivity are increased in protein kinase C gamma null mutant mice. *J Neurosci* 21:RC180.

60. Bowles WR, Withrow JC, Lepinski AM, Hargreaves KM (2003) Tissue levels of immunoreactive substance P are increased in patients with irreversible pulpitis. *J Endod* 29:265-267.
61. Boyden ES (2011) A history of optogenetics: the development of tools for controlling brain circuits with light. *F1000 Biol Rep* 3:11.
62. Braz JM, Nassar MA, Wood JN, Basbaum AI (2005) Parallel "pain" pathways arise from subpopulations of primary afferent nociceptor. *Neuron* 47:787-793.
63. Brisben AJ, Hsiao SS, Johnson KO (1999) Detection of vibration transmitted through an object grasped in the hand. *J Neurophysiol* 81:1548-1558.
64. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS (2004) Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C817-C833.
65. Brown AG (1982) The dorsal horn of the spinal cord. *Q J Exp Physiol* 67:193-212.
66. Burgess SE, Gardell LR, Ossipov MH, Malan TP, Jr., Vanderah TW, Lai J, Porreca F (2002) Time-dependent descending facilitation from the rostral ventromedial medulla maintains, but does not initiate, neuropathic pain. *J Neurosci* 22:5129-5136.
67. Burstein R, Dado RJ, Cliffer KD, Giesler GJ, Jr. (1991) Physiological characterization of spinothalamic tract neurons in the lumbar enlargement of rats. *J Neurophysiol* 66:261-284.
68. Burstein R, Falkowsky O, Borsook D, Strassman A (1996) Distinct lateral and medial projections of the spinothalamic tract of the rat. *J Comp Neurol* 373:549-574.
69. Byers MR, Narhi MV (1999) Dental injury models: experimental tools for understanding neuroinflammatory interactions and polymodal nociceptor functions. *Crit Rev Oral Biol Med* 10:4-39.
70. Campbell JN, Raja SN, Meyer RA, Mackinnon SE (1988) Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury. *Pain* 32:89-94.
71. Campbell RL, Parks KW, Dodds RN (1990) Chronic facial pain associated with endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 69:287-290.
72. Cancedda L, Putignano E, Impey S, Maffei L, Ratto GM, Pizzorusso T (2003) Patterned vision causes CRE-mediated gene expression in the visual cortex through PKA and ERK. *J Neurosci* 23:7012-7020.
73. Cao J, Yang X, Liu YN, Suo ZW, Shi L, Zheng CR, Yang HB, Li S, Hu XD (2011) GABAergic disinhibition induced pain hypersensitivity by upregulating NMDA receptor functions in spinal dorsal horn. *Neuropharmacology* 60:921-929.
74. Carmichael FA, McGowan DA (1992) Incidence of nerve damage following third molar removal: a West of Scotland Oral Surgery Research Group study. *Br J Oral Maxillofac Surg* 30:78-82.
75. Carvalho AL, Duarte CB, Carvalho AP (2000) Regulation of AMPA receptors by phosphorylation. *Neurochem Res* 25:1245-1255.

76. Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288:306-313.
77. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824.
78. Celerier E, Simonnet G, Maldonado R (2004) Prevention of fentanyl-induced delayed pronociceptive effects in mice lacking the protein kinase Cgamma gene. *Neuropharmacology* 46:264-272.
79. Cesare P, Dekker LV, Sardini A, Parker PJ, McNaughton PA (1999) Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. *Neuron* 23:617-624.
80. Chalfie M (2009) Neurosensory mechanotransduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:44-52.
81. Chang YW, Tan A, Saab C, Waxman S (2010) Unilateral focal burn injury is followed by long-lasting bilateral allodynia and neuronal hyperexcitability in spinal cord dorsal horn. *J Pain* 11:119-130.
82. Chen C, Kano M, Abeliovich A, Chen L, Bao S, Kim JJ, Hashimoto K, Thompson RF, Tonegawa S (1995) Impaired motor coordination correlates with persistent multiple climbing fiber innervation in PKC gamma mutant mice. *Cell* 83:1233-1242.
83. Chen L, Huang LY (1991) Sustained potentiation of NMDA receptor-mediated glutamate responses through activation of protein kinase C by a mu opioid. *Neuron* 7:319-326.
84. Chen Y, Willcockson HH, Valtschanoff JG (2009) Influence of the vanilloid receptor TRPV1 on the activation of spinal cord glia in mouse models of pain. *Exp Neurol* 220:383-390.
85. Cheng HT, Suzuki M, Hegarty DM, Xu Q, Weyerbacher AR, South SM, Ohata M, Inturrisi CE (2008) Inflammatory pain-induced signaling events following a conditional deletion of the N-methyl-D-aspartate receptor in spinal cord dorsal horn. *Neuroscience* 155:948-958.
86. Cheshire WP, Jr. (2002) Defining the role for gabapentin in the treatment of trigeminal neuralgia: a retrospective study. *J Pain* 3:137-142.
87. Cheung LK, Lo J (2002) The long-term clinical morbidity of mandibular step osteotomy. *Int J Adult Orthodon Orthognath Surg* 17:283-290.
88. Chiang CY, Hu B, Hu JW, Dostrovsky JO, Sessle BJ (2002) Central sensitization of nociceptive neurons in trigeminal subnucleus oralis depends on integrity of subnucleus caudalis. *J Neurophysiol* 88:256-264.
89. Chichorro JG, Zampronio AR, Cabrini DA, Franco CR, Rae GA (2009) Mechanisms operated by endothelin ETA and ETB receptors in the trigeminal ganglion contribute to orofacial thermal hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction in rats. *Neuropeptides* 43:133-142.
90. Choi DS, Messing RO (2003) Animal models in the study of protein kinase C isozymes. *Methods Mol Biol* 233:455-473.

91. Codazzi F, Di Cesare A, Chiulli N, Albanese A, Meyer T, Zacchetti D, Grohovaz F (2006) Synergistic control of protein kinase C activity by ionotropic and metabotropic glutamate receptor inputs in hippocampal neurons. *J Neurosci* 26:3404-3411.
92. Coggeshall RE (2005) Fos, nociception and the dorsal horn. *Prog Neurobiol* 77:299-352.
93. Collins DF, Prochazka A (1996) Movement illusions evoked by ensemble cutaneous input from the dorsum of the human hand. *J Physiol* 496 ( Pt 3):857-871.
94. Conn PJ, Pin JP (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:205-237.
95. Cooper SA, Desjardins PJ (2010) The value of the dental impaction pain model in drug development. *Methods Mol Biol* 617:175-190.
96. Cordero-Erausquin M, Coull JA, Boudreau D, Rolland M, De Koninck Y (2005) Differential maturation of GABA action and anion reversal potential in spinal lamina I neurons: impact of chloride extrusion capacity. *J Neurosci* 25:9613-9623.
97. Coste B, Xiao B, Santos JS, Syeda R, Grandl J, Spencer KS, Kim SE, Schmidt M, Mathur J, Dubin AE, Montal M, Patapoutian A (2012) Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. *Nature* 483:176-181.
98. Costigan M, Scholz J, Woolf CJ (2009) Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci* 32:1-32.
99. Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y (2005) BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438:1017-1021.
100. Coull JA, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sik A, De Koninck P, De Koninck Y (2003) Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 424:938-942.
101. Coussens L, Parker PJ, Rhee L, Yang-Feng TL, Chen E, Waterfield MD, Francke U, Ullrich A (1986) Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science* 233:859-866.
102. Coyle DE (1998) Partial peripheral nerve injury leads to activation of astroglia and microglia which parallels the development of allodynic behavior. *Glia* 23:75-83.
103. Craig AD (1996) An ascending general homeostatic afferent pathway originating in lamina I. *Prog Brain Res* 107:225-242.
104. Craig AD (2003a) A new view of pain as a homeostatic emotion. *Trends Neurosci* 26:303-307.
105. Craig AD (2003b) Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Curr Opin Neurobiol* 13:500-505.
106. Craig AD (2003c) Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing. *Annu Rev Neurosci* 26:1-30.
107. Craig AD, Andrew D (2002) Responses of spinothalamic lamina I neurons to repeated brief contact heat stimulation in the cat. *J Neurophysiol* 87:1902-1914.

108. Craig AD, Dostrovsky JO (2001) Differential projections of thermoreceptive and nociceptive lamina I trigeminothalamic and spinothalamic neurons in the cat. *J Neurophysiol* 86:856-870.
109. Craig AD, Krout K, Andrew D (2001) Quantitative response characteristics of thermoreceptive and nociceptive lamina I spinothalamic neurons in the cat. *J Neurophysiol* 86:1459-1480.
110. Crissman RS, Sodeman T, Denton AM, Warden RJ, Siciliano DA, Rhoades RW (1996) Organization of primary afferent axons in the trigeminal sensory root and tract of the rat. *J Comp Neurol* 364:169-183.
111. Cruccu G, Biasiotta A, Di Rezze S, Fiorelli M, Galeotti F, Innocenti P, Mameli S, Millefiorini E, Truini A (2009) Trigeminal neuralgia and pain related to multiple sclerosis. *Pain* 143:186-191.
112. Cruz CD, Avelino A, McMahon SB, Cruz F (2005a) Increased spinal cord phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases mediates micturition overactivity in rats with chronic bladder inflammation. *Eur J Neurosci* 21:773-781.
113. Cruz CD, Neto FL, Castro-Lopes J, McMahon SB, Cruz F (2005b) Inhibition of ERK phosphorylation decreases nociceptive behaviour in monoarthritic rats. *Pain* 116:411-419.
114. Cui W, Li Y, Li S, Yang W, Jiang J, Han S, Li J (2009) Systemic lidocaine inhibits remifentanyl-induced hyperalgesia via the inhibition of cPKC $\gamma$  membrane translocation in spinal dorsal horn of rats. *J Neurosurg Anesthesiol* 21:318-325.
115. Cury Y, Picolo G, Gutierrez VP, Ferreira SH (2011) Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric Oxide* 25:243-254.
116. Dallel R (2010) Antalgiques. In: *Médecine buccale* pp 1-13. Paris.
117. Dallel R, Clavelou P, Woda A (1989) Effects of tractotomy on nociceptive reactions induced by tooth pulp stimulation in the rat. *Exp Neurol* 106:78-84.
118. 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* 11:31-40.
119. 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* 18:3529-3536.
120. Dallel R, Villanueva L, Woda A, Voisin D (2003) [Neurobiology of trigeminal pain]. *Med Sci (Paris)* 19:567-574.
121. Dallel R, Voisin D (2001) Towards a pain treatment based on the identification of the pain-generating mechanisms? *Eur Neurol* 45:126-132.
122. Danziger N, Willer JC (2009) [Congenital insensitivity to pain]. *Rev Neurol (Paris)* 165:129-136.
123. Darwin C (1872) *The Expression of the Emotions in Man and Animals*. London.
124. DaSilva AF, DosSantos MF (2012) The role of sensory fiber demography in trigeminal and postherpetic neuralgias. *J Dent Res* 91:17-24.



125. Davis KD, Dostrovsky JO (1988) Effect of trigeminal subnucleus caudalis cold block on the cerebrovascular-evoked responses of rostral trigeminal complex neurons. *Neurosci Lett* 94:303-308.
126. De Broucker T, Cesaro P, Willer JC, Le Bars D (1990) Diffuse noxious inhibitory controls in man. Involvement of the spinoreticular tract. *Brain* 113 ( Pt 4):1223-1234.
127. De Felice M, Sanoja R, Wang R, Vera-Portocarrero L, Oyarzo J, King T, Ossipov MH, Vanderah TW, Lai J, Dussor GO, Fields HL, Price TJ, Porreca F (2011) Engagement of descending inhibition from the rostral ventromedial medulla protects against chronic neuropathic pain. *Pain* 152:2701-2709.
128. De Koninck Y (2007) Altered chloride homeostasis in neurological disorders: a new target. *Curr Opin Pharmacol* 7:93-99.
129. Derjean D, Bertrand S, Le Masson G, Landry M, Morisset V, Nagy F (2003) Dynamic balance of metabotropic inputs causes dorsal horn neurons to switch functional states. *Nat Neurosci* 6:274-281.
130. Derry C, Derry S, Moore RA, McQuay HJ (2009a) Single dose oral ibuprofen for acute postoperative pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev* CD001548.
131. Derry S, Lloyd R, Moore RA, McQuay HJ (2009b) Topical capsaicin for chronic neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev* CD007393.
132. Deval E, Gasull X, Noel J, Salinas M, Baron A, Diochot S, Lingueglia E (2010) Acid-sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain. *Pharmacol Ther* 128:549-558.
133. Devor M (2009) Ectopic discharge in Abeta afferents as a source of neuropathic pain. *Exp Brain Res* 196:115-128.
134. Dhaka A, Viswanath V, Patapoutian A (2006) Trp ion channels and temperature sensation. *Annu Rev Neurosci* 29:135-161.
135. Di Cesare ML, Ghelardini C, Toscano A, Pacini A, Bartolini A (2010) The neuropathy-protective agent acetyl-L-carnitine activates protein kinase C-gamma and MAPKs in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience* 165:1345-1352.
136. Dickenson AH, Sullivan AF (1986) Electrophysiological studies on the effects of intrathecal morphine on nociceptive neurones in the rat dorsal horn. *Pain* 24:211-222.
137. Dieleman JP, Kerklaan J, Huygen FJ, Bouma PA, Sturkenboom MC (2008) Incidence rates and treatment of neuropathic pain conditions in the general population. *Pain* 137:681-688.
138. Ding YQ, Xiang CX, Chen ZF (2005) Generation and characterization of the PKC gamma-Cre mouse line. *Genesis* 43:28-33.
139. Dionne RA, Gordon SM, Rowan J, Kent A, Brahim JS (2003) Dexamethasone suppresses peripheral prostanoid levels without analgesia in a clinical model of acute inflammation. *J Oral Maxillofac Surg* 61:997-1003.
140. Doly S, Madeira A, Fischer J, Brisorgueil MJ, Daval G, Bernard R, Verge D, Conrath M (2004) The 5-HT<sub>2A</sub> receptor is widely distributed in the rat spinal cord and mainly localized at the plasma membrane of postsynaptic neurons. *J Comp Neurol* 472:496-511.

141. Dong X, Han S, Zylka MJ, Simon MI, Anderson DJ (2001) A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell* 106:619-632.
142. Dosemeci A, Makusky AJ, Jankowska-Stephens E, Yang X, Slotta DJ, Markey SP (2007) Composition of the synaptic PSD-95 complex. *Mol Cell Proteomics* 6:1749-1760.
143. Dostrovsky JO (2000) Role of thalamus in pain. *Prog Brain Res* 129:245-257.
144. Dostrovsky JO, Craig AD (2006) Ascending projection systems. In: Wall and Malzack's *Textbook of Pain* (McMahon SB, Koltzenburg M, eds), pp 187-203. London: ELSEVIER.
145. Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95.
146. Dubin AE, Schmidt M, Mathur J, Petrus MJ, Xiao B, Coste B, Patapoutian A (2012) Inflammatory Signals Enhance Piezo2-Mediated Mechanosensitive Currents. *Cell Rep*.
147. Dubuisson D, Dennis SG (1977) The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4:161-174.
148. Duggan AW, Hall JG, Headley PM (1976) Morphine, enkephalin and the substantia gelatinosa. *Nature* 264:456-458.
149. Durbec P, Marcos-Gutierrez CV, Kilkenny C, Grigoriou M, Wartiovaara K, Suvanto P, Smith D, Ponder B, Costantini F, Saarma M, . (1996) GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature* 381:789-793.
150. Eaton MJ, Plunkett JA, Karmally S, Martinez MA, Montanez K (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* 16:57-72.
151. Edin BB, Johansson N (1995) Skin strain patterns provide kinaesthetic information to the human central nervous system. *J Physiol* 487 ( Pt 1):243-251.
152. Eisenberg E, McNicol ED, Carr DB (2006) Efficacy of mu-opioid agonists in the treatment of evoked neuropathic pain: Systematic review of randomized controlled trials. *Eur J Pain* 10:667-676.
153. Falace DA, Reid K, Rayens MK (1996) The influence of deep (odontogenic) pain intensity, quality, and duration on the incidence and characteristics of referred orofacial pain. *J Orofac Pain* 10:232-239.
154. Fan W, Huang F, Wu Z, Zhu X, Li D, He H (2012) The role of nitric oxide in orofacial pain. *Nitric Oxide* 26:32-37.
155. Ferrini F, Salio C, Lossi L, Gambino G, Merighi A (2010) Modulation of inhibitory neurotransmission by the vanilloid receptor type 1 (TRPV1) in organotypically cultured mouse substantia gelatinosa neurons. *Pain* 150:128-140.
156. Ferrini F, Salio C, Vergnano AM, Merighi A (2007) Vanilloid receptor-1 (TRPV1)-dependent activation of inhibitory neurotransmission in spinal substantia gelatinosa neurons of mouse. *Pain* 129:195-209.

157. Field MJ, Bramwell S, Hughes J, Singh L (1999a) Detection of static and dynamic components of mechanical allodynia in rat models of neuropathic pain: are they signalled by distinct primary sensory neurones? *Pain* 83:303-311.
158. Field MJ, McCleary S, Hughes J, Singh L (1999b) Gabapentin and pregabalin, but not morphine and amitriptyline, block both static and dynamic components of mechanical allodynia induced by streptozocin in the rat. *Pain* 80:391-398.
159. Fields H (2004) State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci* 5:565-575.
160. Fields HL, Basbaum AI, Heinricher MM (2006) Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: Wall and Melzack's Textbook of Pain (McMahon SB, Koltzenburg M, eds), pp 125-142. London: ELSEVIER.
161. Fields HL, Malick A, Burstein R (1995) Dorsal horn projection targets of ON and OFF cells in the rostral ventromedial medulla. *J Neurophysiol* 74:1742-1759.
162. Finnerup NB, Sindrup SH, Jensen TS (2010) The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. *Pain* 150:573-581.
163. Fontaine B, Lyon-Caen O (1995) [Trigeminal neuralgia. Diagnosis]. *Rev Prat* 45:999-1000.
164. Foreman RD (2000) Integration of viscerosomatic sensory input at the spinal level. *Prog Brain Res* 122:209-221.
165. Fuchs PN, Campbell JN, Meyer RA (2000) Secondary hyperalgesia persists in capsaicin desensitized skin. *Pain* 84:141-149.
166. Furuta S, Shimizu T, Narita M, Matsumoto K, Kuzumaki N, Horie S, Suzuki T, Narita M (2009) Subdiaphragmatic vagotomy promotes nociceptive sensitivity of deep tissue in rats. *Neuroscience* 164:1252-1262.
167. Galeotti N, Stefano GB, Guarna M, Bianchi E, Ghelardini C (2006) Signaling pathway of morphine induced acute thermal hyperalgesia in mice. *Pain* 123:294-305.
168. Gao X, Kim HK, Chung JM, Chung K (2007) Reactive oxygen species (ROS) are involved in enhancement of NMDA-receptor phosphorylation in animal models of pain. *Pain* 131:262-271.
169. Gao YJ, Ji RR (2010) Light touch induces ERK activation in superficial dorsal horn neurons after inflammation: involvement of spinal astrocytes and JNK signaling in touch-evoked central sensitization and mechanical allodynia. *J Neurochem* 115:505-514.
170. Gardell LR, Ibrahim M, Wang R, Wang Z, Ossipov MH, Malan TP, Jr., Porreca F, Lai J (2004) Mouse strains that lack spinal dynorphin upregulation after peripheral nerve injury do not develop neuropathic pain. *Neuroscience* 123:43-52.
171. Gauriau C, Bernard JF (2002) Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp Physiol* 87:251-258.
172. Gauriau C, Bernard JF (2004) A comparative reappraisal of projections from the superficial laminae of the dorsal horn in the rat: the forebrain. *J Comp Neurol* 468:24-56.
173. Geffeney SL, Goodman MB (2012) How we feel: ion channel partnerships that detect mechanical inputs and give rise to touch and pain perception. *Neuron* 74:609-619.

174. Gerard MW (1923) AFFERENT IMPULSES OF THE TRIGEMINAL NERVE THE INTRAMEDULLARY COURSE OF THE PAINFUL, THERMAL AND TACTILE IMPULSES. *Archives of Neurology and Psychiatry* 9:306-338.
175. Glaum SR, Miller RJ, Hammond DL (1994) Inhibitory actions of delta 1-, delta 2-, and mu-opioid receptor agonists on excitatory transmission in lamina II neurons of adult rat spinal cord. *J Neurosci* 14:4965-4971.
176. Gobel S (1975) Golgi studies in the substantia gelatinosa neurons in the spinal trigeminal nucleus. *J Comp Neurol* 162:397-415.
177. Gobel S (1978) Golgi studies of the neurons in layer II of the dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis). *J Comp Neurol* 180:395-413.
178. Gonzalez MI, Field MJ, Hughes J, Singh L (2000) Evaluation of selective NK(1) receptor antagonist CI-1021 in animal models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 294:444-450.
179. Gordon SM, Brahim JS, Dubner R, McCullagh LM, Sang C, Dionne RA (2002a) Attenuation of pain in a randomized trial by suppression of peripheral nociceptive activity in the immediate postoperative period. *Anesth Analg* 95:1351-7, table.
180. Gordon SM, Brahim JS, Rowan J, Kent A, Dionne RA (2002b) Peripheral prostanoid levels and nonsteroidal anti-inflammatory drug analgesia: replicate clinical trials in a tissue injury model. *Clin Pharmacol Ther* 72:175-183.
181. Gordon SM, Dionne RA, Brahim J, Jabir F, Dubner R (1997) Blockade of peripheral neuronal barrage reduces postoperative pain. *Pain* 70:209-215.
182. Gosselin RD, Suter MR, Ji RR, Decosterd I (2010) Glial cells and chronic pain. *Neuroscientist* 16:519-531.
183. Gracely RH, Dubner R, Wolskee PJ, Deeter WR (1983) Placebo and naloxone can alter post-surgical pain by separate mechanisms. *Nature* 306:264-265.
184. Graham BA, Brichta AM, Callister RJ (2007) Moving from an averaged to specific view of spinal cord pain processing circuits. *J Neurophysiol* 98:1057-1063.
185. Graham SH, Sharp FR, Dillon W (1988) Intraoral sensation in patients with brainstem lesions: role of the rostral spinal trigeminal nuclei in pons. *Neurology* 38:1529-1533.
186. Granados-Soto V, Kalcheva I, Hua X, Newton A, Yaksh TL (2000) Spinal PKC activity and expression: role in tolerance produced by continuous spinal morphine infusion. *Pain* 85:395-404.
187. Greenwood LF, Sessle BJ (1976) Inputs to trigeminal brain stem neurones from facial, oral, tooth pulp and pharyngolaryngeal tissues: II. Role of trigeminal nucleus caudalis in modulating responses to innocuous and noxious stimuli. *Brain Res* 117:227-238.
188. Gregg JM (2000) Neuropathic complications of mandibular implant surgery: review and case presentations. *Ann R Australas Coll Dent Surg* 15:176-180.
189. Groc L, Bard L, Choquet D (2009) Surface trafficking of N-methyl-D-aspartate receptors: physiological and pathological perspectives. *Neuroscience* 158:4-18.

190. Groc L, Heine M, Cognet L, Brickley K, Stephenson FA, Lounis B, Choquet D (2004) Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nat Neurosci* 7:695-696.
191. Grudt TJ, Perl ER (2002) Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *J Physiol* 540:189-207.
192. Grudt TJ, Williams JT (1994) mu-Opioid agonists inhibit spinal trigeminal substantia gelatinosa neurons in guinea pig and rat. *J Neurosci* 14:1646-1654.
193. Grushka M, Sessle BJ (1984) Applicability of the McGill Pain Questionnaire to the differentiation of 'toothache' pain. *Pain* 19:49-57.
194. Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X, Elde R (1999) Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci* 11:946-958.
195. Guy N, Chalus M, Dallel R, Voisin DL (2005) Both oral and caudal parts of the spinal trigeminal nucleus project to the somatosensory thalamus in the rat. *Eur J Neurosci* 21:741-754.
196. Gwak YS, Hulsebosch CE (2011) GABA and central neuropathic pain following spinal cord injury. *Neuropharmacology* 60:799-808.
197. Hallas BH, Jacquin MF (1990) Structure-function relationships in rat brain stem subnucleus interparalis. IX. Inputs from subnucleus caudalis. *J Neurophysiol* 64:28-45.
198. Han SB, Kim H, Skuba A, Tessler A, Ferguson T, Son YJ (2012) Sensory Axon Regeneration: A Review from an in vivo Imaging Perspective. *Exp Neurobiol* 21:83-93.
199. Han ZS, Zhang ET, Craig AD (1998) Nociceptive and thermoreceptive lamina I neurons are anatomically distinct. *Nat Neurosci* 1:218-225.
200. Handwerker HO, Kilo S, Reeh PW (1991) Unresponsive afferent nerve fibres in the sural nerve of the rat. *J Physiol* 435:229-242.
201. Hanisch UK (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40:140-155.
202. Hao S, Mata M, Wolfe D, Huang S, Glorioso JC, Fink DJ (2005) Gene transfer of glutamic acid decarboxylase reduces neuropathic pain. *Ann Neurol* 57:914-918.
203. Hardy DG, Rhoton AL, Jr. (1978) Microsurgical relationships of the superior cerebellar artery and the trigeminal nerve. *J Neurosurg* 49:669-678.
204. Hargreaves KM (2011) Orofacial pain. *Pain* 152:S25-S32.
205. Hargreaves KM, Costello A (1990) Glucocorticoids suppress levels of immunoreactive bradykinin in inflamed tissue as evaluated by microdialysis probes. *Clin Pharmacol Ther* 48:168-178.
206. Hargreaves KM, Dionne RA, Mueller GP, Goldstein DS, Dubner R (1986) Naloxone, fentanyl, and diazepam modify plasma beta-endorphin levels during surgery. *Clin Pharmacol Ther* 40:165-171.

207. Harris RA, McQuilkin SJ, Paylor R, Abeliovich A, Tonegawa S, Wehner JM (1995) Mutant mice lacking the gamma isoform of protein kinase C show decreased behavioral actions of ethanol and altered function of gamma-aminobutyrate type A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3658-3662.
208. Hashimoto T, Ase K, Sawamura S, Kikkawa U, Saito N, Tanaka C, Nishizuka Y (1988) Postnatal development of a brain-specific subspecies of protein kinase C in rat. *J Neurosci* 8:1678-1683.
209. Haydon PG (2001) GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2:185-193.
210. Heinke B, Ruscheweyh R, Forsthuber L, Wunderbaldinger G, Sandkuhler J (2004) Physiological, neurochemical and morphological properties of a subgroup of GABAergic spinal lamina II neurones identified by expression of green fluorescent protein in mice. *J Physiol* 560:249-266.
211. Heinricher MM, Morgan MM, Tortorici V, Fields HL (1994) Disinhibition of off-cells and antinociception produced by an opioid action within the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience* 63:279-288.
212. Henry MA, Luo S, Foley BD, Rzasa RS, Johnson LR, Levinson SR (2009) Sodium channel expression and localization at demyelinated sites in painful human dental pulp. *J Pain* 10:750-758.
213. Hillman P, Wall PD (1969) Inhibitory and excitatory factors influencing the receptive fields of lamina 5 spinal cord cells. *Exp Brain Res* 9:284-306.
214. Hirata H, Okamoto K, Bereiter DA (2003) GABA(A) receptor activation modulates corneal unit activity in rostral and caudal portions of trigeminal subnucleus caudalis. *J Neurophysiol* 90:2837-2849.
215. Hofbauer RK, Rainville P, Duncan GH, Bushnell MC (2001) Cortical representation of the sensory dimension of pain. *J Neurophysiol* 86:402-411.
216. Honore P, Rogers SD, Schwei MJ, Salak-Johnson JL, Luger NM, Sabino MC, Clohisy DR, Mantyh PW (2000) Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons. *Neuroscience* 98:585-598.
217. Hu HJ, Gereau RW (2011) Metabotropic glutamate receptor 5 regulates excitability and Kv4.2-containing K(+) channels primarily in excitatory neurons of the spinal dorsal horn. *J Neurophysiol* 105:3010-3021.
218. Huang FL, Young WS, III, Yoshida Y, Huang KP (1990) Developmental expression of protein kinase C isozymes in rat cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* 52:121-130.
219. Huang HY, Cheng JK, Shih YH, Chen PH, Wang CL, Tsaor ML (2005) Expression of A-type K channel alpha subunits Kv 4.2 and Kv 4.3 in rat spinal lamina II excitatory interneurons and colocalization with pain-modulating molecules. *Eur J Neurosci* 22:1149-1157.
220. Huang J, Zhang X, McNaughton PA (2006) Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Curr Neuropharmacol* 4:197-206.

221. Huang YN, Tsai RY, Lin SL, Chien CC, Cherng CH, Wu CT, Yeh CC, Wong CS (2012) Amitriptyline attenuates astrocyte activation and morphine tolerance in rats: role of the PSD-95/NR1/nNOS/PKC $\gamma$  signaling pathway. *Behav Brain Res* 229:401-411.
222. Hucho T, Levine JD (2007) Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. *Neuron* 55:365-376.
223. Hughes AS, Averill S, King VR, Molander C, Shortland PJ (2008) Neurochemical characterization of neuronal populations expressing protein kinase C  $\gamma$  isoform in the spinal cord and gracile nucleus of the rat. *Neuroscience* 153:507-517.
224. Hughes DI, Scott DT, Riddell JS, Todd AJ (2007) Upregulation of substance P in low-threshold myelinated afferents is not required for tactile allodynia in the chronic constriction injury and spinal nerve ligation models. *J Neurosci* 27:2035-2044.
225. Hughes DI, Scott DT, Todd AJ, Riddell JS (2003) Lack of evidence for sprouting of A $\beta$  afferents into the superficial laminae of the spinal cord dorsal horn after nerve section. *J Neurosci* 23:9491-9499.
226. Hughes DI, Sikander S, Kinnon CM, Boyle KA, Watanabe M, Callister RJ, Graham B (2012) Morphological, neurochemical and electrophysiological features of parvalbumin-expressing cells: a likely source of axo-axonic inputs in the mouse spinal dorsal horn. *J Physiol*.
227. Huisman AM, Kuypers HG, Verburgh CA (1981) Quantitative differences in collateralization of the descending spinal pathways from red nucleus and other brain stem cell groups in rat as demonstrated with the multiple fluorescent retrograde tracer technique. *Brain Res* 209:271-286.
228. Hunt SP, Pini A, Evan G (1987) Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 328:632-634.
229. Hwang JH, Yaksh TL (1997) The effect of spinal GABA receptor agonists on tactile allodynia in a surgically-induced neuropathic pain model in the rat. *Pain* 70:15-22.
230. Ibi M, Matsuno K, Shiba D, Katsuyama M, Iwata K, Kakehi T, Nakagawa T, Sango K, Shirai Y, Yokoyama T, Kaneko S, Saito N, Yabe-Nishimura C (2008) Reactive oxygen species derived from NOX1/NADPH oxidase enhance inflammatory pain. *J Neurosci* 28:9486-9494.
231. Ibuki T, Hama AT, Wang XT, Pappas GD, Sagen J (1997) Loss of GABA-immunoreactivity in the spinal dorsal horn of rats with peripheral nerve injury and promotion of recovery by adrenal medullary grafts. *Neuroscience* 76:845-858.
232. Igwe OJ, Chronwall BM (2001) Hyperalgesia induced by peripheral inflammation is mediated by protein kinase C  $\beta$ II isozyme in the rat spinal cord. *Neuroscience* 104:875-890.
233. Im YB, Jee MK, Jung JS, Choi JI, Jang JH, Kang SK (2012) miR23b ameliorates neuropathic pain in spinal cord by silencing NADPH oxidase 4. *Antioxid Redox Signal* 16:1046-1060.
234. Impey S, Obrietan K, Storm DR (1999) Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. *Neuron* 23:11-14.
235. Inoue M, Rashid MH, Fujita R, Contos JJ, Chun J, Ueda H (2004) Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. *Nat Med* 10:712-718.

236. Janicki PK, Jeske-Janicka M (1999) Relevance of Nitric Oxide in Pain Mechanisms and Pain Management. In: Basic Science and others Topics and Pain pp 211-216.
237. Ji RR, Baba H, Brenner GJ, Woolf CJ (1999) Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nat Neurosci* 2:1114-1119.
238. Ji RR, Befort K, Brenner GJ, Woolf CJ (2002a) ERK MAP kinase activation in superficial spinal cord neurons induces prodynorphin and NK-1 upregulation and contributes to persistent inflammatory pain hypersensitivity. *J Neurosci* 22:478-485.
239. Ji RR, Gereau RW, Malcangio M, Strichartz GR (2009) MAP kinase and pain. *Brain Res Rev* 60:135-148.
240. Ji RR, Kawasaki Y, Zhuang ZY, Wen YR, Decosterd I (2006) Possible role of spinal astrocytes in maintaining chronic pain sensitization: review of current evidence with focus on bFGF/JNK pathway. *Neuron Glia Biol* 2:259-269.
241. Ji RR, Samad TA, Jin SX, Schmoll R, Woolf CJ (2002b) p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron* 36:57-68.
242. Ji RR, Suter MR (2007) p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. *Mol Pain* 3:33.
243. Jo YH, Schlichter R (1999) Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat Neurosci* 2:241-245.
244. Johansson RS, Westling G (1984) Roles of glabrous skin receptors and sensorimotor memory in automatic control of precision grip when lifting rougher or more slippery objects. *Exp Brain Res* 56:550-564.
245. Johnson KO (2001) The roles and functions of cutaneous mechanoreceptors. *Curr Opin Neurobiol* 11:455-461.
246. Johnson KO, Yoshioka T, Vega-Bermudez F (2000) Tactile functions of mechanoreceptive afferents innervating the hand. *J Clin Neurophysiol* 17:539-558.
247. Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Hogestatt ED, Meng ID, Julius D (2004) Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427:260-265.
248. Joshi SK, Hernandez G, Mikusa JP, Zhu CZ, Zhong C, Salyers A, Wismer CT, Chandran P, Decker MW, Honore P (2006) Comparison of antinociceptive actions of standard analgesics in attenuating capsaicin and nerve-injury-induced mechanical hypersensitivity. *Neuroscience* 143:587-596.
249. Juhl GI, Jensen TS, Norholt SE, Svensson P (2008) Central sensitization phenomena after third molar surgery: a quantitative sensory testing study. *Eur J Pain* 12:116-127.
250. Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413:203-210.
251. Kamsler A, Segal M (2003) Hydrogen peroxide modulation of synaptic plasticity. *J Neurosci* 23:269-276.



252. Kandel ER, Siegelbaum SA (2000) Synaptic Integration. In: PRINCIPLES OF NEURONAL SCIENCE (Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, eds), pp 207-228. McGraw-Hill Companies.
253. Kano M, Hashimoto K, Chen C, Abeliovich A, Aiba A, Kurihara H, Watanabe M, Inoue Y, Tonegawa S (1995) Impaired synapse elimination during cerebellar development in PKC gamma mutant mice. *Cell* 83:1223-1231.
254. Karim F, Hu HJ, Adwanikar H, Kaplan D, Gereau RW (2006) Impaired inflammatory pain and thermal hyperalgesia in mice expressing neuron-specific dominant negative mitogen activated protein kinase kinase (MEK). *Mol Pain* 2:2.
255. Karim F, Wang CC, Gereau RW (2001) Metabotropic glutamate receptor subtypes 1 and 5 are activators of extracellular signal-regulated kinase signaling required for inflammatory pain in mice. *J Neurosci* 21:3771-3779.
256. Katusic S, Beard CM, Bergstralh E, Kurland LT (1990) Incidence and clinical features of trigeminal neuralgia, Rochester, Minnesota, 1945-1984. *Ann Neurol* 27:89-95.
257. Kawasaki Y, Kohno T, Zhuang ZY, Brenner GJ, Wang H, Van Der MC, Befort K, Woolf CJ, Ji RR (2004) Ionotropic and metabotropic receptors, protein kinase A, protein kinase C, and Src contribute to C-fiber-induced ERK activation and cAMP response element-binding protein phosphorylation in dorsal horn neurons, leading to central sensitization. *J Neurosci* 24:8310-8321.
258. Kehlet H, Jensen TS, Woolf CJ (2006) Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention. *Lancet* 367:1618-1625.
259. Kelly JP (1985) Trigeminal System. In: PRINCIPLES OF NEURAL SCIENCE (Kandel ER, Schwartz JH, eds), pp 562-570. New York: Elsevier Science Publishing Co., Inc.
260. Kerr BJ, David S (2007) Pain behaviors after spinal cord contusion injury in two commonly used mouse strains. *Exp Neurol* 206:240-247.
261. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.
262. Khan AA, Owatz CB, Schindler WG, Schwartz SA, Keiser K, Hargreaves KM (2007) Measurement of mechanical allodynia and local anesthetic efficacy in patients with irreversible pulpitis and acute periradicular periodontitis. *J Endod* 33:796-799.
263. Khasar SG, Lin YH, Martin A, Dadgar J, McMahon T, Wang D, Hundle B, Aley KO, Isenberg W, McCarter G, Green PG, Hodge CW, Levine JD, Messing RO (1999) A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. *Neuron* 24:253-260.
264. Kielland A, Bochorishvili G, Corson J, Zhang L, Rosin DL, Heggelund P, Zhu JJ (2009) Activity patterns govern synapse-specific AMPA receptor trafficking between deliverable and synaptic pools. *Neuron* 62:84-101.
265. Kim H, Lee H, Rowan J, Brahim J, Dionne RA (2006) Genetic polymorphisms in monoamine neurotransmitter systems show only weak association with acute post-surgical pain in humans. *Mol Pain* 2:24.

266. Kim H, Ramsay E, Lee H, Wahl S, Dionne RA (2009) Genome-wide association study of acute post-surgical pain in humans. *Pharmacogenomics* 10:171-179.
267. Kim HK, Park SK, Zhou JL, Tagliabue G, Chung K, Coggeshall RE, Chung JM (2004) Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 111:116-124.
268. Kim HK, Schattschneider J, Lee I, Chung K, Baron R, Chung JM (2007) Prolonged maintenance of capsaicin-induced hyperalgesia by brief daily vibration stimuli. *Pain* 129:93-101.
269. Kim HY, Lee KY, Lu Y, Wang J, Cui L, Kim SJ, Chung JM, Chung K (2011) Mitochondrial Ca(2+) uptake is essential for synaptic plasticity in pain. *J Neurosci* 31:12982-12991.
270. Kim SE, Coste B, Chadha A, Cook B, Patapoutian A (2012a) The role of Drosophila Piezo in mechanical nociception. *Nature* 483:209-212.
271. Kim YH, Back SK, Davies AJ, Jeong H, Jo HJ, Chung G, Na HS, Bae YC, Kim SJ, Kim JS, Jung SJ, Oh SB (2012b) TRPV1 in GABAergic interneurons mediates neuropathic mechanical allodynia and disinhibition of the nociceptive circuitry in the spinal cord. *Neuron* 74:640-647.
272. Kimelberg HK (2004) The problem of astrocyte identity. *Neurochem Int* 45:191-202.
273. Kindt KS, Viswanath V, Macpherson L, Quast K, Hu H, Patapoutian A, Schafer WR (2007) *Caenorhabditis elegans* TRPA-1 functions in mechanosensation. *Nat Neurosci* 10:568-577.
274. Kissin I, Bright CA, Bradley EL, Jr. (2000) The effect of ketamine on opioid-induced acute tolerance: can it explain reduction of opioid consumption with ketamine-opioid analgesic combinations? *Anesth Analg* 91:1483-1488.
275. Klein R, Lamballe F, Bryant S, Barbacid M (1992) The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4. *Neuron* 8:947-956.
276. Klein R, Nanduri V, Jing SA, Lamballe F, Tapley P, Bryant S, Cordon-Cardo C, Jones KR, Reichardt LF, Barbacid M (1991) The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 66:395-403.
277. Knabl J, Witschi R, Hosl K, Reinold H, Zeilhofer UB, Ahmadi S, Brockhaus J, Sergejeva M, Hess A, Brune K, Fritschy JM, Rudolph U, Mohler H, Zeilhofer HU (2008) Reversal of pathological pain through specific spinal GABAA receptor subtypes. *Nature* 451:330-334.
278. Kofler K, Erdel M, Utermann G, Baier G (2002) Molecular genetics and structural genomics of the human protein kinase C gene module. *Genome Biol* 3:RESEARCH0014.
279. Koltzenburg M, Lundberg LE, Torebjork HE (1992) Dynamic and static components of mechanical hyperalgesia in human hairy skin. *Pain* 51:207-219.
280. Koopman JS, Dieleman JP, Huygen FJ, de Mos M, Martin CG, Sturkenboom MC (2009) Incidence of facial pain in the general population. *Pain* 147:122-127.
281. Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269:1737-1740.

282. Kose A, Ito A, Saito N, Tanaka C (1990) Electron microscopic localization of gamma- and beta II-subspecies of protein kinase C in rat hippocampus. *Brain Res* 518:209-217.
283. Kose A, Saito N, Ito H, Kikkawa U, Nishizuka Y, Tanaka C (1988) Electron microscopic localization of type I protein kinase C in rat Purkinje cells. *J Neurosci* 8:4262-4268.
284. Kress M, Koltzenburg M, Reeh PW, Handwerker HO (1992) Responsiveness and functional attributes of electrically localized terminals of cutaneous C-fibers in vivo and in vitro. *J Neurophysiol* 68:581-595.
285. Krishtal O (2003) The ASICs: signaling molecules? Modulators? *Trends Neurosci* 26:477-483.
286. Kuner R (2010) Central mechanisms of pathological pain. *Nat Med* 16:1258-1266.
287. Labombarda F, Coronel MF, Villar MJ, Nicola AF, Gonzalez SL (2008) Neuropathic pain and temporal expression of preprodynorphin, protein kinase C and N-methyl-D-aspartate receptor subunits after spinal cord injury. *Neurosci Lett* 447:115-119.
288. LaCroix-Fralish ML, Mogil JS (2009) Progress in genetic studies of pain and analgesia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49:97-121.
289. Lai HH, Qiu CS, Crock LW, Morales ME, Ness TJ, Gereau RW (2011) Activation of spinal extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2 is associated with the development of visceral hyperalgesia of the bladder. *Pain* 152:2117-2124.
290. LaMotte RH, Shain CN, Simone DA, Tsai EF (1991) Neurogenic hyperalgesia: psychophysical studies of underlying mechanisms. *J Neurophysiol* 66:190-211.
291. LaMotte RH, Thalhammer JG, Robinson CJ (1983) Peripheral neural correlates of magnitude of cutaneous pain and hyperalgesia: a comparison of neural events in monkey with sensory judgments in human. *J Neurophysiol* 50:1-26.
292. Lander HM (1997) An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J* 11:118-124.
293. Lapirot O, Chebbi R, Monconduit L, Artola A, Dallel R, Luccarini P (2009) NK1 receptor-expressing spinoparabrachial neurons trigger diffuse noxious inhibitory controls through lateral parabrachial activation in the male rat. *Pain* 142:245-254.
294. 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* 152:1821-1831.
295. Lariviere WR, Chesler EJ, Mogil JS (2001) Transgenic studies of pain and analgesia: mutation or background genotype? *J Pharmacol Exp Ther* 297:467-473.
296. Latremoliere A, Woolf CJ (2009) Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 10:895-926.
297. Lau CG, Zukin RS (2007) NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 8:413-426.
298. Lawson SN, Perry MJ, Prabhakar E, McCarthy PW (1993) Primary sensory neurones: neurofilament, neuropeptides, and conduction velocity. *Brain Res Bull* 30:239-243.

299. Le Bars D, Cadden SW (2008) What is a Wide-Dynamic-Range Cell? pp 331-338.
300. Le Bars D, Willer JC (2004) Physiologie de la douleur. *Anesthésie Réanimation* 1227-266.
301. Le Bars D, Willer JC (2008) Diffuse Noxious Inhibitory Controls (DNIC). pp 763-773.
302. Ledebroer A, Sloane EM, Milligan ED, Frank MG, Mahony JH, Maier SF, Watkins LR (2005) Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain* 115:71-83.
303. Lee I, Kim HK, Kim JH, Chung K, Chung JM (2007) The role of reactive oxygen species in capsaicin-induced mechanical hyperalgesia and in the activities of dorsal horn neurons. *Pain* 133:9-17.
304. Lee YS, Kim H, Wu TX, Wang XM, Dionne RA (2006) Genetically mediated interindividual variation in analgesic responses to cyclooxygenase inhibitory drugs. *Clin Pharmacol Ther* 79:407-418.
305. Lee YW, Chaplan SR, Yaksh TL (1995) Systemic and supraspinal, but not spinal, opiates suppress allodynia in a rat neuropathic pain model. *Neurosci Lett* 199:111-114.
306. Leitges M, Mayr M, Braun U, Mayr U, Li C, Pfister G, Ghaffari-Tabrizi N, Baier G, Hu Y, Xu Q (2001a) Exacerbated vein graft arteriosclerosis in protein kinase Cdelta-null mice. *J Clin Invest* 108:1505-1512.
307. Leitges M, Plomann M, Standaert ML, Bandyopadhyay G, Sajan MP, Kanoh Y, Farese RV (2002) Knockout of PKC alpha enhances insulin signaling through PI3K. *Mol Endocrinol* 16:847-858.
308. Leitges M, Sanz L, Martin P, Duran A, Braun U, Garcia JF, Camacho F, Diaz-Meco MT, Rennert PD, Moscat J (2001b) Targeted disruption of the zetaPKC gene results in the impairment of the NF-kappaB pathway. *Mol Cell* 8:771-780.
309. Leitges M, Schmedt C, Guinamard R, Davoust J, Schaal S, Stabel S, Tarakhovsky A (1996) Immunodeficiency in protein kinase Cbeta-deficient mice. *Science* 273:788-791.
310. Levine JD, Gordon NC, Fields HL (1978a) The mechanism of placebo analgesia. *Lancet* 2:654-657.
311. Levine JD, Gordon NC, Jones RT, Fields HL (1978b) The narcotic antagonist naloxone enhances clinical pain. *Nature* 272:826-827.
312. Lewen A, Matz P, Chan PH (2000) Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma* 17:871-890.
313. Lewin GR, Moshourab R (2004) Mechanosensation and pain. *J Neurobiol* 61:30-44.
314. Li HF, Mochly-Rosen D, Kendig JJ (2005) Protein kinase Cgamma mediates ethanol withdrawal hyper-responsiveness of NMDA receptor currents in spinal cord motor neurons. *Br J Pharmacol* 144:301-307.
315. Li JL, Li YQ, Nomura S, Kaneko T, Mizuno N (2001a) Protein kinase C gamma-like immunoreactivity in the substantia gelatinosa of the medullary dorsal horn of the rat. *Neurosci Lett* 311:185-188.

316. Li L, Rutlin M, Abaira VE, Cassidy C, Kus L, Gong S, Jankowski MP, Luo W, Heintz N, Koerber HR, Woodbury CJ, Ginty DD (2011) The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons. *Cell* 147:1615-1627.
317. Li P, Kerchner GA, Sala C, Wei F, Huettner JE, Sheng M, Zhuo M (1999a) AMPA receptor-PDZ interactions in facilitation of spinal sensory synapses. *Nat Neurosci* 2:972-977.
318. Li P, Wilding TJ, Kim SJ, Calejesan AA, Huettner JE, Zhuo M (1999b) Kainate-receptor-mediated sensory synaptic transmission in mammalian spinal cord. *Nature* 397:161-164.
319. Li YQ, Li H, Wei J, Qu L, Wu LA (2010) Expression changes of K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> co-transporter 2 and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> co-transporter1 in mouse trigeminal subnucleus caudalis following pulpal inflammation. *Brain Res Bull* 81:561-564.
320. Li YQ, Li JL, Li H, Kaneko T, Mizuno N (2001b) Protein kinase C gamma-like immunoreactivity of trigeminothalamic neurons in the medullary dorsal horn of the rat. *Brain Res* 913:159-164.
321. Liaw WJ, Zhang B, Tao F, Yaster M, Johns RA, Tao YX (2004) Knockdown of spinal cord postsynaptic density protein-95 prevents the development of morphine tolerance in rats. *Neuroscience* 123:11-15.
322. Liedtke W, Friedman JM (2003) Abnormal osmotic regulation in trpv4<sup>-/-</sup> mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13698-13703.
323. Light AR, Durkovic RG (1984) Features of laminar and somatotopic organization of lumbar spinal cord units receiving cutaneous inputs from hindlimb receptive fields. *J Neurophysiol* 52:449-458.
324. Light AR, Lee S (2008) *Spinal Cord Physiology of Nociception*. pp 311-330.
325. Light AR, Perl ER (1979) Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers. *J Comp Neurol* 186:133-150.
326. Light AR, Willcockson HH (1999) Spinal laminae I-II neurons in rat recorded in vivo in whole cell, tight seal configuration: properties and opioid responses. *J Neurophysiol* 82:3316-3326.
327. Lim G, Wang S, Zeng Q, Sung B, Yang L, Mao J (2005) Expression of spinal NMDA receptor and PKCgamma after chronic morphine is regulated by spinal glucocorticoid receptor. *J Neurosci* 25:11145-11154.
328. Lima D, Coimbra A (1986) A Golgi study of the neuronal population of the marginal zone (lamina I) of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 244:53-71.
329. Lingueglia E (2007) Acid-sensing ion channels in sensory perception. *J Biol Chem* 282:17325-17329.
330. Lipton JA, Ship JA, Larach-Robinson D (1993) Estimated prevalence and distribution of reported orofacial pain in the United States. *J Am Dent Assoc* 124:115-121.
331. Liu J, Wolfe D, Hao S, Huang S, Glorioso JC, Mata M, Fink DJ (2004) Peripherally delivered glutamic acid decarboxylase gene therapy for spinal cord injury pain. *Mol Ther* 10:57-66.

332. Liu JX, Tang YC, Liu Y, Tang FR (2008a) mGluR5-PLCbeta4-PKCbeta2/PKCgamma pathways in hippocampal CA1 pyramidal neurons in pilocarpine model of status epilepticus in mGluR5+/+ mice. *Epilepsy Res* 82:111-123.
333. Liu W, Liu Z, Liu L, Xiao Z, Cao X, Cao Z, Xue L, Miao L, He X, Li W (2008b) A novel human foamy virus mediated gene transfer of GAD67 reduces neuropathic pain following spinal cord injury. *Neurosci Lett* 432:13-18.
334. Lobb WK, Zakariassen KL, McGrath PJ (1996) Endodontic treatment outcomes: do patients perceive problems? *J Am Dent Assoc* 127:597-600.
335. Loeser JD, Melzack R (1999) Pain: an overview. *Lancet* 353:1607-1609.
336. Lorenz J, Garcia-Larrea L (2003) Contribution of attentional and cognitive factors to laser evoked brain potentials. *Neurophysiol Clin* 33:293-301.
337. 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.
338. Love S, Coakham HB (2001) Trigeminal neuralgia: pathology and pathogenesis. *Brain* 124:2347-2360.
339. Lovick TA (1996) Midbrain and medullary regulation of defensive cardiovascular functions. *Prog Brain Res* 107:301-313.
340. Lu Y, Perl ER (2005) Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II). *J Neurosci* 25:3900-3907.
341. Luo S, Perry GM, Levinson SR, Henry MA (2010) Pulpitis increases the proportion of atypical nodes of Ranvier in human dental pulp axons without a change in Nav1.6 sodium channel expression. *Neuroscience* 169:1881-1887.
342. Luo W, Enomoto H, Rice FL, Milbrandt J, Ginty DD (2009) Molecular identification of rapidly adapting mechanoreceptors and their developmental dependence on ret signaling. *Neuron* 64:841-856.
343. Lynch MA (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84:87-136.
344. Ma C, Donnelly DF, LaMotte RH (2010) In vivo visualization and functional characterization of primary somatic neurons. *J Neurosci Methods* 191:60-65.
345. Ma QP, Woolf CJ (1995) Noxious stimuli induce an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent hypersensitivity of the flexion withdrawal reflex to touch: implications for the treatment of mechanical allodynia. *Pain* 61:383-390.
346. Ma W, Quirion R (2001) Increased phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein (CREB) in the superficial dorsal horn neurons following partial sciatic nerve ligation. *Pain* 93:295-301.
347. Ma W, Zheng WH, Belanger S, Kar S, Quirion R (2001) Effects of amyloid peptides on cell viability and expression of neuropeptides in cultured rat dorsal root ganglion neurons: a role for free radicals and protein kinase C. *Eur J Neurosci* 13:1125-1135.

348. Macefield VG, Johansson RS (1996) Control of grip force during restraint of an object held between finger and thumb: responses of muscle and joint afferents from the digits. *Exp Brain Res* 108:172-184.
349. Maher P, Schubert D (2000) Signaling by reactive oxygen species in the nervous system. *Cell Mol Life Sci* 57:1287-1305.
350. Malan TP, Mata HP, Porreca F (2002) Spinal GABA(A) and GABA(B) receptor pharmacology in a rat model of neuropathic pain. *Anesthesiology* 96:1161-1167.
351. Malcangio M, Ramer MS, Jones MG, McMahon SB (2000) Abnormal substance P release from the spinal cord following injury to primary sensory neurons. *Eur J Neurosci* 12:397-399.
352. Malmberg AB, Brandon EP, Idzerda RL, Liu H, McKnight GS, Basbaum AI (1997a) Diminished inflammation and nociceptive pain with preservation of neuropathic pain in mice with a targeted mutation of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Neurosci* 17:7462-7470.
353. Malmberg AB, Chen C, Tonegawa S, Basbaum AI (1997b) Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKCgamma. *Science* 278:279-283.
354. Mandadi S, Tominaga T, Numazaki M, Murayama N, Saito N, Armati PJ, Roufogalis BD, Tominaga M (2006) Increased sensitivity of desensitized TRPV1 by PMA occurs through PKCepsilon-mediated phosphorylation at S800. *Pain* 123:106-116.
355. Mao J, Mayer DJ (2001) Spinal cord neuroplasticity following repeated opioid exposure and its relation to pathological pain. *Ann N Y Acad Sci* 933:175-184.
356. Mao J, Price DD, Mayer DJ (1995a) Mechanisms of hyperalgesia and morphine tolerance: a current view of their possible interactions. *Pain* 62:259-274.
357. Mao J, Price DD, Phillips LL, Lu J, Mayer DJ (1995b) Increases in protein kinase C gamma immunoreactivity in the spinal cord dorsal horn of rats with painful mononeuropathy. *Neurosci Lett* 198:75-78.
358. Mao J, Price DD, Phillips LL, Lu J, Mayer DJ (1995c) Increases in protein kinase C gamma immunoreactivity in the spinal cord of rats associated with tolerance to the analgesic effects of morphine. *Brain Res* 677:257-267.
359. 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* 88:1267-1274.
360. Martin WJ, Malmberg AB, Basbaum AI (2001) PKCgamma contributes to a subset of the NMDA-dependent spinal circuits that underlie injury-induced persistent pain. *J Neurosci* 21:5321-5327.
361. Martin YB, Malmierca E, Avendano C, Nunez A (2010) Neuronal disinhibition in the trigeminal nucleus caudalis in a model of chronic neuropathic pain. *Eur J Neurosci* 32:399-408.
362. Marvizon JC, Chen W, Murphy N (2009) Enkephalins, dynorphins, and beta-endorphin in the rat dorsal horn: an immunofluorescence colocalization study. *J Comp Neurol* 517:51-68.

363. Mason P (1997) Physiological identification of pontomedullary serotonergic neurons in the rat. *J Neurophysiol* 77:1087-1098.
364. Matsushita Y, Ishikawa M, Abe K, Utsunomiya I, Chikuma T, Hojo H, Hoshi K, Quock RM, Taguchi K (2007) Involvement of the protein kinase Cgamma isoform in development of tolerance to nitrous oxide-induced antinociception in mice. *Neuroscience* 148:541-547.
365. Maxwell DJ, Réthelyi M (1987) Ultrastructure and synaptic connections of cutaneous afferent fibres in the spinal cord. *Trends Neurosci* 10:117-123.
366. Maxwell DJ, Fyffe RE, Rethelyi M (1983) Morphological properties of physiologically characterized lamina III neurones in the cat spinal cord. *Neuroscience* 10:1-22.
367. Mayer DJ, Mao J, Holt J, Price DD (1999) Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7731-7736.
368. Mayer DJ, Mao J, Price DD (1995) The association of neuropathic pain, morphine tolerance and dependence, and the translocation of protein kinase C. *NIDA Res Monogr* 147:269-298.
369. Mayer DJ, Wolfle TL, Akil H, Carder B, Liebeskind JC (1971) Analgesia from electrical stimulation in the brainstem of the rat. *Science* 174:1351-1354.
370. Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB (1984) Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309:261-263.
371. McMahon SB, Cafferty WB, Marchand F (2005) Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Exp Neurol* 192:444-462.
372. McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM, Fanger CM (2007) TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13525-13530.
373. Mehlisch DR, Aspley S, Daniels SE, Southerden KA, Christensen KS (2010) A single-tablet fixed-dose combination of racemic ibuprofen/paracetamol in the management of moderate to severe postoperative dental pain in adult and adolescent patients: a multicenter, two-stage, randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled, factorial study. *Clin Ther* 32:1033-1049.
374. Melzack R, Wall PD (1965) Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150:971-979.
375. Meyer RA, Campbell JN (1981) Myelinated nociceptive afferents account for the hyperalgesia that follows a burn to the hand. *Science* 213:1527-1529.
376. Meyer RA, Davis KD, Cohen RH, Treede RD, Campbell JN (1991) Mechanically insensitive afferents (MIAs) in cutaneous nerves of monkey. *Brain Res* 561:252-261.
377. Meyer RA, Ringkamp M, Campbell JN, Raja SN (2006) Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In: Wall and Melzack's Textbook of Pain (McMahon SB, Koltzenburg M, eds), pp 3-34. London: ELSEVIER.
378. Mi R, Sia GM, Rosen K, Tang X, Moghekar A, Black JL, McEnery M, Haganir RL, O'Brien RJ (2004) AMPA receptor-dependent clustering of synaptic NMDA receptors is mediated by Stargazin and NR2A/B in spinal neurons and hippocampal interneurons. *Neuron* 44:335-349.



379. Miletic V, Bowen KK, Miletic G (2000) Loose ligation of the rat sciatic nerve is accompanied by changes in the subcellular content of protein kinase C beta II and gamma in the spinal dorsal horn. *Neurosci Lett* 288:199-202.
380. Millan MJ (1999) The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57:1-164.
381. Millan MJ (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66:355-474.
382. Miller JP, Acar F, Burchiel KJ (2009) Classification of trigeminal neuralgia: clinical, therapeutic, and prognostic implications in a series of 144 patients undergoing microvascular decompression. *J Neurosurg* 111:1231-1234.
383. Milligan ED, Watkins LR (2009) Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 10:23-36.
384. Miraucourt LS, Dallel R, Voisin DL (2007) Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through PKCgamma interneurons. *PLoS One* 2:e1116.
385. Miraucourt 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* 29:2519-2527.
386. Miraucourt LS, Peirs C, Dallel R, Voisin DL (2011) Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through astrocyte-derived D-serine. *Pain* 152:1340-1348.
387. Mochly-Rosen D, Basbaum AI, Koshland DE, Jr. (1987) Distinct cellular and regional localization of immunoreactive protein kinase C in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:4660-4664.
388. Mochly-Rosen D, Gordon AS (1998) Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB J* 12:35-42.
389. Montana M, Garcia DC, Lopez dJ, Gonzalez-Burguera I, Echeazarra L, Barrondo S, Salles J (2012) Cellular neurochemical characterization and subcellular localization of phospholipase C beta1 in rat brain. *Neuroscience* 222:239-268.
390. Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ (2002) Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci* 22:6724-6731.
391. Mori M, Kose A, Tsujino T, Tanaka C (1990) Immunocytochemical localization of protein kinase C subspecies in the rat spinal cord: light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 299:167-177.
392. Muraki K, Iwata Y, Katanosaka Y, Ito T, Ohya S, Shigekawa M, Imaizumi Y (2003) TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circ Res* 93:829-838.
393. Muscoli C, Mollace V, Wheatley J, Masini E, Ndengele M, Wang ZQ, Salvemini D (2004) Superoxide-mediated nitration of spinal manganese superoxide dismutase: a novel pathway in N-methyl-D-aspartate-mediated hyperalgesia. *Pain* 111:96-103.

394. Nagashima T, Tanabe H, Fujioka Y, Nagashima K, Hidaka H (1991) Immunohistochemical localization of protein kinase C isozymes in human cerebellum, hippocampus and spinal cord. *Acta Histochem Cytochem* 24:441-446.
395. Nagy GG, Watanabe M, Fukaya M, Todd AJ (2004) Synaptic distribution of the NR1, NR2A and NR2B subunits of the N-methyl-d-aspartate receptor in the rat lumbar spinal cord revealed with an antigen-unmasking technique. *Eur J Neurosci* 20:3301-3312.
396. Naim M, Spike RC, Watt C, Shehab SA, Todd AJ (1997) Cells in laminae III and IV of the rat spinal cord that possess the neurokinin-1 receptor and have dorsally directed dendrites receive a major synaptic input from tachykinin-containing primary afferents. *J Neurosci* 17:5536-5548.
397. Nakajima A, Tsuboi Y, Suzuki I, Honda K, Shinoda M, Kondo M, Matsuura S, Shibuta K, Yasuda M, Shimizu N, Iwata K (2011) PKCgamma in Vc and C1/C2 is involved in trigeminal neuropathic pain. *J Dent Res* 90:777-781.
398. Narikawa K, Furue H, Kumamoto E, Yoshimura M (2000) In vivo patch-clamp analysis of IPSCs evoked in rat substantia gelatinosa neurons by cutaneous mechanical stimulation. *J Neurophysiol* 84:2171-2174.
399. Narita M, Mizoguchi H, Narita M, Nagase H, Suzuki T, Tseng LF (2001) Involvement of spinal protein kinase Cgamma in the attenuation of opioid mu-receptor-mediated G-protein activation after chronic intrathecal administration of [D-Ala<sup>2</sup>,N-MePhe<sup>4</sup>,Gly-OI(5)]enkephalin. *J Neurosci* 21:3715-3720.
400. Narita M, Suzuki M, Narita M, Yajima Y, Suzuki R, Shioda S, Suzuki T (2004) Neuronal protein kinase C gamma-dependent proliferation and hypertrophy of spinal cord astrocytes following repeated in vivo administration of morphine. *Eur J Neurosci* 19:479-484.
401. Narita M, Yajima Y, Aoki T, Ozaki S, Mizoguchi H, Tseng LF, Suzuki T (2000) Up-regulation of the TrkB receptor in mice injured by the partial ligation of the sciatic nerve. *Eur J Pharmacol* 401:187-190.
402. Navez M, Creac'h C, Koenig M, Cathebras P, Laurent B (2005) [Primary and atypical facial pain: diagnosis and treatment]. *Rev Med Interne* 26:703-716.
403. Neubert MJ, Kincaid W, Heinricher MM (2004) Nociceptive facilitating neurons in the rostral ventromedial medulla. *Pain* 110:158-165.
404. Neumann S, Braz JM, Skinner K, Llewellyn-Smith IJ, Basbaum AI (2008) Innocuous, not noxious, input activates PKCgamma interneurons of the spinal dorsal horn via myelinated afferent fibers. *J Neurosci* 28:7936-7944.
405. Neumann S, Doubell TP, Leslie T, Woolf CJ (1996) Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurons. *Nature* 384:360-364.
406. New KC, Rabkin SD (1998) GABA synthesis in astrocytes after infection with defective herpes simplex virus vectors expressing glutamic acid decarboxylase 65 or 67. *J Neurochem* 71:2304-2312.
407. Nie H, Wang H, Zhang RX, Gao WC, Qiao JT (2004) Protein kinase C is partly involved in c-fos protein expression of nocuously-activated neurons but may not in concomitant modulatory action through opioid receptors at the spinal level in rats. *Sheng Li Xue Bao* 56:455-460.

408. Niikura K, Kobayashi Y, Okutsu D, Furuya M, Kawano K, Maitani Y, Suzuki T, Narita M (2008) Implication of spinal protein kinase C $\gamma$  isoform in activation of the mouse brain by intrathecal injection of the protein kinase C activator phorbol 12,13-dibutyrate using functional magnetic resonance imaging analysis. *Neurosci Lett* 433:6-10.
409. Nishimori T, Sera M, Suemune S, Yoshida A, Tsuru K, Tsuiki Y, Akisaka T, Okamoto T, Dateoka Y, Shigenaga Y (1986) The distribution of muscle primary afferents from the masseter nerve to the trigeminal sensory nuclei. *Brain Res* 372:375-381.
410. Nishizuka Y (1986) Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233:305-312.
411. Nitzan-Luques A, Devor M, Tal M (2011) Genotype-selective phenotypic switch in primary afferent neurons contributes to neuropathic pain. *Pain* 152:2413-2426.
412. Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, Tominaga M (2002) Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase C $\epsilon$  and identification of two target serine residues. *J Biol Chem* 277:13375-13378.
413. Ochoa JL, Yarnitsky D (1993) Mechanical hyperalgesias in neuropathic pain patients: dynamic and static subtypes. *Ann Neurol* 33:465-472.
414. Oh IH, Choi SK, Park BJ, Kim TS, Rhee BA, Lim YJ (2008) The Treatment Outcome of Elderly Patients with Idiopathic Trigeminal Neuralgia : Micro-Vascular Decompression versus Gamma Knife Radiosurgery. *J Korean Neurosurg Soc* 44:199-204.
415. Ohsawa M, Narita M, Mizoguchi H, Cheng E, Tseng LF (2001) Reduced hyperalgesia induced by nerve injury, but not by inflammation in mice lacking protein kinase C  $\gamma$  isoform. *Eur J Pharmacol* 429:157-160.
416. Okada-Ogawa A, Suzuki I, Sessle BJ, Chiang CY, Salter MW, Dostrovsky JO, Tsuboi Y, Kondo M, Kitagawa J, Kobayashi A, Noma N, Imamura Y, Iwata K (2009) Astroglia in medullary dorsal horn (trigeminal spinal subnucleus caudalis) are involved in trigeminal neuropathic pain mechanisms. *J Neurosci* 29:11161-11171.
417. Olah Z, Karai L, Iadarola MJ (2002) Protein kinase C( $\alpha$ ) is required for vanilloid receptor 1 activation. Evidence for multiple signaling pathways. *J Biol Chem* 277:35752-35759.
418. Olausson H, Wessberg J, Morrison I, McGlone F, Vallbo A (2010) The neurophysiology of unmyelinated tactile afferents. *Neurosci Biobehav Rev* 34:185-191.
419. Olszewski J (1950) On the anatomical and functional organization of the spinal trigeminal nucleus. *J Comp Neurol* 92:401-413.
420. Owatz CB, Khan AA, Schindler WG, Schwartz SA, Keiser K, Hargreaves KM (2007) The incidence of mechanical allodynia in patients with irreversible pulpitis. *J Endod* 33:552-556.
421. Oxman MN, et al. (2005) A vaccine to prevent herpes zoster and postherpetic neuralgia in older adults. *N Engl J Med* 352:2271-2284.
422. Pajot J, Pelissier T, Sierralta F, Raboisson P, Dallel R (2000) Differential effects of trigeminal tractotomy on Delta- and C-fiber-mediated nociceptive responses. *Brain Res* 863:289-292.
423. Pan YZ, Pan HL (2004) Primary afferent stimulation differentially potentiates excitatory and inhibitory inputs to spinal lamina II outer and inner neurons. *J Neurophysiol* 91:2413-2421.

424. Pang XY, Liu T, Jiang F, Ji YH (2008) Activation of spinal ERK signaling pathway contributes to pain-related responses induced by scorpion *Buthus martensi* Karch venom. *Toxicon* 51:994-1007.
425. Parada CA, Yeh JJ, Joseph EK, Levine JD (2003) Tumor necrosis factor receptor type-1 in sensory neurons contributes to induction of chronic enhancement of inflammatory hyperalgesia in rat. *Eur J Neurosci* 17:1847-1852.
426. Park ES, Gao X, Chung JM, Chung K (2006) Levels of mitochondrial reactive oxygen species increase in rat neuropathic spinal dorsal horn neurons. *Neurosci Lett* 391:108-111.
427. Park SS, Lee MK, Kim JW, Jung JY, Kim IS, Ghang CG (2008) Percutaneous balloon compression of trigeminal ganglion for the treatment of idiopathic trigeminal neuralgia : experience in 50 patients. *J Korean Neurosurg Soc* 43:186-189.
428. Parker PJ, Coussens L, Totty N, Rhee L, Young S, Chen E, Stabel S, Waterfield MD, Ullrich A (1986) The complete primary structure of protein kinase C--the major phorbol ester receptor. *Science* 233:853-859.
429. Patapoutian A, Peier AM, Story GM, Viswanath V (2003) ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci* 4:529-539.
430. Pato U, Sturzenegger M (2008) Algies faciales. *Forum Med Suisse* 8:336-340.
431. Piao ZG, Cho IH, Park CK, Hong JP, Choi SY, Lee SJ, Lee S, Park K, Kim JS, Oh SB (2006) Activation of glia and microglial p38 MAPK in medullary dorsal horn contributes to tactile hypersensitivity following trigeminal sensory nerve injury. *Pain* 121:219-231.
432. Pitcher MH, Ribeiro-da-Silva A, Coderre TJ (2007) Effects of inflammation on the ultrastructural localization of spinal cord dorsal horn group I metabotropic glutamate receptors. *J Comp Neurol* 505:412-423.
433. Plenderleith MB, Haller CJ, Snow PJ (1990) Peptide coexistence in axon terminals within the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *Synapse* 6:344-350.
434. Pogatzki EM, Zahn PK, Brennan TJ (2000) Effect of pretreatment with intrathecal excitatory amino acid receptor antagonists on the development of pain behavior caused by plantar incision. *Anesthesiology* 93:489-496.
435. Polgar E, Fowler JH, McGill MM, Todd AJ (1999a) The types of neuron which contain protein kinase C gamma in rat spinal cord. *Brain Res* 833:71-80.
436. 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* 139:687-697.
437. Polgar E, Gray S, Riddell JS, Todd AJ (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* 111:144-150.
438. Polgar E, Hughes DI, Arham AZ, Todd AJ (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* 25:6658-6666.

439. Polgar E, Hughes DI, Riddell JS, Maxwell DJ, Puskar Z, Todd AJ (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* 104:229-239.
440. Polgar E, Sardella TC, Watanabe M, Todd AJ (2011) Quantitative study of NPY-expressing GABAergic neurons and axons in rat spinal dorsal horn. *J Comp Neurol* 519:1007-1023.
441. Polgar E, Shehab SA, Watt C, Todd AJ (1999b) GABAergic neurons that contain neuropeptide Y selectively target cells with the neurokinin 1 receptor in laminae III and IV of the rat spinal cord. *J Neurosci* 19:2637-2646.
442. Polgar E, Shehab SA, Watt C, Todd AJ (1999c) GABAergic neurons that contain neuropeptide Y selectively target cells with the neurokinin 1 receptor in laminae III and IV of the rat spinal cord. *J Neurosci* 19:2637-2646.
443. Polgar E, Todd AJ (2008) Tactile allodynia can occur in the spared nerve injury model in the rat without selective loss of GABA or GABA(A) receptors from synapses in laminae I-II of the ipsilateral spinal dorsal horn. *Neuroscience* 156:193-202.
444. Polgar E, Watanabe M, Hartmann B, Grant SG, Todd AJ (2008) Expression of AMPA receptor subunits at synapses in laminae I-III of the rodent spinal dorsal horn. *Mol Pain* 4:5.
445. Polycarpou N, Ng YL, Canavan D, Moles DR, Gulabivala K (2005) Prevalence of persistent pain after endodontic treatment and factors affecting its occurrence in cases with complete radiographic healing. *Int Endod J* 38:169-178.
446. Porreca F, Ossipov MH, Gebhart GF (2002) Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci* 25:319-325.
447. Prescott SA, De Koninck Y (2002) Four cell types with distinctive membrane properties and morphologies in lamina I of the spinal dorsal horn of the adult rat. *J Physiol* 539:817-836.
448. Prescott SA, Sejnowski TJ, De Koninck Y (2006) Reduction of anion reversal potential subverts the inhibitory control of firing rate in spinal lamina I neurons: towards a biophysical basis for neuropathic pain. *Mol Pain* 2:32.
449. Price DD, Greenspan JD, Dubner R (2003) Neurons involved in the exteroceptive function of pain. *Pain* 106:215-219.
450. Price DD, Hayashi H, Dubner R, Ruda MA (1979) Functional relationships between neurons of marginal and substantia gelatinosa layers of primate dorsal horn. *J Neurophysiol* 42:1590-1608.
451. Price DD, Mayer DJ (1974) Physiological laminar organization of the dorsal horn of *M. mulatta*. *Brain Res* 79:321-325.
452. Pryde KR, Hirst J (2011) Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I: a single, unified mechanism that applies during both forward and reverse electron transfer. *J Biol Chem* 286:18056-18065.
453. Putzki N, Pfriem A, Limmroth V, Yaldizli O, Tettenborn B, Diener HC, Katsarava Z (2009) Prevalence of migraine, tension-type headache and trigeminal neuralgia in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 16:262-267.

454. Raboisson P, Dallel R, Woda A (1989) Responses of neurones in the ventrobasal complex of the thalamus to orofacial noxious stimulation after large trigeminal tractotomy. *Exp Brain Res* 77:569-576.
455. Raghavendra V, Tanga F, DeLeo JA (2003) Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther* 306:624-630.
456. Ramer LM, Borisoff JF, Ramer MS (2004) Rho-kinase inhibition enhances axonal plasticity and attenuates cold hyperalgesia after dorsal rhizotomy. *J Neurosci* 24:10796-10805.
457. Rashid MH, Ueda H (2005) Pre-injury administration of morphine prevents development of neuropathic hyperalgesia through activation of descending monoaminergic mechanisms in the spinal cord in mice. *Mol Pain* 1:19.
458. Rees H, Roberts MH (1993) The anterior pretectal nucleus: a proposed role in sensory processing. *Pain* 53:121-135.
459. Rethelyi M, Light AR, Perl ER (1982) Synaptic complexes formed by functionally defined primary afferent units with fine myelinated fibers. *J Comp Neurol* 207:381-393.
460. Rethelyi M, Light AR, Perl ER (1989) Synaptic ultrastructure of functionally and morphologically characterized neurons of the superficial spinal dorsal horn of cat. *J Neurosci* 9:1846-1863.
461. Rex EB, Rankin ML, Yang Y, Lu Q, Gerfen CR, Jose PA, Sibley DR (2010) Identification of RanBP 9/10 as interacting partners for protein kinase C (PKC) gamma/delta and the D1 dopamine receptor: regulation of PKC-mediated receptor phosphorylation. *Mol Pharmacol* 78:69-80.
462. REXED B (1952) The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 96:414-495.
463. Reynolds DV (1969) Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science* 164:444-445.
464. Ribeiro-da-Silva A, Coimbra A (1982) Two types of synaptic glomeruli and their distribution in laminae I-III of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 209:176-186.
465. Ribeiro-da-Silva A, Coimbra A (1984) Capsaicin causes selective damage to type I synaptic glomeruli in rat substantia gelatinosa. *Brain Res* 290:380-383.
466. Ribeiro-da-Silva A, De Koninck Y (2008) Morphological and Neurochemical Organization of the Spinal Dorsal Horn. pp 279-310.
467. Ribeiro-da-Silva A, Pignatelli D, Coimbra A (1985) Synaptic architecture of glomeruli in superficial dorsal horn of rat spinal cord, as shown in serial reconstructions. *J Neurocytol* 14:203-220.
468. Ribeiro-da-Silva A, Tagari P, Cuellar AC (1989) Morphological characterization of substance P-like immunoreactive glomeruli in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord and trigeminal subnucleus caudalis: a quantitative study. *J Comp Neurol* 281:497-15.

469. Roberts LA, Beyer C, Komisaruk BR (1986) Nociceptive responses to altered GABAergic activity at the spinal cord. *Life Sci* 39:1667-1674.
470. Robinson PP, Smith KG (1996) Lingual nerve damage during lower third molar removal: a comparison of two surgical methods. *Br Dent J* 180:456-461.
471. Romero-Sandoval A, Chai N, Nutile-McMenemy N, DeLeo JA (2008) A comparison of spinal Iba1 and GFAP expression in rodent models of acute and chronic pain. *Brain Res* 1219:116-126.
472. Rong W, Hillsley K, Davis JB, Hicks G, Winchester WJ, Grundy D (2004) Jejunal afferent nerve sensitivity in wild-type and TRPV1 knockout mice. *J Physiol* 560:867-881.
473. Ruscheweyh R, Ikeda H, Heinke B, Sandkuhler J (2004) Distinctive membrane and discharge properties of rat spinal lamina I projection neurones in vitro. *J Physiol* 555:527-543.
474. Ruscheweyh R, Sandkuhler J (2002) Lamina-specific membrane and discharge properties of rat spinal dorsal horn neurones in vitro. *J Physiol* 541:231-244.
475. Ruscheweyh R, Wilder-Smith O, Drdla R, Liu XG, Sandkuhler J (2011) Long-term potentiation in spinal nociceptive pathways as a novel target for pain therapy. *Mol Pain* 7:20.
476. Saito N, Shirai Y (2002) Protein kinase C gamma (PKC gamma): function of neuron specific isotype. *J Biochem* 132:683-687.
477. Saito N, Tsujino T, Fukuda K, Tanaka C (1994) Alpha-, beta II- and gamma-subspecies of protein kinase C localized in the monkey hippocampus: pre- and post-synaptic localization of gamma-subspecies. *Brain Res* 656:245-256.
478. Sakai N, Saito N, Seki T (2011) Molecular pathophysiology of neurodegenerative disease caused by gammaPKC mutations. *World J Biol Psychiatry* 12 Suppl 1:95-98.
479. Sakai N, Sasaki K, Ikegaki N, Shirai Y, Ono Y, Saito N (1997) Direct visualization of the translocation of the gamma-subspecies of protein kinase C in living cells using fusion proteins with green fluorescent protein. *J Cell Biol* 139:1465-1476.
480. Sakai N, Tsubokawa H, Matsuzaki M, Kajimoto T, Takahashi E, Ren Y, Ohmori S, Shirai Y, Matsubayashi H, Chen J, Duman RS, Kasai H, Saito N (2004) Propagation of gammaPKC translocation along the dendrites of Purkinje cell in gammaPKC-GFP transgenic mice. *Genes Cells* 9:945-957.
481. Sanchez-Blazquez P, Rodriguez-Munoz M, Garzon J (2010) Mu-opioid receptors transiently activate the Akt-nNOS pathway to produce sustained potentiation of PKC-mediated NMDAR-CaMKII signaling. *PLoS One* 5:e11278.
482. Sandkuhler J, Gruber-Schoffnegger D (2012) Hyperalgesia by synaptic long-term potentiation (LTP): an update. *Curr Opin Pharmacol* 12:18-27.
483. Sang CN, Gracely RH, Max MB, Bennett GJ (1996) Capsaicin-evoked mechanical allodynia and hyperalgesia cross nerve territories. Evidence for a central mechanism. *Anesthesiology* 85:491-496.

484. Scherrer G, Imamachi N, Cao YQ, Contet C, Mennicken F, O'Donnell D, Kieffer BL, Basbaum AI (2009) Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. *Cell* 137:1148-1159.
485. Schmelz M, Schmidt R, Ringkamp M, Forster C, Handwerker HO, Torebjork HE (1996) Limitation of sensitization to injured parts of receptive fields in human skin C-nociceptors. *Exp Brain Res* 109:141-147.
486. Schmidt R, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Torebjork E, Handwerker H (1995) Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci* 15:333-341.
487. Schneider SP (2003) Spike frequency adaptation and signaling properties of identified neurons in rodent deep spinal dorsal horn. *J Neurophysiol* 90:245-258.
488. Scholz J, Broom DC, Youn DH, Mills CD, Kohno T, Suter MR, Moore KA, Decosterd I, Coggeshall RE, Woolf CJ (2005) Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 25:7317-7323.
489. Schulte G, Robertson B, Fredholm BB, DeLander GE, Shortland P, Molander C (2003) Distribution of antinociceptive adenosine A1 receptors in the spinal cord dorsal horn, and relationship to primary afferents and neuronal subpopulations. *Neuroscience* 121:907-916.
490. Schwartz ES, Kim HY, Wang J, Lee I, Klann E, Chung JM, Chung K (2009) Persistent pain is dependent on spinal mitochondrial antioxidant levels. *J Neurosci* 29:159-168.
491. Schwartz ES, Lee I, Chung K, Chung JM (2008) Oxidative stress in the spinal cord is an important contributor in capsaicin-induced mechanical secondary hyperalgesia in mice. *Pain* 138:514-524.
492. Schwei MJ, Honore P, Rogers SD, Salak-Johnson JL, Finke MP, Ramnaraine ML, Clohisey DR, Mantyh PW (1999) Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. *J Neurosci* 19:10886-10897.
493. Seal RP, Wang X, Guan Y, Raja SN, Woodbury CJ, Basbaum AI, Edwards RH (2009) Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature* 462:651-655.
494. Sessle BJ (2000) Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Crit Rev Oral Biol Med* 11:57-91.
495. Shehab SA, Spike RC, Todd AJ (2003) Evidence against cholera toxin B subunit as a reliable tracer for sprouting of primary afferents following peripheral nerve injury. *Brain Res* 964:218-227.
496. Shirai Y, Adachi N, Saito N (2008) Protein kinase Cepsilon: function in neurons. *FEBS J* 275:3988-3994.
497. Shumilla JA, Liron T, Mochly-Rosen D, Kendig JJ, Sweitzer SM (2005) Ethanol withdrawal-associated allodynia and hyperalgesia: age-dependent regulation by protein kinase C epsilon and gamma isoenzymes. *J Pain* 6:535-549.



498. Siddall PJ, McClelland JM, Rutkowski SB, Cousins MJ (2003) A longitudinal study of the prevalence and characteristics of pain in the first 5 years following spinal cord injury. *Pain* 103:249-257.
499. Siegelbaum SA, Schwartz JH, Kandel ER (2000) Modulation of Synaptic Transmission: Second Messengers. In: *PRINCIPLES OF NEURONAL SCIENCE* (Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, eds), pp 229-252. McGraw-Hill Companies.
500. Sigurdsson A, Maixner W (1994) Effects of experimental and clinical noxious counterirritants on pain perception. *Pain* 57:265-275.
501. Simone DA, Baumann TK, LaMotte RH (1989) Dose-dependent pain and mechanical hyperalgesia in humans after intradermal injection of capsaicin. *Pain* 38:99-107.
502. Singh S, Narang AS, Mahato RI (2011) Subcellular fate and off-target effects of siRNA, shRNA, and miRNA. *Pharm Res* 28:2996-3015.
503. Sivilotti L, Woolf CJ (1994) The contribution of GABAA and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. *J Neurophysiol* 72:169-179.
504. Sjoqvist O (1938) Studies on pain conduction in the trigeminal nerve. A contribution to the surgical treatment of facial pain. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 13:7-139.
505. Smith ES, Lewin GR (2009) Nociceptors: a phylogenetic view. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 195:1089-1106.
506. Smith FL, Gabra BH, Smith PA, Redwood MC, Dewey WL (2007) Determination of the role of conventional, novel and atypical PKC isoforms in the expression of morphine tolerance in mice. *Pain* 127:129-139.
507. Soliman AC, Yu JS, Coderre TJ (2005) mGlu and NMDA receptor contributions to capsaicin-induced thermal and mechanical hypersensitivity. *Neuropharmacology* 48:325-332.
508. Song M, Messing RO (2005) Protein kinase C regulation of GABAA receptors. *Cell Mol Life Sci* 62:119-127.
509. Song Z, Zou W, Liu C, Guo Q (2010) Gene knockdown with lentiviral vector-mediated intrathecal RNA interference of protein kinase C gamma reverses chronic morphine tolerance in rats. *J Gene Med* 12:873-880.
510. Sossin WS (2007) Isoform specificity of protein kinase Cs in synaptic plasticity. *Learn Mem* 14:236-246.
511. Spike RC, Puskar Z, Andrew D, Todd AJ (2003) A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord. *Eur J Neurosci* 18:2433-2448.
512. Steiner I (1996) Human herpes viruses latent infection in the nervous system. *Immunol Rev* 152:157-173.
513. Stevanin G, Hahn V, Lohmann E, Bouslam N, Gouttard M, Soumphonphakdy C, Welter ML, Ollagnon-Roman E, Lemainque A, Ruberg M, Brice A, Durr A (2004) Mutation in the catalytic domain of protein kinase C gamma and extension of the phenotype associated with spinocerebellar ataxia type 14. *Arch Neurol* 61:1242-1248.

514. Stuesse SL, Crisp T, McBurney DL, Schechter JB, Lovell JA, Cruce WL (2001) Neuropathic pain in aged rats: behavioral responses and astrocytic activation. *Exp Brain Res* 137:219-227.
515. Suarez-Roca H, Abdullah L, Zuniga J, Madison S, Maixner W (1992) Multiphasic effect of morphine on the release of substance P from rat trigeminal nucleus slices. *Brain Res* 579:187-194.
516. Sun YN, Luo JY, Rao ZR, Lan L, Duan L (2005) GFAP and Fos immunoreactivity in lumbosacral spinal cord and medulla oblongata after chronic colonic inflammation in rats. *World J Gastroenterol* 11:4827-4832.
517. Sun Z, Arendt CW, Ellmeier W, Schaeffer EM, Sunshine MJ, Gandhi L, Annes J, Petrzilka D, Kupfer A, Schwartzberg PL, Littman DR (2000) PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature* 404:402-407.
518. Sweitzer SM, Colburn RW, Rutkowski M, DeLeo JA (1999) Acute peripheral inflammation induces moderate glial activation and spinal IL-1beta expression that correlates with pain behavior in the rat. *Brain Res* 829:209-221.
519. Sweitzer SM, Wong SM, Peters MC, Mochly-Rosen D, Yeomans DC, Kendig JJ (2004a) Protein kinase C epsilon and gamma: involvement in formalin-induced nociception in neonatal rats. *J Pharmacol Exp Ther* 309:616-625.
520. Sweitzer SM, Wong SM, Tjolsen A, Allen CP, Mochly-Rosen D, Kendig JJ (2004b) Exaggerated nociceptive responses on morphine withdrawal: roles of protein kinase C epsilon and gamma. *Pain* 110:281-289.
521. Swift JQ, Garry MG, Roszkowski MT, Hargreaves KM (1993) Effect of flurbiprofen on tissue levels of immunoreactive bradykinin and acute postoperative pain. *J Oral Maxillofac Surg* 51:112-116.
522. Szallasi A, Sheta M (2012) Targeting TRPV1 for pain relief: limits, losers and laurels. *Expert Opin Investig Drugs* 21:1351-1369.
523. SZENTAGOTHAJ J (1964) NEURONAL AND SYNAPTIC ARRANGEMENT IN THE SUBSTANTIA GELATINOSA ROLANDI. *J Comp Neurol* 122:219-239.
524. Talbot DA, Lambert AJ, Brand MD (2004) Production of endogenous matrix superoxide from mitochondrial complex I leads to activation of uncoupling protein 3. *FEBS Lett* 556:111-115.
525. Tanaka C, Saito N (1992) Localization of subspecies of protein kinase C in the mammalian central nervous system. *Neurochem Int* 21:499-512.
526. Tashiro A, Okamoto K, Bereiter DA (2009) Chronic inflammation and estradiol interact through MAPK activation to affect TMJ nociceptive processing by trigeminal caudalis neurons. *Neuroscience* 164:1813-1820.
527. Taylor-Blake B, Zylka MJ (2010) Prostatic acid phosphatase is expressed in peptidergic and nonpeptidergic nociceptive neurons of mice and rats. *PLoS One* 5:e8674.
528. Thalhammer JG, LaMotte RH (1982) Spatial properties of nociceptor sensitization following heat injury of the skin. *Brain Res* 231:257-265.

529. Todd AJ (2010) Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci* 11:823-836.
530. Todd AJ, Hughes DI, Polgar E, Nagy GG, Mackie M, Ottersen OP, Maxwell DJ (2003) The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn. *Eur J Neurosci* 17:13-27.
531. Todd AJ, Lewis SG (1986) The morphology of Golgi-stained neurons in lamina II of the rat spinal cord. *J Anat* 149:113-119.
532. Todd AJ, McKenzie J (1989) GABA-immunoreactive neurons in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience* 31:799-806.
533. Todd AJ, Sullivan AC (1990) Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 296:496-505.
534. Todd EM, Kucharski A (2004) Pain: historical perspectives. In: *Principles and Practice of Pain Medicine* (Warfield CA, Bajwa ZH, eds), pp 1-10. McGraw-Hill.
535. Tolle TR, Kaufmann T, Siessmeier T, Lautenbacher S, Berthele A, Munz F, Zieglgansberger W, Willoch F, Schwaiger M, Conrad B, Bartenstein P (1999) Region-specific encoding of sensory and affective components of pain in the human brain: a positron emission tomography correlation analysis. *Ann Neurol* 45:40-47.
536. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21:531-543.
537. Torebjork HE, Lundberg LE, LaMotte RH (1992) Central changes in processing of mechanoreceptive input in capsaicin-induced secondary hyperalgesia in humans. *J Physiol* 448:765-780.
538. 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* 26:1833-1843.
539. Touska F, Marsakova L, Teisinger J, Vlachova V (2011) A "cute" desensitization of TRPV1. *Curr Pharm Biotechnol* 12:122-129.
540. Towers S, Princivalle A, Billinton A, Edmunds M, Bettler B, Urban L, Castro-Lopes J, Bowery NG (2000) GABAB receptor protein and mRNA distribution in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Eur J Neurosci* 12:3201-3210.
541. Tracey I, Ploghaus A, Gati JS, Clare S, Smith S, Menon RS, Matthews PM (2002) Imaging attentional modulation of pain in the periaqueductal gray in humans. *J Neurosci* 22:2748-2752.
542. Treede RD, Cole JD (1993) Dissociated secondary hyperalgesia in a subject with a large-fibre sensory neuropathy. *Pain* 53:169-174.
543. Treede RD, Kenshalo DR, Gracely RH, Jones AK (1999) The cortical representation of pain. *Pain* 79:105-111.

544. Treede RD, Magerl W (2000) Multiple mechanisms of secondary hyperalgesia. *Prog Brain Res* 129:331-341.
545. Treede RD, Meyer RA, Raja SN, Campbell JN (1992) Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. *Prog Neurobiol* 38:397-421.
546. Tsuda M, Inoue K, Salter MW (2005) Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia. *Trends Neurosci* 28:101-107.
547. Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K (2012) Purinergic system, microglia and neuropathic pain. *Curr Opin Pharmacol* 12:74-79.
548. Tsujino T, Kose A, Saito N, Tanaka C (1990) Light and electron microscopic localization of beta I-, beta II-, and gamma-subspecies of protein kinase C in rat cerebral neocortex. *J Neurosci* 10:870-884.
549. Valmaseda-Castellon E, Berini-Aytes L, Gay-Escoda C (2000) Lingual nerve damage after third lower molar surgical extraction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 90:567-573.
550. Van Der Zee EA, Strosberg AD, Bohus B, Luiten PG (1993) Colocalization of muscarinic acetylcholine receptors and protein kinase C gamma in rat parietal cortex. *Brain Res Mol Brain Res* 18:152-162.
551. VanderHorst VG, Ulfhake B (2006) The organization of the brainstem and spinal cord of the mouse: relationships between monoaminergic, cholinergic, and spinal projection systems. *J Chem Neuroanat* 31:2-36.
553. Vega-Avelaira D, Moss A, Fitzgerald M (2007) Age-related changes in the spinal cord microglial and astrocytic response profile to nerve injury. *Brain Behav Immun* 21:617-623.
554. Velazquez KT, Mohammad H, Sweitzer SM (2007) Protein kinase C in pain: involvement of multiple isoforms. *Pharmacol Res* 55:578-589.
555. Verbeek DS, Goedhart J, Bruinsma L, Sinke RJ, Reits EA (2008) PKC gamma mutations in spinocerebellar ataxia type 14 affect C1 domain accessibility and kinase activity leading to aberrant MAPK signaling. *J Cell Sci* 121:2339-2349.
556. Vierck CJ, Jr., Cannon RL, Fry G, Maixner W, Whitsel BL (1997) Characteristics of temporal summation of second pain sensations elicited by brief contact of glabrous skin by a preheated thermode. *J Neurophysiol* 78:992-1002.
557. Villanueva L, Bouhassira D, Le Bars D (1996) The medullary subnucleus reticularis dorsalis (SRD) as a key link in both the transmission and modulation of pain signals. *Pain* 67:231-240.
558. von Hehn CA, Baron R, Woolf CJ (2012) Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. *Neuron* 73:638-652.
559. 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* 14:2708-2723.
560. Waite PME, Tracey DJ (1995) Trigeminal Sensory System. In: *The Rat Nervous System* (Paxinos G, ed), pp 705-724. Sydney: ACADEMIC PRESS, INC.

561. Waldvogel HJ, Baer K, Eady E, Allen KL, Gilbert RT, Mohler H, Rees MI, Nicholson LF, Faull RL (2010) Differential localization of gamma-aminobutyric acid type A and glycine receptor subunits and gephyrin in the human pons, medulla oblongata and uppermost cervical segment of the spinal cord: an immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 518:305-328.
562. Walker SM, Meredith-Middleton J, Lickiss T, Moss A, Fitzgerald M (2007) Primary and secondary hyperalgesia can be differentiated by postnatal age and ERK activation in the spinal dorsal horn of the rat pup. *Pain* 128:157-168.
563. Wall PD, Merrill EG, Yaksh TL (1979) Responses of single units in laminae 2 and 3 of cat spinal cord. *Brain Res* 160:245-260.
564. Wall PD, Woolf CJ (1984) Muscle but not cutaneous C-afferent input produces prolonged increases in the excitability of the flexion reflex in the rat. *J Physiol* 356:443-458.
565. Wang H, Dai Y, Fukuoka T, Yamanaka H, Obata K, Tokunaga A, Noguchi K (2004a) Enhancement of stimulation-induced ERK activation in the spinal dorsal horn and gracile nucleus neurons in rats with peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci* 19:884-890.
566. Wang HB, Zhao B, Zhong YQ, Li KC, Li ZY, Wang Q, Lu YJ, Zhang ZN, He SQ, Zheng HC, Wu SX, Hokfelt TG, Bao L, Zhang X (2010) Coexpression of delta- and mu-opioid receptors in nociceptive sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:13117-13122.
567. Wang S, Lim G, Zeng Q, Sung B, Ai Y, Guo G, Yang L, Mao J (2004b) Expression of central glucocorticoid receptors after peripheral nerve injury contributes to neuropathic pain behaviors in rats. *J Neurosci* 24:8595-8605.
568. Wang Y, Qin ZH (2010) Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis* 15:1382-1402.
569. Wang ZQ, Porreca F, Cuzzocrea S, Galen K, Lightfoot R, Masini E, Muscoli C, Mollace V, Ndengele M, Ischiropoulos H, Salvemini D (2004c) A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. *J Pharmacol Exp Ther* 309:869-878.
570. Warren CA, Mok L, Gordon S, Fouad AF, Gold MS (2008) Quantification of neural protein in extirpated tooth pulp. *J Endod* 34:7-10.
571. Watkins LR, Maier SF (2002) Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiol Rev* 82:981-1011.
572. Wei F, Vadakkan KI, Toyoda H, Wu LJ, Zhao MG, Xu H, Shum FW, Jia YH, Zhuo M (2006) Calcium calmodulin-stimulated adenylyl cyclases contribute to activation of extracellular signal-regulated kinase in spinal dorsal horn neurons in adult rats and mice. *J Neurosci* 26:851-861.
573. Weidner C, Schmelz M, Schmidt R, Hansson B, Handwerker HO, Torebjork HE (1999) Functional attributes discriminating mechano-insensitive and mechano-responsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci* 19:10184-10190.
574. Wen ZH, Guo YW, Chang YC, Wong CS (2003) D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid inhibits intrathecal pertussis toxin-induced thermal hyperalgesia and protein kinase Cgamma up-regulation. *Brain Res* 963:1-7.

575. Wetsel WC, Khan WA, Merchenthaler I, Rivera H, Halpern AE, Phung HM, Negro-Vilar A, Hannun YA (1992) Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. *J Cell Biol* 117:121-133.
576. Wetzel C, Hu J, Riethmacher D, Benckendorff A, Harder L, Eilers A, Moshourab R, Kozlenkov A, Labuz D, Caspani O, Erdmann B, Machelska H, Heppenstall PA, Lewin GR (2007) A stomatin-domain protein essential for touch sensation in the mouse. *Nature* 445:206-209.
577. Willis WD, Jr. (1988) Anatomy and physiology of descending control of nociceptive responses of dorsal horn neurons: comprehensive review. *Prog Brain Res* 77:1-29.
578. Willis WD, Trevino DL, Coulter JD, Maunz RA (1974) Responses of primate spinothalamic tract neurons to natural stimulation of hindlimb. *J Neurophysiol* 37:358-372.
579. Wilson LB, Andrew D, Craig AD (2002) Activation of spinobulbar lamina I neurons by static muscle contraction. *J Neurophysiol* 87:1641-1645.
580. Woda A, Pionchon P (2009) Physiopathologie des douleurs orofaciales idiopathiques. In: Douleurs : physiologie, physiopathologie et pharmacologie (Brasseur L, Bouhassira D, Chauvin M, eds), pp 173-188. Paris: ARNETTE.
581. Woodbury CJ, Koerber HR (2003) Widespread projections from myelinated nociceptors throughout the substantia gelatinosa provide novel insights into neonatal hypersensitivity. *J Neurosci* 23:601-610.
582. Woodbury CJ, Kullmann FA, McIlwrath SL, Koerber HR (2008) Identity of myelinated cutaneous sensory neurons projecting to nociceptive laminae following nerve injury in adult mice. *J Comp Neurol* 508:500-509.
583. Woolf CJ (1983) Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature* 306:686-688.
584. Woolf CJ (2011) Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain* 152:S2-15.
585. Woolf CJ, Fitzgerald M (1983) The properties of neurones recorded in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 221:313-328.
586. Woolf CJ, King AE (1990) Dynamic alterations in the cutaneous mechanoreceptive fields of dorsal horn neurons in the rat spinal cord. *J Neurosci* 10:2717-2726.
587. Woolf CJ, Ma Q (2007) Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron* 55:353-364.
588. Woolf CJ, Mannion RJ (1999) Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 353:1959-1964.
589. Woolf CJ, Salter MW (2000) Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288:1765-1769.
590. Woolf CJ, Salter MW (2006) Plasticity and pain: role in the dorsal horn. In: Wall and Melzack's Textbook of Pain (McMahon SB, Koltzenburg M, eds), pp 91-105. London: ELSEVIER.

591. Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE (1992) Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 355:75-78.
592. Woolf CJ, Thompson SW (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* 44:293-299.
593. Wu Y, Willcockson HH, Maixner W, Light AR (2004) Suramin inhibits spinal cord microglia activation and long-term hyperalgesia induced by formalin injection. *J Pain* 5:48-55.
594. Wu YW, Bi YP, Kou XX, Xu W, Ma LQ, Wang KW, Gan YH, Ma XC (2010) 17-Beta-estradiol enhanced allodynia of inflammatory temporomandibular joint through upregulation of hippocampal TRPV1 in ovariectomized rats. *J Neurosci* 30:8710-8719.
595. Xiao R, Xu XZ (2010) Mechanosensitive channels: in touch with Piezo. *Curr Biol* 20:R936-R938.
596. Xiaoping G, Xiaofang Z, Yaguo Z, Juan Z, Junhua W, Zhengliang M (2010) Involvement of the spinal NMDA receptor/PKCgamma signaling pathway in the development of bone cancer pain. *Brain Res* 1335:83-90.
597. Yaksh TL (1989) Behavioral and autonomic correlates of the tactile evoked allodynia produced by spinal glycine inhibition: effects of modulatory receptor systems and excitatory amino acid antagonists. *Pain* 37:111-123.
598. Yaksh TL, Rudy TA (1978) Narcotic analgesics: CNS sites and mechanisms of action as revealed by intracerebral injection techniques. *Pain* 4:299-359.
599. Yang K, Kumamoto E, Furue H, Li YQ, Yoshimura M (1999) Action of capsaicin on dorsal root-evoked synaptic transmission to substantia gelatinosa neurons in adult rat spinal cord slices. *Brain Res* 830:268-273.
600. Yang K, Kumamoto E, Furue H, Yoshimura M (1998) Capsaicin facilitates excitatory but not inhibitory synaptic transmission in substantia gelatinosa of the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 255:135-138.
601. Yang L, Liu G, Zakharov SI, Morrow JP, Rybin VO, Steinberg SF, Marx SO (2005) Ser1928 is a common site for Cav1.2 phosphorylation by protein kinase C isoforms. *J Biol Chem* 280:207-214.
602. Yasaka T, Tiong SY, Hughes DI, Riddell JS, Todd AJ (2010) Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach. *Pain* 151:475-488.
603. Yevseyenkov VV, Das S, Lin D, Willard L, Davidson H, Sitaramayya A, Giblin FJ, Dang L, Takemoto DJ (2009) Loss of protein kinase Cgamma in knockout mice and increased retinal sensitivity to hyperbaric oxygen. *Arch Ophthalmol* 127:500-506.
604. Yeziarski RP (1988) Spinomesencephalic tract: projections from the lumbosacral spinal cord of the rat, cat, and monkey. *J Comp Neurol* 267:131-146.
605. Yoshimura M, Jessell T (1990) Amino acid-mediated EPSPs at primary afferent synapses with substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord. *J Physiol* 430:315-335.

606. Yoshimura M, Nishi S (1995) Primary afferent-evoked glycine- and GABA-mediated IPSPs in substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord in vitro. *J Physiol* 482 ( Pt 1):29-38.
607. Yowtak J, Lee KY, Kim HY, Wang J, Kim HK, Chung K, Chung JM (2011) Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain by reducing spinal GABA release. *Pain* 152:844-852.
608. Zakrzewska JM, Jassim S, Bulman JS (1999) A prospective, longitudinal study on patients with trigeminal neuralgia who underwent radiofrequency thermocoagulation of the Gasserian ganglion. *Pain* 79:51-58.
609. Zakrzewska JM, Lopez BC (2006) Trigeminal and glossopharyngeal neuralgia. In: Wall and Melzack's Textbook of Pain (McMahon SB, Koltzenburg M, eds), pp 1001-1010. London: ELSEVIER.
610. Zeilhofer HU (2005) Synaptic modulation in pain pathways. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 154:73-100.
611. Zeilhofer HU, Mohler H, Di Lio A (2009a) GABAergic analgesia: new insights from mutant mice and subtype-selective agonists. *Trends Pharmacol Sci* 30:397-402.
612. Zeilhofer HU, Wildner H, Yevenes GE (2012) Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiol Rev* 92:193-235.
613. Zeilhofer HU, Witschi R, Johansson T (2009b) Fast Inhibitory Transmission of Pain in the Spinal Cord. In: *Synaptic Plasticity in Pain* (Malcangio M, ed), pp 49-66. Springer Science+Business Media.
614. Zeitz KP, Giese KP, Silva AJ, Basbaum AI (2004) The contribution of autophosphorylated alpha-calcium-calmodulin kinase II to injury-induced persistent pain. *Neuroscience* 128:889-898.
615. Zeitz KP, Malmberg AB, Gilbert H, Basbaum AI (2001) Reduced development of tolerance to the analgesic effects of morphine and clonidine in PKC gamma mutant mice. *Pain* 94:245-253.
616. Zhang W, Gardell S, Zhang D, Xie JY, Agnes RS, Badghisi H, Hrubby VJ, Rance N, Ossipov MH, Vanderah TW, Porreca F, Lai J (2009) Neuropathic pain is maintained by brainstem neurons co-expressing opioid and cholecystokinin receptors. *Brain* 132:778-787.
617. Zhao C, Leitges M, Gereau RW (2011) Isozyme-specific effects of protein kinase C in pain modulation. *Anesthesiology* 115:1261-1270.
618. Zhou HY, Zhang HM, Chen SR, Pan HL (2007) Increased nociceptive input rapidly modulates spinal GABAergic transmission through endogenously released glutamate. *J Neurophysiol* 97:871-882.
619. Zhou HY, Zhang HM, Chen SR, Pan HL (2008) Increased C-fiber nociceptive input potentiates inhibitory glycinergic transmission in the spinal dorsal horn. *J Pharmacol Exp Ther* 324:1000-1010.
620. Zotterman Y (1939) Touch, pain and tickling: an electro-physiological investigation on cutaneous sensory nerves. *J Physiol* 95:1-28.



621. Zou W, Song Z, Guo Q, Liu C, Zhang Z, Zhang Y (2011) Intrathecal lentiviral-mediated RNA interference targeting PKCgamma attenuates chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Hum Gene Ther* 22:465-475.
622. Zou W, Zhan X, Li M, Song Z, Liu C, Peng F, Guo Q (2012) Identification of differentially expressed proteins in the spinal cord of neuropathic pain models with PKCgamma silence by proteomic analysis. *Brain Res* 1440:34-46.
623. Zylka MJ, Rice FL, Anderson DJ (2005) Topographically distinct epidermal nociceptive circuits revealed by axonal tracers targeted to Mrgprd. *Neuron* 45:17-25.

## RESUME

### **Mécanismes segmentaires de l'allodynie mécanique statique trigéminal : rôle des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), de la désinhibition GABA<sub>A</sub>ergique et des interneurons PKC $\gamma$ .**

Les douleurs chroniques, inflammatoire ou neuropathique, se traduisent par un état d'hypersensibilité douloureuse. Cet état se manifeste par des douleurs spontanées et des douleurs provoquées, soit par une stimulation normalement non douloureuse (allodynie), soit par une stimulation douloureuse provoquant une sensation exagérée (hyperalgésie). Les traitements actuels ne sont souvent que partiellement efficaces et peuvent s'accompagner d'effets secondaires importants. Quel sont les mécanismes de ces symptômes douloureux et donc les cibles thérapeutiques potentielles pour de nouveaux médicaments ?

Utilisant des approches comportementales, pharmacologiques, électrophysiologiques, anatomo-fonctionnelles, moléculaires et microscopiques, nous avons caractérisé les mécanismes segmentaires de la douleur spontanée et l'allodynie mécanique statique (douleur provoquée par une légère pression cutanée). En utilisant le modèle de douleur provoquée par l'injection sous-cutanée (s.c.) de capsaïcine dans la face chez le rat, nous avons évalué (1) le rôle de l'inhibition GABA<sub>A</sub>ergique et des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) (2) l'implication d'interneurons spécifiques exprimant l'isoforme  $\gamma$  de la protéine kinase C (PKC $\gamma$ ) localisés dans les couche II interne (II<sub>i</sub>) et III externe (III<sub>e</sub>), et (3) les propriétés de ces interneurons, dans le sous-noyau caudal du trigêmeau.

L'immunohistochimie anti-phospho-ERK1/2 révèle que deux circuits neuronaux différents sont mis en jeu lors de la douleur spontanée et de l'allodynie mécanique statique après injection s.c. de capsaïcine. Le premier implique des neurones uniquement dans les couches superficielles (I et II externe (II<sub>e</sub>)) et le second, des neurones dans les couches I, II<sub>e</sub>, II<sub>i</sub> et III<sub>e</sub>, dont les interneurons PKC $\gamma$ . Comme après injection s.c. de capsaïcine, l'injection intracisternale (i.c.) d'un donneur de ROS ou d'un inhibiteur des récepteurs GABA<sub>A</sub> induit une allodynie mécanique statique et l'activation neuronale associée impliquant les interneurons PKC $\gamma$ . Ces deux phénomènes sont supprimés par l'inhibition pharmacologique de ROS ou de la PKC $\gamma$ , avant injection s.c. de capsaïcine, alors que la douleur spontanée subsiste. Les microscopies optique et électronique montrent que ces interneurons PKC $\gamma$  (1) expriment les récepteurs GABA<sub>A</sub> et glycine et (2) ne reçoivent de projections directes que de fibres afférentes de type A. La PKC $\gamma$  est majoritairement localisée au niveau de la membrane cytoplasmique, où elle forme souvent des clusters perisynaptique.

Nos résultats suggèrent qu'une allodynie mécanique statique se manifeste lorsque des circuits polysynaptiques locaux spécifiques, incluant les interneurons PKC $\gamma$ , sont désinhibés par réduction de l'inhibition GABA<sub>A</sub>ergique, vraisemblablement provoquée par une libération de ROS suite à une stimulation intense des fibres afférentes nociceptives. Des mécanismes spécifiques semblent donc exister pour chaque symptôme douloureux, représentant autant de cibles pour un traitement particulier de chacun d'eux.

### **Segmental mechanisms of trigeminal static mechanical allodynia: role of reactive oxygen species (ROS), GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition and PKC $\gamma$ interneurons**

Inflammatory or neuropathic chronic pain is characterized by persistent pain hypersensitivity. This includes 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). Much of the currently available clinical treatment is only partially effective and may be accompanied by distressing side effects. What are the mechanisms underlying these pain symptoms and therefore the putative targets for new drugs?

Using behavioural, pharmacological, electrophysiological, anatomo-functional, molecular and microscopic techniques, we have characterized the segmental mechanisms of spontaneous pain and static mechanical allodynia (pain produce by a light pressure). Using the facial capsaicin pain model in rats, we evaluated (1) the role of GABA<sub>A</sub>ergic inhibition and reactive oxygen species (ROS), (2) the involvement of specific interneurons which express the  $\gamma$  isoform of protein kinase C (PKC $\gamma$ ) and are localized in the inner part of laminae II (II<sub>i</sub>) and the outer part of lamina III (III<sub>e</sub>), and (3) the properties of these PKC $\gamma$  interneurons in the medullary dorsal horn (MDH).

Phospho-ERK1/2 immunohistochemistry reveals that two different neuronal circuits are involved in the manifestation of spontaneous pain and static mechanical allodynia after subcutaneous (s.c.) injection of capsaicin. The first includes neurons exclusively located in the most superficial laminae (I and outer part of lamina II (II<sub>e</sub>)) and the second, neurons in laminae I, II<sub>e</sub>, II<sub>i</sub> and III<sub>e</sub>, including PKC $\gamma$  interneurons. As after s.c. capsaicin, intracisternal (i.c.) injection of a ROS donor or a GABA<sub>A</sub> receptor inhibitor induces static mechanical allodynia and associated activation of the local circuit. Conversely, these two phenomena, but not spontaneous pain, are suppressed following i.c. injection of ROS scavenger and PKC $\gamma$  inhibitors before s.c. capsaicin. Light and electron microscopies show that PKC $\gamma$  interneurons (1) express both GABA<sub>A</sub> and glycine receptors, and (2) only receive direct inputs from A-fiber primary afferents. PKC $\gamma$  is mostly localized on cytoplasmic membranes where it often clusters close to synaptic clefts.

Our results suggest that static mechanical allodynia is expressed when specific local polysynaptic circuits, including PKC $\gamma$  interneurons, are unmasked by disrupted GABA<sub>A</sub>ergic inhibition, likely produced by ROS release following a strong activation of C-fiber nociceptive primary afferents. Specific mechanisms appear to be involved in these different pain symptoms, each of them being a possible target for new drugs aimed specifically at these symptoms.

FIGURES ET LEGENDES AMOVIBLES  
DES CHAPITRES 2 ET 3.

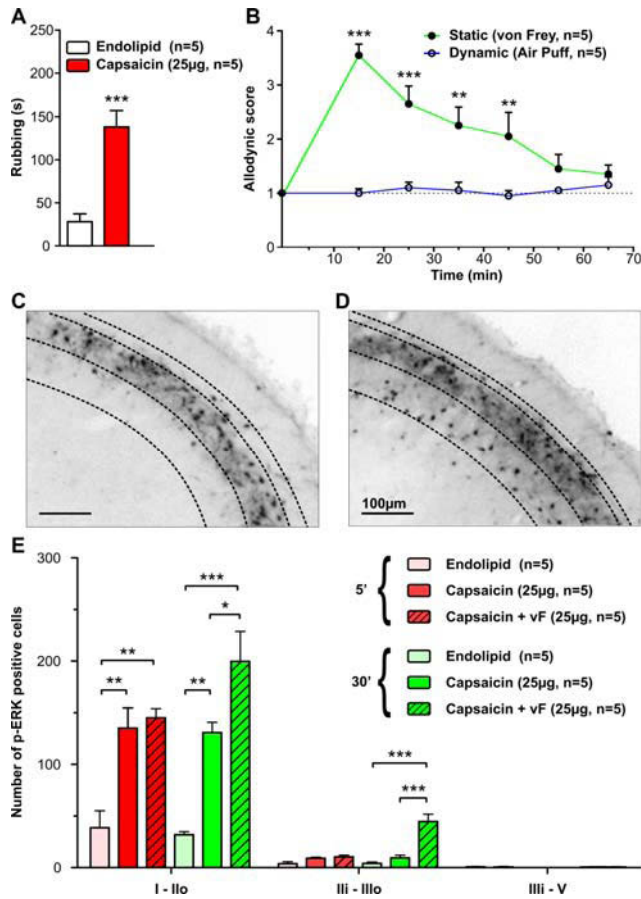


Figure 1

**Figure 1.** Subcutaneous (s.c.) capsaicin induces spontaneous pain and static, but not dynamic, mechanical allodynia. **A**, Bar histograms of the duration (mean  $\pm$  SEM) of the rubbing behavior in capsaicin-treated (red bar; n = 5) and control rats (empty bar; n = 5). Capsaicin induces spontaneous pain. **B**, Time course of changes (mean  $\pm$  SEM) in behavioral responses (allodynic score) evoked by static (6.0 g von Frey hair; filled circles) and dynamic mechanical stimuli (air puff; empty circles) applied in the area of secondary hypersensitivity of the same capsaicin-treated rats as A. Capsaicin induces a static, but not dynamic, mechanical allodynia lasting about 60 min. **C**, **D**, Images of phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2) immunolabeling in the MDH of rats 30 min after s.c. capsaicin with (D) or without (C) 2-min static mechanical stimulation (6.0 g von Frey hair). Stippled lines indicate, from dorsal to ventral, the limits of lamina I and outer (IIo) and inner (IIIi) lamina II. Phospho-ERK1/2 immunoreactive cells are exclusively located within the most superficial MDH laminae (I-IIo) following spontaneous pain whereas they encompass both I-IIo and IIIi-III after static mechanical stimulation in capsaicin-treated rats. **E**, Bar histograms of the number (mean  $\pm$  SEM) of p-ERK1/2 immunoreactive cells in laminae I-IIo, IIi-outer III (IIIo) and inner-III (IIIi)-V, 5 (red bars) and 30 min (green bars) after either s.c. endolipid alone (light red and light green bars) or capsaicin (dark red and dark green bars), with (hachure) or without 2-min static mechanical stimulation (6.0 g von Frey hair), as indicated on the figure (n = 5 in each group). Note that static mechanical stimulation enhances the number of p-ERK1/2 immunoreactive cells in laminae I-IIo and IIi-IIIo only when it is applied 30 min after s.c. capsaicin. \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001.

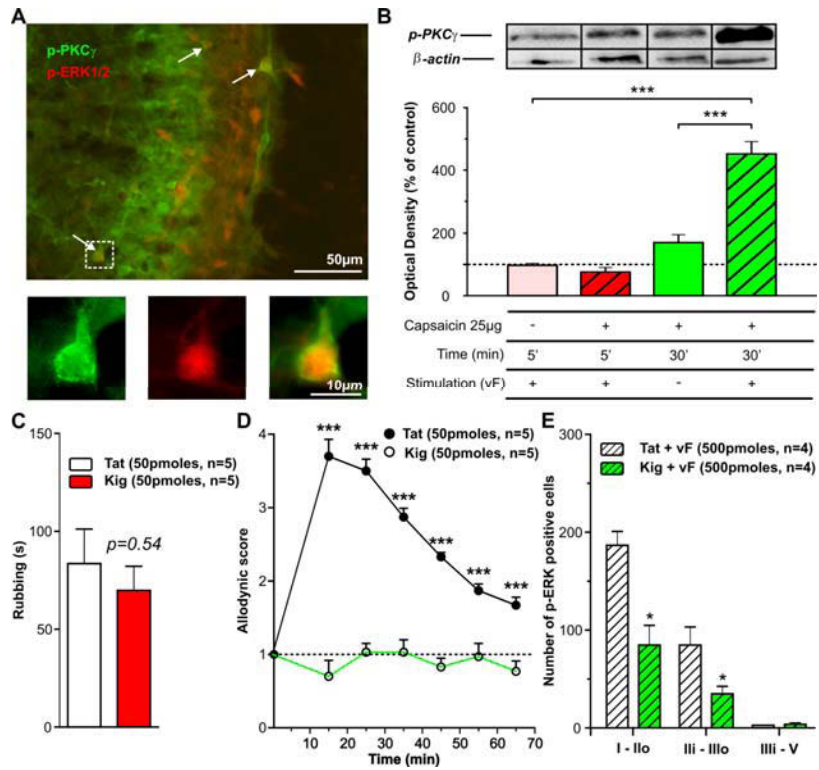
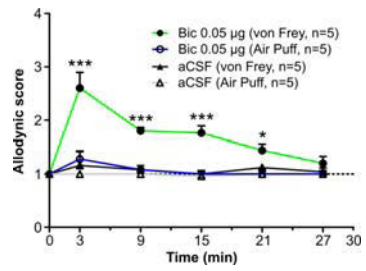


Figure 2

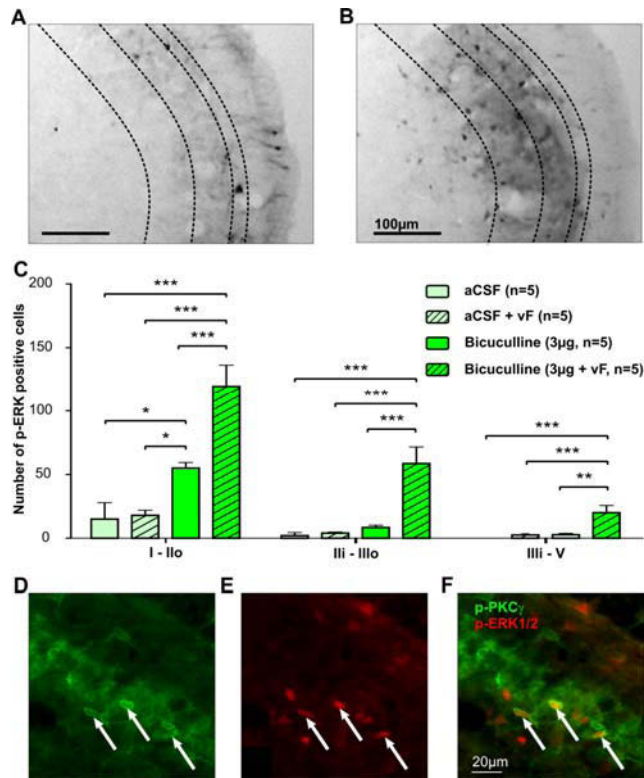
**Figure 2.** Activation of PKC $\gamma$  is required for the expression of capsaicin-induced static-mechanical allodynia but not spontaneous pain. **A**, Fluorescence images of phospho-PKC $\gamma$  (p-PKC $\gamma$ ) immunopositive (green), p-ERK1/2 immunopositive (red) and dual labeled neurons (white arrows) in lamina III of the MDH. Insets show the dual labeled neuron in the white stippled square. **B**, Top, Western blots for PKC $\gamma$  and  $\beta$ -actin on ipsilateral MDH proteins for the four groups of rats as indicated below the bar histograms. Bottom, bar histograms of the quantification of Western blotting. Values are normalized to  $\beta$ -actin staining. Values (mean  $\pm$  SEM) in the four groups are normalized to that in aCSF injected and 2-min static mechanical stimulation (6 g von Frey hair) group (light red bar). Treatments are indicated below the bar histograms. The bar color code is the same as in figure 1E: 5 min (red bars) and 30 min (green bars) after either s.c. endolipid alone (light red bar) or capsaicin (dark red and green bars), with (hachure) and without 2-min static mechanical stimulation (6 g von Frey hair). **C**, Bar histograms of the duration (mean  $\pm$  SEM) of the rubbing behavior in capsaicin-treated rats which had preemptively received i.c. Tat (empty bar; n = 5) or KIG (red bar; n = 5). Spontaneous pain is not suppressed in KIG-treated rats. **D**, Time course of changes (mean  $\pm$  SEM) in behavioral responses (allodynic score) evoked by static mechanical stimuli (6.0 g von Frey hair) applied in the area of secondary hypersensitivity in the same capsaicin-treated rats as C, preemptively intracisternally (i.c.) treated with KIG (empty circles) or Tat (filled circles). Static mechanical allodynia is suppressed in KIG-treated rats. **E**, Bar histograms (mean  $\pm$  SEM) of the number of p-ERK1/2 immunoreactive cells in laminae I-IIo, Iii-IIIo and IIIi-V following 2-min static mechanical stimulation (6 g von Frey hair) of the area of secondary hypersensitivity in capsaicin-treated rats, preemptively i.c. injected with either Tat (empty bars) or KIG (green bars), as indicated on the figure (n = 4 in each group). i.c. KIG prevents stimulation-induced elevation of the number of p-ERK1/2 immunoreactive cells in laminae I-IIo and Iii-IIIo in capsaicin-treated rats. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001.



**Figure 3.** GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition induces static, but not dynamic, mechanical allodynia.

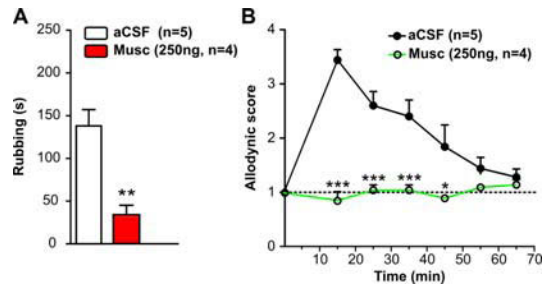
Time course of changes (mean  $\pm$  SEM) in behavioral responses (allodynic score) evoked by static (6.0 g von Frey hair; filled circles and triangles) and dynamic mechanical stimuli (air puff; empty circles and triangles) applied on the face of i.c. bicuculline- (circles) and i.c. aCSF-injected rats (triangles) as indicated on the figure (n = 5 in each group). i.c.-applied bicuculline induces a static, but not dynamic, mechanical allodynia lasting about 30 min.

**Figure 3**



**Figure 4.** Static mechanical stimulation under GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition activates a neural circuit which encompasses both superficial and deeper laminae. **A, B,** Images of p-ERK1/2 immunolabeling in the MDH in rats after i.c. bicuculline with (B) and without (A) 2-min static mechanical stimulation (6 g von Frey hair) of the area of secondary hypersensitivity. Stippled lines indicate, from dorsal to ventral, the limits of laminae I, IIo and IIIi. There are no or very few p-ERK1/2 immunoreactive cells after bicuculline alone whereas many are found after bicuculline and static mechanical stimulation, in laminae I, IIi, IIo and IIIi. **C,** Bar histograms of the number (mean  $\pm$  SEM) of p-ERK1/2 immunoreactive cells in laminae I-IIo, IIi-IIIo and IIIi-V, after either aCSF (light green) or bicuculline (dark green), with (hachure) and without 2-min static mechanical stimulation (6 g von Frey hair) of the area of secondary hypersensitivity, as indicated on the figure (n = 5 in each group). Static mechanical stimulation can enhance the number of p-ERK1/2 immunoreactive cells in laminae I-IIo, IIi-IIIo and IIIi-V only when it is applied under GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition. Note that, in addition, bicuculline alone increases the number of p-ERK1/2 immunoreactive cells, but only in laminae I-IIo. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001. **D-F,** Fluorescence images of PKC $\gamma$  immunopositive (green; D), p-ERK1/2 immunopositive (red; E) and dual labeled neurons (white arrows; F).

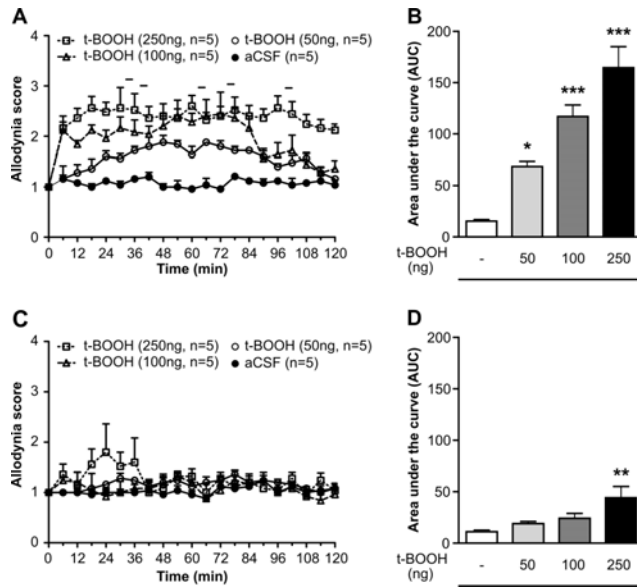
Figure 4



**Figure 5.** Intracisternal application of the GABA<sub>A</sub> receptor agonist, muscimol, prevents capsaicin-induced both spontaneous pain and static mechanical allodynia. **A**, Bar histograms of the duration (mean  $\pm$  SEM) of the rubbing behavior in capsaicin-treated rats which had preemptively received i.c. aCSF (empty bar; n = 5) or muscimol (red bar; n = 5). Spontaneous pain is suppressed in muscimol-treated rats. **B**, Time course of changes (mean  $\pm$  SEM) in behavioral responses (allodynic score) evoked by static mechanical stimuli (6.0 g von Frey hair) applied in the area of secondary hypersensitivity in the same capsaicin-treated rats as **A**, preemptively treated with i.c. muscimol (empty circles) or i.c. aCSF (filled circles). Static mechanical allodynia is suppressed in muscimol-treated rats. \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001.

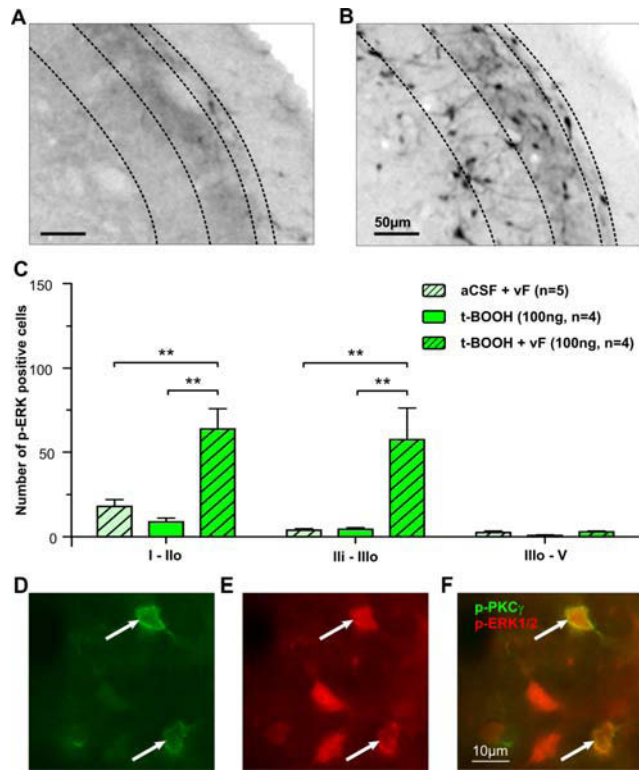
Figure 5





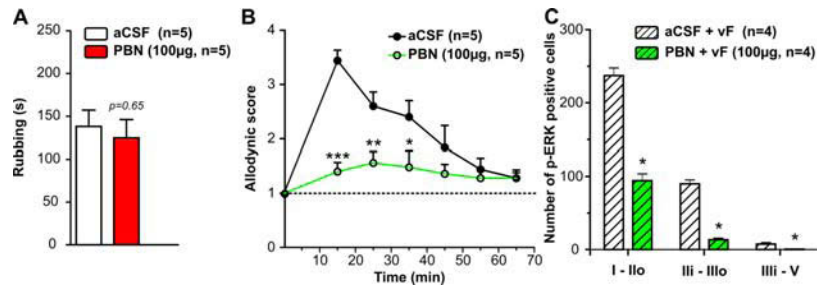
**Figure 6.** Intracisternal application of the ROS donor, t-BOOH, induces a static, but not a dynamic mechanical allodynia. **A, C,** Time courses of changes (mean  $\pm$  SEM) in behavioral responses (alldynic score) evoked by static (6.0 g von Frey hair; **A**) and dynamic mechanical stimuli (air puff; **C**) on the face of rats i.c. injected with aCSF (filled circles) and increasing doses of t-BOOH: 50 (empty circles), 100 (empty triangles) and 250 g (empty squares). **B, D,** Bar histograms of the corresponding areas under the curves (mean  $\pm$  SEM): **B**, for static mechanical stimuli (**A**) and **D**, dynamic mechanical stimuli (**C**). ROS mainly produce a static mechanical allodynia. Nevertheless, there is also a very short dynamic mechanical allodynia with the largest dose of t-BOOH (see in **C** and **D**). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

Figure 6



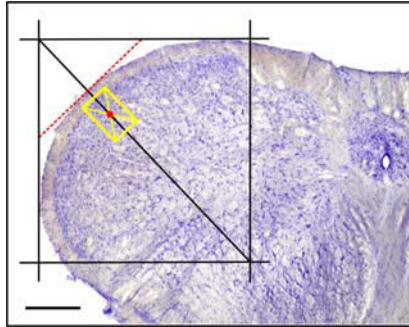
**Figure 7.** Static mechanical stimulation under ROS donor activates a neural circuit which encompasses both superficial and deeper laminae. **A, B**, Images of p-ERK1/2 immunolabeling in the MDH in rats after i.c. t-BOOH with (B) and without (A) static mechanical stimuli (6.0 g von Frey hair). Stippled lines indicate, from dorsal to ventral, the limits of laminae I, IIo and III. There are no or very few p-ERK1/2 immunoreactive cells after i.c. t-BOOH alone whereas many are found in laminae I, IIi, IIo and IIIi after i.c. t-BOOH and static mechanical stimulation. **C**, Bar histograms of the number (mean  $\pm$  SEM) of p-ERK1/2 immunoreactive cells in laminae I-IIo, III-IIIo and IIIi-V, after either aCSF (light green) or bicuculline (dark green), with (hachure) and without 2-min static mechanical stimuli (6.0 g von Frey hair), as indicated on the figure (n = 5 in each group). Static mechanical stimulation can enhance the number of p-ERK1/2 immunoreactive cells in laminae I-IIo and III-IIIo only when it is applied under ROS donor.  $P < 0.01$ ,  $*** P < 0.001$ . **D-F**, Fluorescence images of PKC $\gamma$  immunopositive (green; D), p-ERK1/2 immunopositive (red; E) and dual labeled neurons (white arrows; F) in lamina III of the MDH.

Figure 7



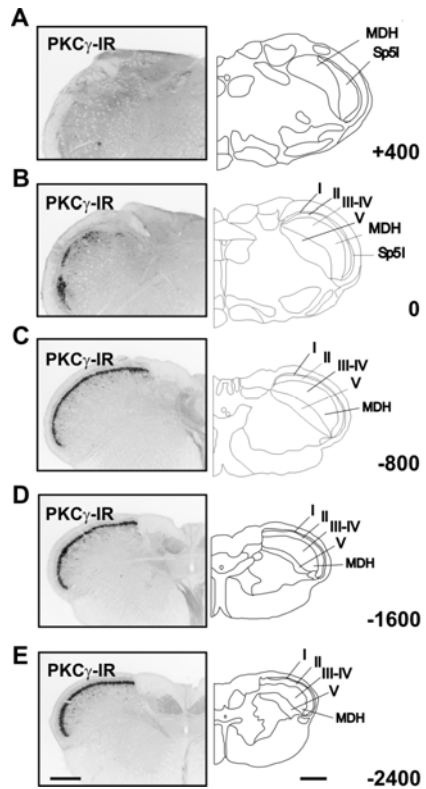
**Figure 8.** Intracisternal application of the ROS scavenger, PBN, prevents capsaicin-induced static mechanical allodynia but not spontaneous pain. **A**, Bar histograms of the duration (mean  $\pm$  SEM) of the rubbing behavior in capsaicin-treated rats which have preemptively received i.c. aCSF (empty bar; n = 5) or PBN (red bar; n = 5). Spontaneous pain is not suppressed in PBN-treated rats. **B**, Time course of changes (mean + SED) in behavioral responses (allodynic score) evoked by 2-min static mechanical stimuli (6.0 g von Frey hair) applied in the area of secondary hypersensitivity in the same capsaicin-treated rats as **A**, preemptively i.c. treated with PBN (empty circles) or aCSF (filled circles). Static mechanical allodynia is suppressed in PBN-treated rats. **C**, Bar histograms of the number (mean  $\pm$  SEM) of p-ERK1/2 immunoreactive cells in laminae I-IIo, Iii-IIIo and IIIi-V in capsaicin-treated rats stimulated for 2-min with static mechanical stimuli (6.0 g von Frey hair) in the area of secondary hypersensitivity, preemptively i.c. injected with either aCSF (empty bars) or PBN (green bars), as indicated on the figure (n = 4 in each group). i.c. PBN prevents stimulus-induced elevation of the number of p-ERK1/2 immunoreactive cells in laminae I-IIo, Iii-IIIo and IIIi-V in capsaicin-treated rats. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001.

Figure 8



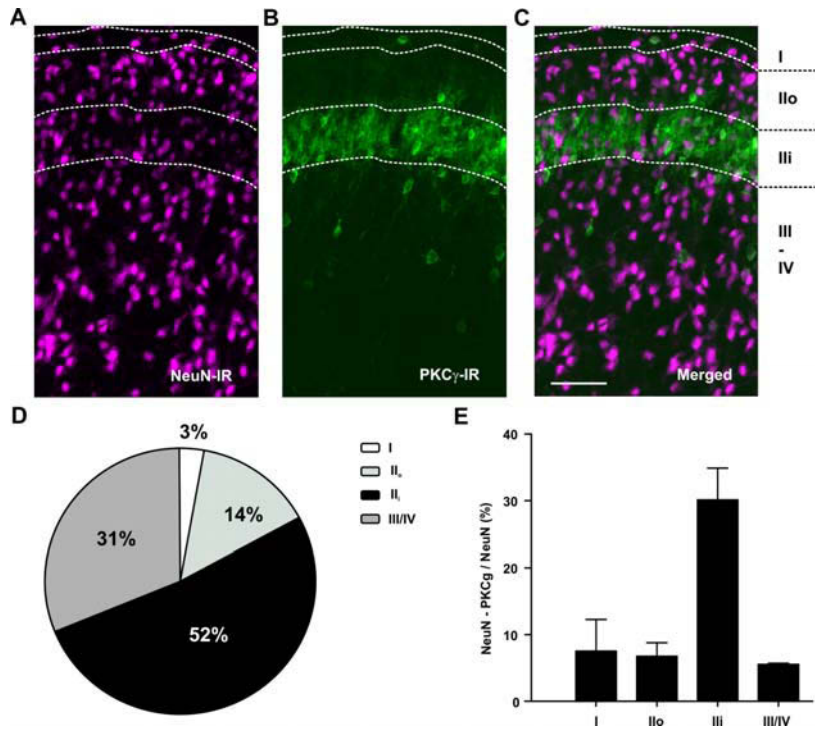
**Figure 1.** Schematic representation of the 300 x 400  $\mu\text{m}$  cell counting window (yellow). Its median axe is positioned perpendicular to the MDH border (red dotted line) and its dorsolateral end at the border between the white and grey matter. The center of this window (red dot) is set on the diagonal of a rectangle enclosing the whole MDH (black). Scale bar = 500  $\mu\text{m}$ .

**Figure 1**



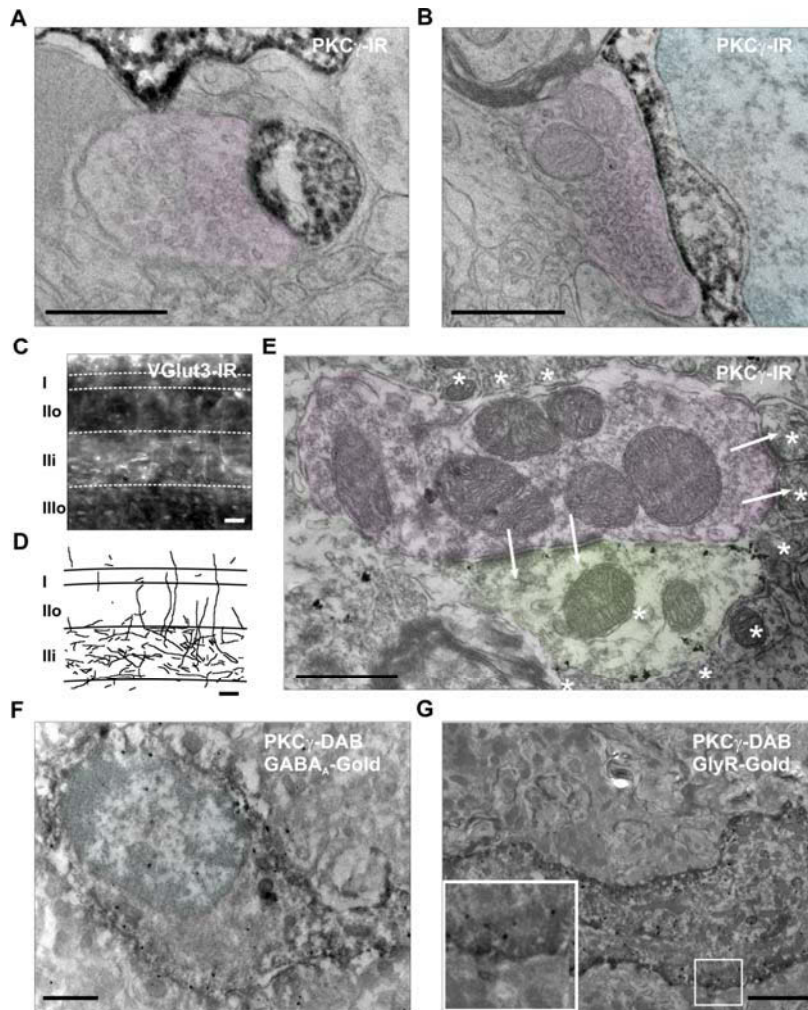
**Figure 2.** A-E: Rostro-caudal distribution of PKC $\gamma$  immunoreactivity within trigeminal MDH. PKC $\gamma$  immunoreactivity in transverse sections at various levels (800  $\mu$ m intervals) of the MDH, from its rostral (0  $\mu$ m; obex apperture) to its caudal end (-2400  $\mu$ m). A transverse section at +400  $\mu$ m, where the MDH and Sp5I overlap with each other, is displayed in addition. On the right are the corresponding schematic drawings of laminar organization. It is clear that PKC $\gamma$  immunoreactivity occupies mainly the inner part of lamina II (lamina II<sub>i</sub>). Thick and dense at the rostral end of MDH (-2400  $\mu$ m), the lamina II<sub>i</sub> band of PKC $\gamma$  immunoreactivity becomes thinner (-1600 and -800  $\mu$ m) and scattered (0  $\mu$ m) when moving rostrally. It has disappeared at +400  $\mu$ m where the MDH and Sp5I are overlapping and the laminar organization is lost. Scale bars = 500  $\mu$ m. I, lamina I. II, lamina II. III, lamina III. IV, lamina IV. V, lamina V. MDH, medullary dorsal horn. Sp5I, spinal trigeminal nucleus interpolar part.

Figure 2



**Figure 3.** Laminal distribution of NeuN and PKC $\gamma$  immunoreactive cells within lamina I-IV of MDH. **A-C:** Confocal images showing NeuN (A), PKC $\gamma$  (B) and merged NeuN and PKC $\gamma$  (C) immunoreactivities in laminae I, II<sub>o</sub>, II<sub>i</sub> and III-IV. Border between layers are shown with dotted lines. Scale bar = 50  $\mu$ m. **D:** Proportion of PKC $\gamma$  immunoreactive cells in laminae I-IV. More than half of the total number of PKC $\gamma$  immunoreactive cells are found in lamina II<sub>i</sub>. **E:** Bar histogram of the relative number of NeuN/PKC $\gamma$  immunoreactive neurons to the total number of NeuN immunoreactive neurons within each lamina I-IV. In lamina II<sub>i</sub> PKC $\gamma$  immunoreactive cells represent about 1/3 of total neurons. Data are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 4).

Figure 3



**Figure 4.** Synaptic inputs to PKC $\gamma$  immunoreactive interneurons. **A, B:** Axodendritic asymmetric (A) and axosomatic symmetric (B) synapses on a PKC $\gamma$  immunoreactive cell (DAB reaction). Scale bars = 500 nm. **C, D:** VGLUT3-immunostaining in the MDH. Light microscopy image through a transverse section of the MDH immunostained to reveal VGLUT3 (C) and the corresponding NeuroLucida reconstruction (D). The dashed lines represent the borders between lamina I and II $_o$ , II $_o$  and II $_i$  and II $_i$  and III. Fibers coming from the Lissauer tract project ventrali through the most superficial layers and form a dense plexus within the inner part of the lamina II. Scale bars = 20  $\mu$ m. **E.** Asymmetric synapse between a primary afferent and a PKC $\gamma$  immunoreactive interneuron (gold particles) in a type II glomerulus. Arrows are across asymmetric synapses between the presynaptic terminal and postsynaptic dendrites (stars). Scale bar = 500 nm. **F.** Colocalization of GABA $_A$  immunoreactivity (gold particles) in a PKC $\gamma$  immunoreactive interneuron (DAB reaction). Scale bar = 1  $\mu$ m. **G.** Colocalization of GlyR immunoreactivity (gold particles) in a PKC $\gamma$  immunoreactive interneuron (DAB reaction). Inset: higher magnification of the box. It shows that gold particles are close to the plasma membrane. Scale bars = 2  $\mu$ m. A, B, E and F: Cell nuclei are drawn in blue, presynaptic elements in magenta and postsynaptic ones in green or black (DAB precipitate).

Figure 4



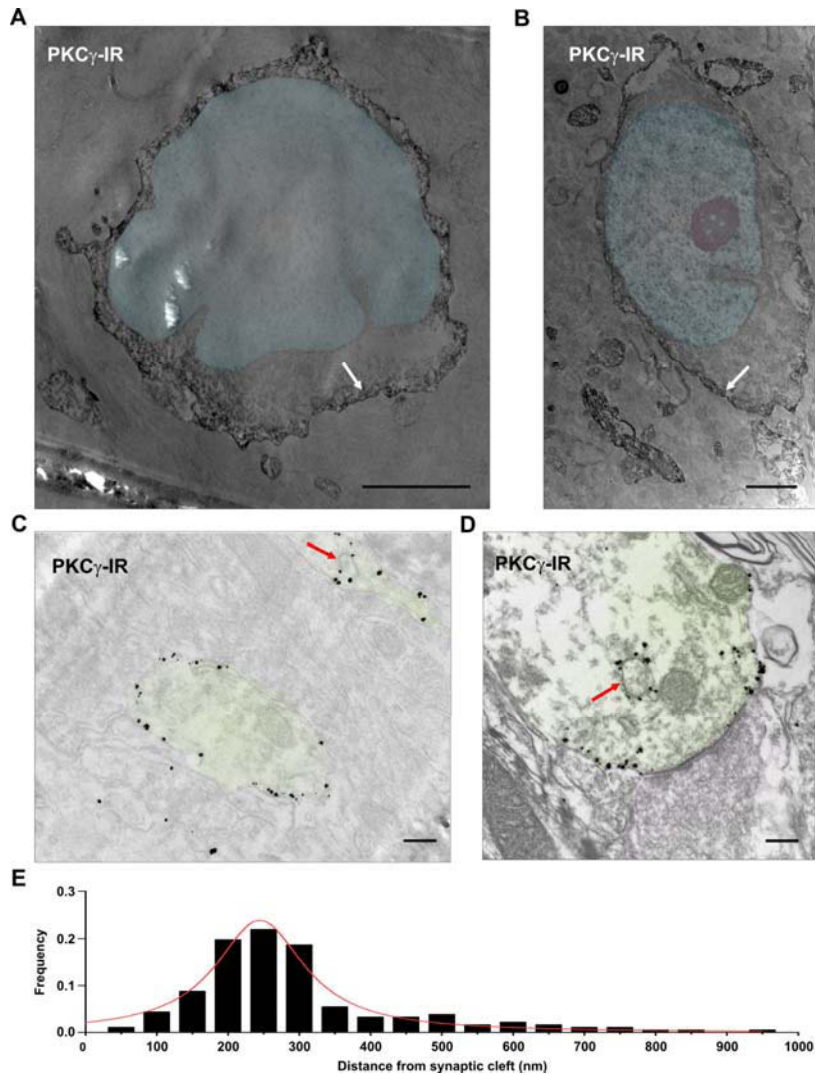


Figure 5

**Figure 5.** Subcellular localization of PKC $\gamma$  immunoreactivity at the electron microscopic level. **A, B:** PKC $\gamma$  immunoreactivity (DAB reaction) in a egg-shaped (A) and fusiform (B) PKC $\gamma$  immunoreactive interneurons. Scale bars = 2  $\mu$ m. **C.** PKC $\gamma$  immunoreactivity (gold particles) in PKC $\gamma$  immunoreactive dendrites. Scale bars = 200 nm. Both techniques demonstrate that PKC $\gamma$  immunoreactivity is predominantly located at plasma membranes (arrows). **D.** Examples of perisynaptic and presumably endosomal (frequently close to asymmetric synapses; red arrow) localizations of PKC $\gamma$  immunoreactivity (gold particles). Scale bars = 200 nm. **E.** Frequency histogram of the distance between PKC $\gamma$  immunogold particles and synaptic clefts. The non linear Lorentzian regression is shown (red line; 3 rats, 15 synapses, 182 particles). PKC $\gamma$  immunoreactivity was very rarely encountered in active zones but frequently formed clusters in the perisynaptic space. A-D: Nuclei are drawn in blue, nucleoli in red, presynaptic elements in magenta and dendrites/postsynaptic elements in green.



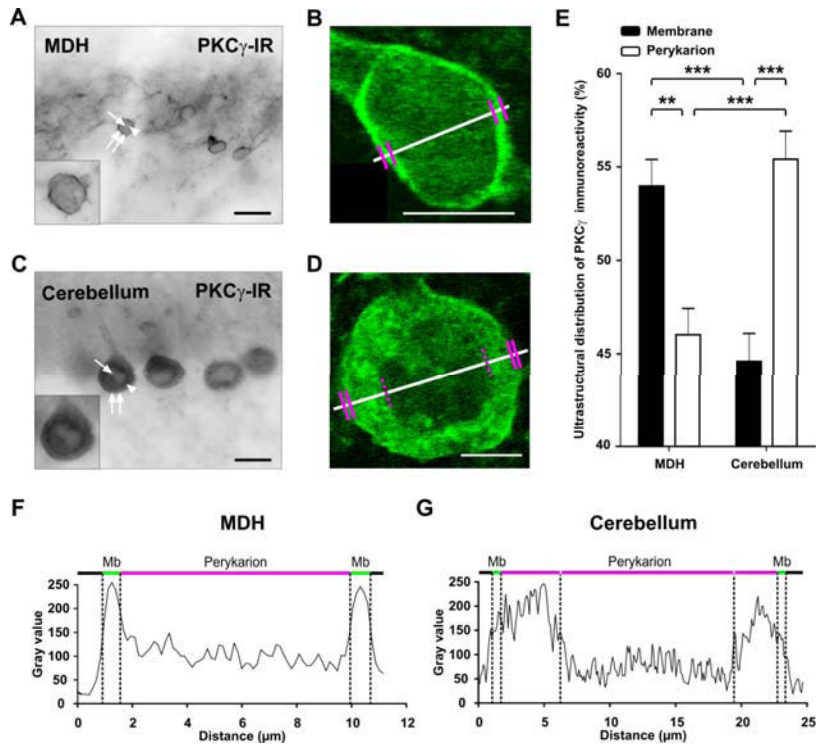


Figure 6

**Figure 6.** Subcellular localization of PKC $\gamma$  immunoreactivity in MDH interneurons and cerebellar Purkinje cells. **A, C:** Light microscopic image from a transverse section through MDH (A) and from a coronal section through cerebellar cortex (C) immunostained for PKC $\gamma$ . Arrow points to the nucleus, double arrows to the plasma membrane and arrowhead to the perykarion. Insets show higher magnifications of the respective selected neurons. Scale bars = 20  $\mu$ m. **B and D:** Confocal images of PKC $\gamma$  immunoreactivity of respectively a MDH lamina II<sub>i</sub> interneuron (B) and cerebellar Purkinje cell (D). Gray values in F and G have been measured along the white lines in B and C, respectively. Magenta lines indicate changes in cellular compartment: plasma membrane membrane, perykarion or presumable nucleus. Scale bars = 10  $\mu$ m. **F, G:** PKC $\gamma$  gray levels measured in cells B and D, respectively. Changes in cell compartment are indicated with dotted lines. **E:** Bar histogram of the relative subcellular localization (plasma membrane: filled bars; perykarion: empty bars) of PKC $\gamma$  immunoreactivity in MDH lamina II<sub>i</sub> interneurons or Purkinje cell. Data are shown as mean  $\pm$  SEM (n=10 per group). \*\*\*, p<0.0001. \*\*, p<0.001. Mb, plasma membrane.

**Table 1. Primary antibodies used in this study**

Antigen	Immunogen	Species, type, manufacturer	Dilution	Reference
GABA $_A$	Extracellular domain of the $\beta$ 2 & $\beta$ 3 subunits of the GABA $_A$ receptor	Mouse monoclonal, Millipore (Molsheim, France), MAB 341	1 :100 (EM)	(Waldvogel et al., 2010)
GlyRa	Spinal cord glycine receptor $\alpha$ 1-subunit (aa 96-105)	Mouse monoclonal, Synaptic System (Goettingen, Germany), SS 146011	1 :200 (EM)	(Miraucourt et al., 2007)
NeuN	NeuN protein	Mouse monoclonal, Millipore (Molsheim, France), MAB 377	1 :1000 (IF)	(Lorenzo et al., 2008)
PKC $\gamma$	C-terminal variable region (aa 684-697) of PKC $\gamma$	Mouse monoclonal, Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France), P 8083	1 :4000 (IF/EM)	(Yevseyenkov et al., 2009)
PKC $\gamma$	C-terminal variable region (aa 679-697)of PKC $\gamma$	Rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), sc-211	1 :5000 (IF) 1 :1000 (EM)	(Miraucourt et al., 2007)
VGLUT3	C-terminal region (aa 564-588) of VGlut3	Guinea-pig polyclonal, Hioki. H. (Kyoto, Japan)	1 :500 (IF/EM)	(Seal et al., 2009)

**Table 2. Secondary antibodies used in this study**

Detection	Host	Immunogen	Manufacturer	Cat. No.	Dilution
Cy2	goat	anti-mouse	Jackson, Newmarket, UK	115-225-003	1:200
Cy2	goat	anti-rabbit	Jackson, Newmarket, UK	111-225-003	1:200
Cy3	goat	anti-mouse	Jackson, Newmarket, UK	115-165-003	1:200
Cy3	goat	anti-rabbit	Jackson, Newmarket, UK	111-165-003	1:200
HRP	goat	anti-mouse	DAKO, Glostrup, Denmark	P0447	1:100
HRP	swine	anti-rabbit	DAKO, Glostrup, Denmark	P0399	1:100
Ultrasmall immunogold	goat	anti-mouse	Aurion, Wageningen, The Netherlands	800-022	1:100
Ultrasmall immunogold	goat	anti-guinea-pig	Aurion, Wageningen, The Netherlands	800-144	1:100

**Table 3.** Composition of cocktails of primary and secondary antibodies

Type of microscopy	Staining	Primary antibody	Secondary antibody
Fluorescence	single	mouse PKC $\gamma$	Cy2 goat anti-mouse
	single	guinea-pig VGLUT3	Cy3 goat anti-guinea-pig
	double	rabbit PKC $\gamma$ mouse NeuN	Cy2 goat anti-rabbit Cy3 goat anti-mouse
Electron	single	mouse PKC $\gamma$	HRP goat anti-mouse
	single	mouse PKC $\gamma$	Ultrasmall nanogold goat anti-mouse
	double	rabbit PKC $\gamma$	HRP swine anti-rabbit
		mouse GlyR $\alpha$	Ultrasmall nanogold goat anti-mouse
	double	rabbit PKC $\gamma$	HRP swine anti-rabbit
		mouse GABA $\Lambda$	Ultrasmall nanogold goat anti-mouse
double	mouse PKC $\gamma$ guinea-pig VGlut3	HRP goat anti-mouse Ultrasmall nanogold goat anti-guinea-pig	

**Table 4.** Neurons of Lamina I, Ilo, Ili, III-IV that express NeuN and/or PKC $\gamma$

	Number of NeuN-IR cells counted	Number of PKC $\gamma$ -IR cells counted	Number of NeuN-IR cells / 100 $\mu$ m <sup>2</sup>	Number of PKC $\gamma$ -IR cells / 100 $\mu$ m <sup>2</sup>	Distribution of NeuN-IR cells (%)	Distribution of PKC $\gamma$ -IR cells (%)	% of NeuN-IR cells that express PKC $\gamma$
I	8 (5-10)	1 (0-1)	14 (7-23)	1 (0-2)	2 (1-3)	3 (3-3)	8 (0-20)
Ilo	70 (51-83)	5 (2-8)	47 (39-58)	3 (2-5)	21 (16-24)	14 (6-25)	7 (4-12)
Ili	61(41-69)	18 (12-24)	34 (23-41)	10 (6-12)	19 (15-21)	52 (38-65)	30 (17-39)
III-IV	189 (158-227)	11 (8-13)	24 (21-28)	1 (1-2)	58 (55-59)	32 (25-41)	6 (5-6)

Results are represented as mean values from 4 rats, with range in parentheses.