Etude des cellules astrocytaires et microgliales thalamiques dans un modèle de douleur neuropathique chez le rat

Lucie Blaszczyk

▶ **To cite this version:**

Lucie Blaszczyk. Etude des cellules astrocytaires et microgliales thalamiques dans un modèle de douleur neuropathique chez le rat. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0081 . tel-01213231

HAL Id: tel-01213231
https://theses.hal.science/tel-01213231

Submitted on 8 Oct 2015

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.

université de BORDEAUX

THESE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

Ecole Doctorale : Science de la Vie et de la Santé

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement

Le 25 Juin 2015

Par Lucie BLASZCZYK

Née le 08 Octobre 1986 à Mont-De-Marsan

Etude des cellules astrocytaires et microgliales thalamiques dans un modèle de douleur neuropathique chez le rat.

Membres du jury :

Marc Landry	Professeur (Bordeaux)	Président
Sophie Pezet	Maître de conférences (Paris)	Rapporteur
Lénaïc Monconduit	Maître de conférences (Clermont-Ferrand)	Rapporteur
Luis Garcia-Larrea	Directeur de recherche (Lyon)	Examinateur
Valérie Fénelon	Professeur (Bordeaux)	Directeur de thèse

“La science consiste à passer d’un étonnement à un autre.”

Aristote, *Ethique à Nicomaque*.

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier mesdames Sophie Pezet et Lénaïc Monconduit qui ont accepté de juger et d'examiner mon travail de thèse ainsi que monsieur Luis Garcia-Larrea d'avoir accepté de l'examiner. Je souhaite également remercier monsieur Marc Landry d'avoir accepté de présider ma soutenance de thèse.

Ensuite je remercie très chaleureusement ma directrice de thèse, Valérie Fénelon, pour toutes ces années passées ensemble lors de mes stages de Licence et de Master et de ces quatre années de thèses. Vous m'avez accompagné tout au long de mes travaux et guidé grâce à vos conseils toujours avisés et votre rigueur scientifique. J'ai énormément appris à vos côtés. J'ai vraiment apprécié toutes nos discussions scientifiques ainsi que nos échanges personnels. Vous m'avez guidé dans mon parcours professionnel, épaulée, soutenue au travail comme dans ma vie personnelle. Ces années nous ont beaucoup rapprochés, ont permis de mieux nous connaitre et j'ai vraiment aimé les passer avec vous comme directrice de thèse. Merci infiniment pour votre soutien sans faille, votre confiance et vos précieux conseils !

Je souhaite également remercier Stéphane Oliet, directeur de l'équipe interactions glie-neurones au sein de l'unité INSERM U862, pour m'avoir accueillie durant toutes ces années et m'avoir soutenue, notamment pour ma quatrième année de thèse.

Je voudrai ensuite remercier toutes les personnes qui m'ont aidé durant ces années. Marlène, Thierry, je vous remercie énormément tous les deux pour tout votre travail, vos aides et vos conseils en microdissection laser et en qRT-PCR durant ces années de thèse et de M2. J'ai découvert de nouvelles techniques passionnantes grâce à vous deux ! Je vous remercie encore pour tout le travail que vous avez réalisé en fin de thèse, qui m'a permis de finaliser de nombreuses expériences.

Je remercie également le chercheur Maurice Garret de m'avoir fournis son protocole de marquage à l'acétylcholine estérase qui m'a permis de visualiser les noyaux thalamiques.

Un grand merci à l'équipe du BIC pour l'accès aux microscopes et aux stations d'analyse et vivent les lutins (qui affectionnent particulièrement les ordinateurs et les disques durs externes…) !

Je souhaite également remercier Yves Le Feuvre pour sa disponibilité pour les petites réunions improvisées et tous ses conseils, toujours très avisés.

Aurélie, merci énormément pour ton aide très précieuse en fin de thèse concernant les animaux ! Je crois que mes poumons et mon système immunitaire peuvent te dire un grand merci… Merci aussi de m'avoir admise dans « le cercle très fermé des neurochirurgiens pour rats », ça fait toujours son petit effet en société… Plus sérieusement merci pour ta disponibilité infaillible, tes conseils en gestion de toutes sortes (produits, animaux, localisation d'objets cachés, de personnes introuvables, organisation d'événements…) et ta bonne humeur !

Ciarán et Silvia, merci infiniment pour votre soutien moral et scientifique sans faille, vos conseils avisés, merci pour toutes les discussions scientifiques et non scientifiques que nous avons partagé, les moments de détente et de fous rires, les thés et les bières...! Malgré mes allergies aux animaux, le labo –et la salle des étudiants- est resté un endroit sympa en très grande partie grâce à vous !

Philippe, merci pour tous tes conseils en immunofluorescence et nos discussions en salle d'immunos. Jean-Marc, merci pour toutes nos discussions musicales passionnées. Vous avez tous les deux contribués, à travers nos discussions, à m'en apprendre d'avantage sur le métier de chercheur.

Je remercie ensuite tous les membres du laboratoire : Aude, merci pour tes conseils en tout genre et ton soutien. Aurélie, j'ai adoré t'expliquer mon travail pendant cette semaine de stage ! Julien, Valentin, Vincent et Muna j'ai aimé discuter avec vous. Valentin, ta migration en salle des

étudiants t'a changé. Je crois que je me rappellerai longtemps de votre jeu de cartes version« calendrier du Musée du Louvres » pendant que je préparai mes images d'immunos sur la station d'analyse… Jérôme, Peggy, Vincent et Nathalie vous étiez là au tout début, merci pour vos conseils et vos discussions. Je n'oublie pas non plus les membres de la société des Neurosciences : Clémence, Isabelle et Francis avec qui j'ai passé de très bons moments, le plus souvent autour de nos repas du midi, des goûters festifs et des repas gargantuesques organisés par le laboratoire!

Merci à toutes les personnes du bâtiment avec qui j'ai discuté, j'ai échangé et qui m'ont aidé à un moment ou un autre. Que se soit au niveau de l'administration, dans les labos, à l'animalerie ou encore avec les étudiants.

Je souhaite particulièrement remercier Olivier Rocat-Lapirot pour nos discussions passionnées et passionnantes sur la douleur, nos échanges de théories… Tu as été une des très rare personnes avec qui pu avoir ce genre de discussion centrée sur mon sujet de thèse : merci ! J'en profite ici pour remercier les membres de l'axe douleur d'avoir organisé ces petites réunions très intéressantes où j'ai beaucoup appris et où j'ai aimé échanger. Ces réunions sont vraiment importantes et permettent de s'ouvrir au-delà de notre propre sujet de recherche.

Je voudrai enfin remercier toute ma famille (belle-famille inclue !) qui m'a soutenue et épaulée pendant ces années de thèse et d'études ! Merci infiniment à tous mes amis (Adeline, Bénédicte, Emeline & Binôme, Laure, …) vous avez toujours été là pour moi… ! Merci aux autres membres du groupe Aequinoctium Sanguinis: les répètes m'ont fait le plus grand bien chaque vendredis… Je sais que vous avez subit des blagues de neurosciences, des commentaires scientifiques, l'avancée de mes manips… votre « torture » ne s'arrêtera pas là !

Je souhaite enfin remercier une personne exceptionnelle, qui a toujours été là pour moi, matin et soir (même le midi !). William, tu as su m'aider dans mon travail en générant la macro qui m'a permis d'automatiser ma nouvelle méthode d'analyse, tu as toujours trouvé des supers idées

pour me faire avancer aussi bien sur des théories que je pouvais émettre que sur des éléments d'informatique ou de bureautique parfois obscurs pour moi. Tu as vécu ma thèse jours après jours, et encore plus intensément ces derniers temps avec l'écriture de mon manuscrit (et merci pour les parties de Senet, une pause ludique efficace pour travailler encore mieux après !)… Tu as toujours su quoi dire dans mes moments de doutes ou d'hésitations et pour cela je te merci infiniment. Si je suis là aujourd'hui c'est aussi grâce à toi. Merci d'être ce que tu es, de penser comme tu le fais et de toujours t'intéresser aux sciences qui ne sont pas de ton domaine. Ces trois derniers mois un nouveau paramètre est entré dans nos vies à tous les deux, un petit être tout mignon en développement que je souhaite également remercier. Alors très cher mini-nous, ta maman a été très heureuse de te porter pendant l'écriture de sa thèse! Grâce à toi je vis ces moments d'écriture comme des moments magiques : mon moral et ma détermination en sont décuplés. Il y aura du temps avant que tu te mettes à lire une thèse de neurosciences, mais quand cela sera le cas, saches que tu y auras un peu contribué ! Je t'aime déjà très fort et papa aussi.

Je vous remercie encore une dernière fois Valérie pour tout ce que vous avez fait pour moi. J'ai vraiment aimé travailler avec vous, vous êtes une directrice de thèse exceptionnelle !

RESUME

La douleur chronique est une pathologie invalidante de longue durée notamment caractérisée par trois symptômes : l'allodynie (un stimulus non douloureux est perçu comme douloureux), l'hyperalgésie (un stimulus douloureux est perçu comme encore plus douloureux) et des douleurs ambulatoires. Quand cette douleur est due à une lésion ou une dysfonction du système nerveux on parle de douleur neuropathique. Chez les patients et les modèles animaux de douleurs neuropathiques, les études ont montré que les neurones thalamiques étaient hyperexcitables. Les cellules gliales, astrocytes et microglies, sont des partenaires synaptiques impliqués dans la transmission et la plasticité synaptique et pourraient être impliqués dans ce phénomène. En effet, ces cellules peuvent modifier leur phénotype lorsque le système nerveux est affecté, elles sont réactives : leur morphologie est hypertrophiée, l'expression d'ARNm et de protéines comme iba-1 (ionized binding-adaptor molecule 1) et CD11b/c (cluster of differentiation 11b/c) pour les cellules microgliales et GFAP (glial fibrillary acidic protein) et S100β (S100 calcium binding protein β) pour les cellules astrocytaires est augmentée. Elles peuvent également libérer des molécules pro-inflammatoires. Tout ceci pourrait générer ou amplifier l'hyperexcitabilité des neurones présents dans le thalamus.

Mon travail de thèse a consisté en l'étude des astrocytes et de la microglie thalamique dans le modèle de douleurs neuropathiques de ligature des nerfs spinaux L5-L6 du nerf sciatique (spinal nerve ligation, SNL). Les symptômes d'allodynie et d'hyperalgésie mécaniques ont été caractérisés par le test des filaments de von Frey et les douleurs ambulatoires par le test de distribution pondéral dynamique. L'expression des ARNm de marqueurs gliaux a été étudiée par une approche de qRT-PCR sur des prélèvements thalamiques et sur des noyaux thalamiques obtenus par microdissection au laser. L'expression neurochimique des marqueurs iba-1, CD11b/c, Cathepsine S, GFAP et S100β a été étudié par immunohistofluorescence en quantifiant le nombre de cellules immunopositives et la surface occupée par les marqueurs. Toutes ces expériences ont été réalisées à J14 et J28 après la chirurgie.

A J14, les animaux SNL développent des symptômes d'allodynie et d'hyperalgésie mécanique ainsi que des douleurs ambulatoires. Chez ces animaux, les cellules microgliales thalamiques présentent des signes de réactivité avec l'augmentation de l'expression des ARNm des marqueurs CTSS et CX3CR1, le récepteur de la fractalkine, marqueurs connus pour leurs implications dans l'hyperexcitabilité neuronale spinale en conditions de douleurs neuropathiques. De plus, l'expression neurochimique des marqueurs gliaux étudiés est diminuée ce qui se traduit notamment par une diminution du nombre de cellules immunopositives pour ces marqueurs chez les animaux SNL. A J28, les symptômes douloureux sont maintenus. De plus, la réactivité microgliale décelée à J14 par qRT-PCR est toujours présente avec l'augmentation de l'expression de l'ARNm codant pour la fractalkine (CX3CL1), partenaire de la voie CTSS/CX3CR1/CX3CL1. La diminution de l'expression neurochimique thalamique des marqueurs gliaux chez les animaux SNL était transitoire et n'est plus présente à J28. En revanche, des signes de réactivité astrocytaire thalamique ont été mis en évidence chez les animaux SNL.

Ainsi, ce travail dévoile une ambivalence au niveau des altérations de la glie thalamique dans ce modèle SNL: une diminution précoce de l'expression des marqueurs gliaux thalamiques suivie d'une réactivité astrocytaire plus tardive concomitante à des signes de réactivité microgliale. De nombreuses expériences sont encore nécessaires pour appréhender l'impact de cette ambivalence gliale thalamique inédite dans un contexte de douleur neuropathique. .

Mots-clef : douleurs neuropathiques, rat, thalamus, astrocyte, microglie

ABSTRACT

Chronic pain is an incapacitating and long lasting pathology mainly characterized by three symptoms: allodynia (a non painful stimulus is perceived as painful), hyperalgesia (a painful stimulus is perceived as more painful) and ambulatory pains. When chronic pain is due to a lesion or dysfunction of nervous system it is called neuropathic pain. In both patients and animal models of neuropathic pain, researchers found that thalamic neurons are hyperexcitable. Glial cells, astrocytes and microglia, are strong synaptic partners involved in synaptic transmission and plasticity and therefore could be involved in this phenomenon. Indeed, these cells can modify their phenotype when nervous system is damaged. They become reactive: their morphology is hypertrophied, mRNA and protein expression of iba-1 (ionized binding-adaptor molecule 1) and CD11b/c (cluster of differentiation 11b/c) for microglia and GFAP (glial fibrillary acidic protein) and S100β (S100 calcium binding protein β) for astrocytes is increased. They could also release pro-inflammatory molecules. All of these could contribute to generate or amplify the thalamic neuronal hyperexcitability.

In my PhD work I studied thalamic astrocytes and microglia in a rat neuropathic pain model of L5-L6 spinal nerves ligation (SNL). Mechanical allodynia and hyperalgesia were characterized with von Frey filament test and ambulatory pain with dynamic weight bearing apparatus. mRNA expression of glial markers were studied with qRT-PCR technique on thalamic punches and laser-microdissected nuclei. Neurochemical expressions of iba-1, CD11b/c, cathepsin S, GFAP and S100β markers were quantified using an immunohistofluorescence approach to count the number of immunopositive cells and surface stained by these markers. All these experiments were done at D14 and D28 after surgery.

At D14, SNL animals develop mechanical allodynia and hyperalgesia as well as ambulatory pain.. For these animals, thalamic microglial cells showed signs of reactivity with the increase mRNA expression of CTSS and CX3CR1, fractalkine receptor, well known markers involved in spinal neuronal hyperexcitability under neuropathic pain conditions. In addition, the number of immunopositive cells for the glial markers is decreased in SNL animals. At D28, the neuropathic pain symptoms are still present. Furthermore, thalamic microglial reactivity found at D14 with qRT-PCRm method is still present with the increased mRNA expression of fractalkine (CX3CL1), partner of CTSS/CX3CR1/CX3CL1 pathway. The decreased neurochemical expression of glial markers found at D14 was transient as I didn't find this result at D28. However, thalamic astrocytic reactivity was found at D28 in SNL animals.

So, this work reveal a new glial process at thalamic level in this SNL model of neuropathic pain : an early decreased expression of glial markers and then a later thalamic astrocytic reactivity concomitant with signs of thalamic microglial reactivity. Numerous studies are required to explore the role of such novel ambivalent glial alterations in the context of neuropathic pain.

Key words: neuropathic pain, rat, thalamus, astrocytes, microglia

Title : Study of thalamic astrocytic and microglial cells in a neuropathic pain model of rat.

LISTE DES PUBLICATIONS

Articles: (les trois premiers sont fournis en annexe)

Cancer pain is not necessarily correlated with spinal overexpression of reactive glia markers.
V. R Ducourneau*, T. Dolique*, S. Hachem-Delaunay‡, L. S Miraucourt‡, A. Amadio, **L. Blaszczyk**, F. Jacquot, J. Ly, L. Devoize, S. H Oliet, R. Dallel, J.-P. Mothet, F. Nagy, V. S Fénelon†, D. Voisin†.
Pain 2014; 155(2):275-91.
*co-premier auteurs; ‡ co-seconds auteurs; † co-derniers auteurs

An eighteen-month Helicobacter infection does not induce amyloid plaque or neuroinflammation in brains of wild type C57BL/6j mice.
C. Roubaud Baudron, L. Chambonnier, A. Buissionnière, A. Giese, N. Macrez, Y. Cho, V. Fénelon, **L. Blaszczyk**, P. Dubus, P. Lehours, F. Mégraud, N. Salles and C. Varon.
Journal of Alzheimer's disease, 2015; 45(4) DOI: 10.3233/JAD-143129

Does Helicobacter pylori infection impact Alzheimer's disease course? An animal study.
C. Roubaud Baudron*, **L. Blaszczyk***, C. Varon, L. Chambonnier, A. Giese, P. Dubus, N. Macrez, S. Pietropaolo, T. Lesté-Lasserre, P. Costet, B. Rousserau, V. Fénelon, Y. Cho, F. Megraud and N. Salles.
En cours de finalisation.
***co-premiers auteurs.**

Thalamic glial cells: new processes in a neuropathic pain model of rat.
Blaszczyk L., Maître M., Lesté-Lasserre T., Oliet S.H.R. and Fénelon V.S..
En préparation.

Communications affichées:

Chronic pain is not necessarily correlated to surexpression of spinal glial activation markers.
V.R.R. Ducourneau, T. Dolique, **L. Blaszczyk**, A. Amadio, R. Dallel, S. Oliet, J.P. Mothet, F. Nagy, D.L. Voisin, and V.S. Fenelon.
10ème colloque de la Société des Neurosciences Françaises, Marseille, Mai 2011

Chronic pain is not always associated with a spinal surexpression of markers of glial activation.
V.R.R. Ducourneau, T. Dolique, **L. Blaszcyk**, A. Amadio, R. Dallel, S.H.R. Oliet, J-P. Mothet, F. Nagy, D.L. Voisin and V.S. Fénelon.
Abcam New Frontiers in persistent pain. Paris, Juin 2011.

Spinal expression of reactive glial markers in two different chronic pain models: bone cancer and neuropathy.
Ducourneau V.R.R., Dolique T., **Blaszczyk L.**, Amadio A., Dallel R., Oliet S., Mothet J. P., Nagy F., Voisin D. L. & Fenelon V. S..
14 ème congrès international de la douleur (IASP). Milan, Août 2012.

Thalamic expression of reactive glial markers in a peripheral neuropathic pain model.
Blaszczyk L., Maître M., Lesté-Lasserre T., Oliet S.H.R. and Fénelon V.S..
3ème symposium du Neurocentre Magendie. Bordeaux, Septembre 2012.

A decreased number of astrocytes and microglia in the thalamus is correlated to the development of chronic pain symptoms.
Blaszczyk L., Maître M., Lesté-Lasserre T., Oliet S.H.R., Fénelon V.S.
13ème Journée de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie. Arcachon, Avril 2013.

Pain, fourteen days after spinal nerve ligation, is correlated to a decreased number of astrocytes and microglia in the thalamic ventroposterolateral nucleus.
Blaszczyk L., Maître M., Lesté-Lasserre T., Oliet S.H.R., Fénelon V.S.
11ème colloque de la Société des Neurosciences Françaises. Lyon, Mai 2013.

Decreased number of astrocyte and microglia in ventroposterolateral thalamic nucleus in a neuropathic pian model of rat.
Blaszczyk L., Maître M., Lesté-Lasserre T., Oliet S.H.R. and Fénelon V.S.
4ème symposium du Neurocentre Magendie. Bordeaux, Octobre 2013.

Early glial alterations in the rat ventroposterolateral thalamic nucleus in a spinal nerve ligation model.
Blaszczyk L., Maître M., Lesté-Lasserre T., Oliet S.H.R., Fénelon V.S..
14ème Journée de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie. Arcachon, Avril 2014.

Pain symptoms are correlated with thalamic glial changes fourteen and twenty eight days after spinal nerve ligature in rats.
Blaszczyk L., Maître M., Lesté-Lasserre T., Oliet S.H.R., Fénelon V.S..
15ème congrès international de la douleur (IASP). Buenos Aires, Octobre 2014.

Impact of Helicobacter pylori infection on Alzheimer's disease: a mouse model study.
C. Roubaud Baudron, **L. Blaszczyk**, C. Varon, L. Chambonnier, N. Macrez, S. Pietropaolo, T. Leste-lasserre, V. Fenelon, Y. Cho, F. Megraud, N. Salles
34ème congrès annuel de la Société Française de Gériatrie et Gérontologie. Paris, Novembre 2014.

Communications orales:

Decreased numbers of astrocytes and microglia in VPL thalamic nucleus: a new process in a neuropathic pain model of rat.
Bordeaux, "Hottopic" Neurocentre Magendie, 16 octobre 2013**.**

Thalamic glial cells: new processes in a neuropathic pain model of rat.
Londres, King's College, 17 février 2015.

Thalamic glial cells: new processes in a neuropathic pain model of rat.
Stockholm, Institut Karolinska, 19 février 2015.

LISTE DES ABREVIATIONS

AChE	acétylcholine estérase
ADNc	ADN complémentaire
Aldh1L1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ANOVA	analysis of variance
Aqp4	aquaporine-4
ATP	adenosine tri-phosphate
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BIC	Bordeaux Imaging Center
CCA	cortex cingulaire antérieur
CCI	chronic constriction injury
CD11b	cluster of differentiation 11b
CD68	cluster of differentiation 68
CGL	corps géniculé latéral
CGM	corps géniculé médian
CL	central latéral
CM	centro-médian
COF	cortex orbito-frontal
COX-2	cyclo-oxygénase 2
CPF	cortex pré-frontal
CPP	cortex pariétal postérieur
CSS1	cortex somatosensoriel primaire
CSS2	cortex somatosensoriel secondaire
Ct	threshold cycle
CTSS	cathepsin S
Cx30	connexin 30
CX3CL1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 ou fractalkine
CX3CR1	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1 ou fractalkine receptor
Cx43	connexin 43
DAAO	D-amino-acid oxidase
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DM	dorso-médian
DRG	dorsal root ganglion

DWB	dynamic weight bearing apparatus
ERK	extracellular signal-regulated kinases
FGF	fibroblast growth factor
GABA	acide γ-aminobutyrique
GDNF	glial cell derived neurotrophic factor
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GLAST	glial high-affinity glutamate transporter
GLT-1	glutamate transporter 1
GS	glutamine synthase
Iba-1	ionized binding adaptator molecule 1
IL	intralaminaires
IL-10	interleukin 10
IL-1β	interleukin 1 beta
IL-34	interleukin 34
IL-6	interleukin 6
iNOS	inducible nitric oxyde synthase
JNK	c-Jun N-terminal kinases
LAA	L-α-aminoadipate
LPS	lipopolysaccharide
MCT-4	monocarboxylic acid transporter 4
MHC II	complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
MMP2	matrix métallopeptidase 2
NAA	N-acétylaspartate
NES	nestine
NFκB	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
NGF	nerve growth factor
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NO	monoxyde d'azote
NS	nociceptif spécifique
NTF3	neurotrophine 3
NTF4	neurotrophine 4
P2RX1	purinergic receptor P2X, ligand gated ion channel, 1
P2RX4	purinergic receptor P2X, ligand gated ion channel, 4
P2RX7	purinergic receptor P2X, ligand gated ion channel, 7
P2RY1	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 1
P2RY12	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 12

P2RY13	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 13
P2RY5	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 5
P2RY6	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6
p38 MAPK	p38 mitogen-activated protein kinases
PC	paracentral
Pf	parafasciculaire
PGE2	prostaglandine E2
PKCα	protein kinase c α
Po	noyau postérieur
PSNL	partial sciatic nerve ligation
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
ROI	region of interest
S100β	s100 calcium binding protein β
SCI	spinal cord injury
SDF-1	stromal cell derived factor 1
Sdha	succinate dehydrogenase complex, subunit A
Slc14a1	solute carrier family 14, member 1
Slc4a4	solute carrier family 4, member 4
SNI	spared nerve injury
SNL	spinal nerve injury
TCA	tricyclic antidepressant
TGFb	transforming growth factor β
TLR3	toll-like receptor 3
TLR4	toll-like receptor 4
TNF-α	tumor necrosis factor alpha
TRPV1	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1
TSPO	translocator protein of 18kD
VIM	vimentine
VMpo	partie postérieure du noyau ventromédian
VPI	ventropostéroinférieur
VPL	ventropostérolatéral
VPM	ventropostéromédian
VRAC	volume-regulated anion channels
WDR	wide dynamic range

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS **1**
RESUME **5**
ABSTRACT **6**
LISTE DES PUBLICATIONS **7**
LISTE DES ABREVIATIONS **9**
TABLE DES MATIERES **13**
INTRODUCTION **19**
I- Les cellules gliales, physiologie et fonctions **19**

A- Découverte et évolution du concept de la cellule gliale **19**
B- Les Astrocytes **22**

B.1- Morphologie astrocytaire : un système nerveux étoilé 22
B.2- Astrocyte : quel phénotype ? 25
B.3- Astrocytes, quelles fonctions au sein du système nerveux ? 40

C- La microglie **42**

C.1- Morphologie microgliale 43
C.2- Microglie : quel phénotype ? 45
C.3- Microglie, quelles fonctions au sein du système nerveux ? 52

II- La douleur, une expérience sensorielle complexe **56**

A- De l'antiquité à nos jours, un concept en perpétuelle évolution **56**
B- L'environnement : un protagoniste important **62**

III- Du stimulus douloureux à sa perception consciente **65**

A- Du stimulus aux voies ascendantes **65**
B- Le thalamus, une structure clef dans l'intégration de la nociception **74**

B.1- Le groupe latéral 77
B.1- Le groupe médian 78
B.2- Le groupe postérieur 78
B.3- Le groupe des noyaux intralaminaires 80
B.4- Le noyau réticulaire 81

C- L'intégration corticale : l'éveil de la conscience **82**
D- Le concept de la matrice centrale de douleur **84**

IV- Quand la douleur devient pathologique : la douleur chronique **86**

A- La douleur chronique : une pathologie invalidante 86
B- La douleur chronique, un singulier pluriel 88

V- Quels modèles animaux pour l'étude de la douleur neuropathique? 90

A- Modèles animaux de douleur neuropathique : comment induire la douleur ? 91

A.1- Modèle de transsection du nerf sciatique 91
A.2- Modèle de constriction chronique du nerf sciatique 92
A.3- Modèle de ligature partielle du nerf sciatique 94
A.4- Modèle du nerf sciatique épargné 95
A.5- Modèle de ligature des nerfs spinaux L5/L6 96

B- Modèles animaux de douleur neuropathique : comment appréhender la douleur ? 98
C- Complexité et limites des modèles animaux 99

C.1- Complexité des modèles animaux 99
C.2- Limites et critiques des modèles animaux de douleur neuropathique 102

VI- La douleur neuropathique : entre hyperexcitabilité neuronale et réactivité gliale 103

A- Une sensibilisation périphérique 104
B- Une sensibilisation centrale 105

B.1- Les mécanismes possibles 106
B.2- Réactivité gliale et rôles des interactions neurones-glie 108

C- Quelles thérapies proposer? 114

C.1- Les approches pharmacologiques 115
C.2- Les traitements chirurgicaux 116
C.3- Les nouvelles approches thérapeutiques 118

VII- Douleur neuropathique et thalamus : des rôles complexes 120

A- Douleur neuropathique: une hyperactivité neuronale thalamique 122
B- Douleur neuropathique: une hypoperfusion/hypoactivité thalamique 124
C- Douleur neuropathique: une hyperexcitabilité neuronale et une hypoactivité thalamique 127
D- Douleur neuropathique : une atrophie thalamique 128
E- Douleur neuropathique : une réactivité gliale thalamique ? 130

VIII- Hypothèse de travail et objectifs du travail de thèse 134

A- Hypothèse de travail 134
B- Objectifs du travail de thèse 135

MATERIEL ET METHODES 137
I- Animaux et conditions d'hébergement 137

II- Etablissement du modèle de douleur neuropathique: ligature des nerfs spinaux L5 et L6 (SNL) 138

A- La chirurgie de ligature des branches spinales L5-L6 du nerf sciatique 138
B- Suivi post-chirurgical 140

III- Etude du comportement douloureux 141

A- Test des filaments de von Frey 142

A.1- Approche expérimentale 142
A.2- Méthode de quantification des scores douloureux 143

B- Test de distribution pondérale dynamique 145

B.1- Approche expérimentale 145
B.2- Méthode de quantification 146

IV- Euthanasie des animaux et prélèvement des tissus cérébraux 148

A- Euthanasie par décapitation 148

A.1- Prélèvement de tissus thalamiques 148
A.2- Prélèvement des cerveaux entiers 149

B- Euthanasie et perfusion intracardiaque 149

V- Etude de PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) 150

A- Etapes préliminaires spécifiques aux prélèvements de tissus thalamiques 150
B- Etapes préliminaires spécifiques à l'approche de microdissection laser ... 152
C- Etapes communes du protocole de qRT-PCR 153
D- Séquences des amorces utilisées dans ces études de qRT-PCR 157

VI- Etudes neurochimiques: histochimie et immunohistofluorescence 159

A- Histochimie : présence de l'acétylcholine estérase 160
B- Immunohistofluorescence: étude de marqueurs gliaux 161

VII- Acquisitions et quantifications des marquages de l'étude neurochimique 166

A- Acquisitions des images 166

A.1- Spinning disk 166
A.2- Scanner de lames 167

B- Quantifications 169

B.1- Détermination du pourcentage de la surface occupée par les marqueurs gliaux et du nombre de cellules immunomarquées sous MetaMorph 169
B.2- Comptage stéréologique des cellules Iba-1 positives sous MERCATOR 171

VIII- Analyses statistiques 172

RESULTATS 174
I- Quatorze jours après la ligature des nerfs spinaux : développement des symptômes douloureux et diminution concomitante du nombre de cellules thalamiques exprimant des marqueurs gliaux 174

A- Développement des symptômes douloureux chez les animaux SNL entre J0 et J14 174

A.1- Allodynie et hyperalgésie mécaniques 174
A.2- Douleurs ambulatoires 180

B- Des signes de réactivité microgliale thalamique par approche de qRT-PCR 182

B.1- qRT-PCR sur prélèvements de tissus thalamiques 183
B.2- qRT-PCR sur tissus thalamiques obtenus par microdissection laser 193

C- Diminution du nombre de cellules thalamiques exprimant des marqueurs astrocytaires et microgliaux 200

C.1- Les cellules microgliales : approche immunohistochimique 201
C.2- Les cellules astrocytaires : surface immunomarquée et nombre de cellules immunopositives 225

II- Vingt-huit jours après la ligature des nerfs spinaux : maintien des symptômes douloureux et indices de réactivité gliale thalamique 242

A- Maintien des symptômes douloureux chez les animaux SNL 242

A.1- Allodynie et hyperalgésie mécaniques 242

A.2- Douleurs ambulatoires....244

B- Poursuite des signes de réactivité microgliale thalamique par approche de qRT-PCR....246

B.1- qRT-PCR sur prélèvements de tissus thalamiques....246
B.2- qRT-PCR sur tissus thalamiques obtenus par microdissection laser....257

C- Des signes de réactivité astrocytaire par approche immunohistochimique....261

C.1- Les cellules microgliales : approche immunohistochimique....261
C.2- Les cellules astrocytaires : surface immunomarquée et nombre de cellules immunopositives....278

DISCUSSION....292
I- La méthodologie à l'épreuve de la réalité....292

A- Le plan expérimental....292
B- qRT-PCR sur prélèvements de tissus nerveux versus sur noyaux cérébraux obtenus par microdissection laser....295
C- Comptes cellulaires dans un seul plan focal versus approche stéréologique....296
D- Nouvelle quantification des comportements douloureux obtenus par stimulation mécanique statique....297
E- Le problème de la structure cérébrale contrôle....298

II- De nouvelles données sur les comportements douloureux des animaux sham et SNL....299

III- La microglie thalamique en condition contrôle et en condition de douleurs neuropathiques....302

A- Le phénotype microglial dans le thalamus des animaux naïfs....302
B- Des signes moléculaires de réactivité microgliale thalamique en condition de douleurs neuropathiques....303
C- Une étonnante diminution transitoire du nombre de cellules thalamiques exprimant des marqueurs microgliaux en condition de douleurs neuropathiques....305

IV- Les astrocytes thalamiques en condition contrôle et en condition de douleurs neuropathiques....308

A- Le phénotype astrocytaire dans le thalamus des animaux naïfs....308

B- Une étonnante diminution transitoire du nombre de cellules thalamiques exprimant des marqueurs astrocytaires en condition de douleurs neuropathiques 309
C- Des signes plus tardifs de réactivité astrocytaire thalamique en condition de douleurs neuropathiques 311

V- Microglie et astrocytes thalamiques : un rôle dans le développement et le maintien de la douleur neuropathique ? 313

BIBLIOGRAPHIE 315
PUBLICATIONS 352

INTRODUCTION

I- Les cellules gliales, physiologie et fonctions

A- Découverte et évolution du concept de la cellule gliale

Au cours du XIX^{ème} siècle, les progrès de la science et de la biologie en particulier sont exponentiels. Le XIX^{ème} siècle est l'époque des grands débats théoriques suite aux découvertes successives liées au développement de la paléontologie, de la cytologie, de la bactériologie, de la physiologie expérimentale… C'est l'essor de la méthode scientifique et expérimentale.

Le point de départ de notre histoire sur l'évolution du concept de cellule gliale est l'année 1839, lorsque les botanistes et physiologistes allemands Matthias J. Schleiden (1804-1881) et Theodor A. Schwann (1810-1882) proposent la Théorie Cellulaire. Dans cette théorie, ils présentent la cellule comme unité morpho-physiologique de tout le vivant. En 1856, le pathologiste allemand Rudolf L. C. Virchow (1821-1902) propose le nom de neuroglie, ou Nervenkitt (littéralement « colle- neurone ») pour décrire la substance qui comble tous les espaces entre neurones et dans laquelle il observe des cellules. Le terme est resté pour nommer les cellules gliales alors qu'originellement il décrivait la substance interstitielle et non les éléments cellulaires. De plus, Virchow pensait qu'il s'agissait d'un tissu conjonctif alors que nous verrons que la macroglie est d'origine ectodermique (et non mésodermique). En 1865, dans une publication posthume rendue possible par un ami, le médecin allemand Otto F. K. Deiters (1834-1863) décrit des cellules non-neuronales dans le système nerveux : il s'agit de cellules qui n'ont pas d'axones et correspondent à ce que nous décrivons aujourd'hui comme des astrocytes. L'histologiste italien Camillo Golgi (1843-1926) par l'utilisation de colorants de type carmin/hématoxyline et la mise au point de sa méthode de coloration au bichromate de potassium/argent confirme les données de Deiters. Il existe bien des cellules qui ne sont pas des neurones dans le système nerveux et il

observe même des différences entre la substance grise (il décrit des cellules en forme d'étoiles qui émettent de nombreux prolongements dont certains vont au contact de capillaires) et la substance blanche (il décrit des cellules alignées dont les prolongements semblent contacter des axones). Ces cellules correspondraient actuellement aux astrocytes et oligodendrocytes. Un faisceau d'arguments et d'observations scientifiques conduit à penser que les cellules gliales jusque-là observées seraient issues de cellules épendymaires qui bordent les ventricules. Elles auraient donc une origine ectodermique. L'histologiste espagnol Santiago Ramon y Cajal (1852-1934) qui a utilisé la méthode de coloration de Golgi en l'adaptant est un fervent défenseur de cette origine ectodermique.

En 1893, Mihály Lenhossék (1863-1937), anatomiste et histologiste hongrois, propose le nom d'astrocyte pour décrire les cellules gliales en forme d'étoile.

Entre 1889 et 1893, Rudolf A. von Kölliker (1817-1905) et William L. Andriezen différencieront une glie fibreuse (dans la substance blanche) et une glie protoplasmique (dans la substance grise). Une fois le nom d'astrocyte accepté, cette distinction aboutira à la notion d'astrocytes fibreux et protoplasmiques. En 1913 Santiago Ramón y Cajal, en mettant au point une coloration plus spécifique de la neuroglie utilisant du chlorure d'or, décrit un troisième élément qui n'est ni un neurone ni un astrocyte. En 1920, Pio del Río Hortega (1882-1945), médecin et chercheur espagnol, met au point sa propre méthode de coloration au carbonate d'argent qui colore spécifiquement le troisième élément. Ce troisième élément apparaitra en fait constitué de deux types cellulaires : les oligodendrocytes et la microglie. Très vite pour Pio del Río Hortega les oligodendrocytes appartiennent à la famille classique des cellules gliales d'origine ectodermique alors que les cellules microgliales forment une famille à part : elles sont d'origine mésodermique et ont des propriétés migratoires et de phagocytose. A l'heure actuelle on distingue la macroglie, regroupant les différents types d'astrocytes, les oligodendrocytes, les épendymocytes (pour le système nerveux central) et les cellules de Schwann et satellites (pour le système nerveux périphérique), et la microglie contenant quant à elle les cellules microgliales. On notera que la

description d'une gaine qui présentait des noyaux autour des axones du système nerveux périphérique date de 1838 par Robert Remak (1815–1865) et de 1839 par Theodor Schwann (1810–1882). Cette description précède donc le terme de neuroglie proposé par Virschow alors qu'elle présente clairement ce qui sera plus tardivement appelé les cellules de Schwann.

Dès les travaux de Golgi, des fonctions pour les cellules gliales ont été proposées. Ainsi, la proximité des prolongements astrocytaires avec d'une part les vaisseaux sanguins et d'autre part les neurones a fait supposer que les astrocytes pouvaient jouer un rôle trophique vis-à-vis des neurones. Cette hypothèse a été confirmée. Le frère de Santiago Ramon y Cajal a proposé que les astrocytes isolent physiquement les neurones les uns des autres. Même si cette théorie n'a pas été confirmée, elle a le mérite d'être une des premières propositions d'interactions neurones-astrocytes et elle fut reprise pour les cellules de Schwann et les oligodendrocytes. Dès 1910, Jean Nageotte (1866-1948), neurologue et neuroanatomiste français, a décrit des vésicules sécrétoires dans des cellules gliales et a émis l'hypothèse que les cellules gliales seraient l'équivalent d'une glande endocrine. Nous verrons qu'à l'heure actuelle on a démontré que certaines cellules gliales libèrent des gliotransmetteurs et ont donc une activité sécrétoire.

Nous savons aujourd'hui qu'au cours de l'évolution phylogénétique, la présence des cellules gliales au sein du système nerveux augmente. Ainsi, il y aurait moins de 20% de cellules gliales parmi les cellules présentes dans le système nerveux de *C. elegans* (Oikonomou and Shaham, 2011) alors qu'il y en aurait 40% dans le cerveau de rat (Herculano-Houzel and Lent, 2005) et jusqu'à 50% dans le cerveau humain (Azevedo et al., 2009). Par contre, il reste encore de très nombreuses questions sans réponse au sujet des cellules gliales aussi bien sur leur physiologie et leurs fonctions que leurs rôles en conditions pathologiques. En effet, les cellules gliales ont longtemps été délaissées au profit des neurones puisqu'elles étaient considérées comme passives et qu'elles n'ont pas les propriétés électriques des neurones. Cependant, les dernières décennies ont vu un engouement exceptionnel pour ces cellules gliales. Aujourd'hui, les cellules gliales sont reconnues comme étant des clefs de voûte du système nerveux, des partenaires

synaptiques importants et nécessaires au bon fonctionnement du système nerveux. Mon sujet de thèse s'est intéressé spécifiquement aux astrocytes et cellules microgliales, je vais donc présenter ces deux types cellulaires plus en détails.

B- Les Astrocytes

Astrocyte vient du grec *ἄστρον* et *κύτος*, respectivement *étoile* et *cavité ou cellule*. Ces cellules étoilées ont pour origine embryonnaire le neurectoderme. J'aborderai leurs caractéristiques morphologiques dans un premier temps puis présenterai les protéines et marqueurs principaux des astrocytes. Enfin, je décrirai le phénomène de réactivité astrocytaire et ses caractéristiques et détaillerai leurs différentes fonctions dans un dernier temps.

B.1- Morphologie astrocytaire : un système nerveux étoilé

Les astrocytes sont des cellules ramifiées, possédant de nombreux prolongements n'excédant pas 50µm à 100µm de longueur (ces chiffres ont été obtenus sur des astrocytes de rats ; Wilhelmsson et al., 2006). La morphologie de ces cellules peut varier en fonction de la structure nerveuse dans laquelle l'astrocyte se trouve, ou encore de sa réactivité comme nous le verrons plus tard.

Il existe plusieurs types d'astrocytes, classés en fonction de leur morphologie. Les astrocytes dits protoplasmiques présents dans la substance grise, possèdent de nombreux prolongements, assez épais et situés proches des synapses. Les astrocytes dits fibreux, présents majoritairement dans la substance blanche, ont des prolongements moins nombreux, plus fins mais plus longs. Enfin, la glie radiaire ou astrocyte orienté radialement, qui est impliqué dans le développement du cerveau, subsiste chez l'adulte dans la rétine en tant que cellule de Müller, dans les organes circumventriculaires en tant que tanycyte et dans le cervelet en tant que cellule de Bergmann. Dans le reste du système nerveux central (par exemple moelle épinière, hippocampe) on parlera d'astrocytes radiaux. On notera que le terme de glie radiaire devrait être à proprement parler

réservé aux astrocytes bipolaires qui présentent de longs prolongements en contact avec la surface ventriculaire (tanycytes et cellules de Müller).

L'astrocyte protoplasmique est le type d'astrocyte le plus étudié car il présente des contacts à la fois avec les vaisseaux sanguins et les neurones (Fig. 1A). Des études où les astrocytes protoplasmiques ont été remplis intracellulairement avec des marqueurs appropriés (ou les exprimant de manière génétique) ont permis de révéler leurs prolongements les plus fins (Fig. 1B). Ces études réalisées dans l'hippocampe (Bushong et al., 2002; Ogata et Kosaka, 2002) et le cortex (Halassa et al., 2007) ont montré que chaque astrocyte possède son propre territoire et ne vient que très peu empiéter sur le domaine de l'astrocyte voisin (environ 5% ; Fig. 1C). De plus, il a été estimé qu'un astrocyte protoplasmique de cortex de rat enveloppait 4 à 8 corps cellulaires de neurones et 300 à 600 dendrites (Halassa et al., 2007). Dans l'hippocampe de rat, il a été estimé qu'un seul astrocyte pouvait contacter jusqu'à 140 000 synapses (Bushong et al., 2002). Ce dernier chiffre pourrait atteindre les deux millions dans le cortex humain (Oberheim et al., 2006). De plus, les astrocytes peuvent former un réseau astrocytaire, encore appelé syncytium astrocytaire (Fig. 1D), pouvant connecter quelques astrocytes entre eux, des astrocytes appartenant au même tonneau cortical ou encore une centaine d'astrocytes (D'Ambrosio et al., 1998; Houades et al., 2008; Konietzko et Müller, 1994). L'étendue de ce couplage varie en fonction de la structure mais aussi au cours du développement et en fonction de l'état physiologique (pour revue voir Giaume et al., 2010). Les astrocytes sont couplés grâce à la présence de jonctions communicantes ou jonctions gap qui sont constituées de connexines. Les connexines sont des protéines transmembranaires qui s'organisent en un hémicanal appelé connexon (six connexines). Deux connexons se font face (un sur chaque cellule couplée) et forment un pore entre les deux cytoplasmes. Les connexines majoritairement présentes au sein des astrocytes sont les connexines 30 (Cx30) et 43 (Cx43) (Blomstrand et al., 2004; Cahoy et al., 2008; Dermietzel et al., 1991, 1991; Houades et al., 2008; Rouach et al., 2008). Enfin, les astrocytes présentent des extrémités spécialisées appelées podocytes qui viennent en contact

avec des artérioles et des capillaires sanguins. Ils participent donc à la barrière hématoencéphalique. Les astrocytes protoplasmiques occupent donc des positions stratégiques qui pourraient leur permettre de réguler les entrées-sorties entre le système nerveux central et le système circulatoire, le diamètre des artérioles ainsi que l'activité neuronale.

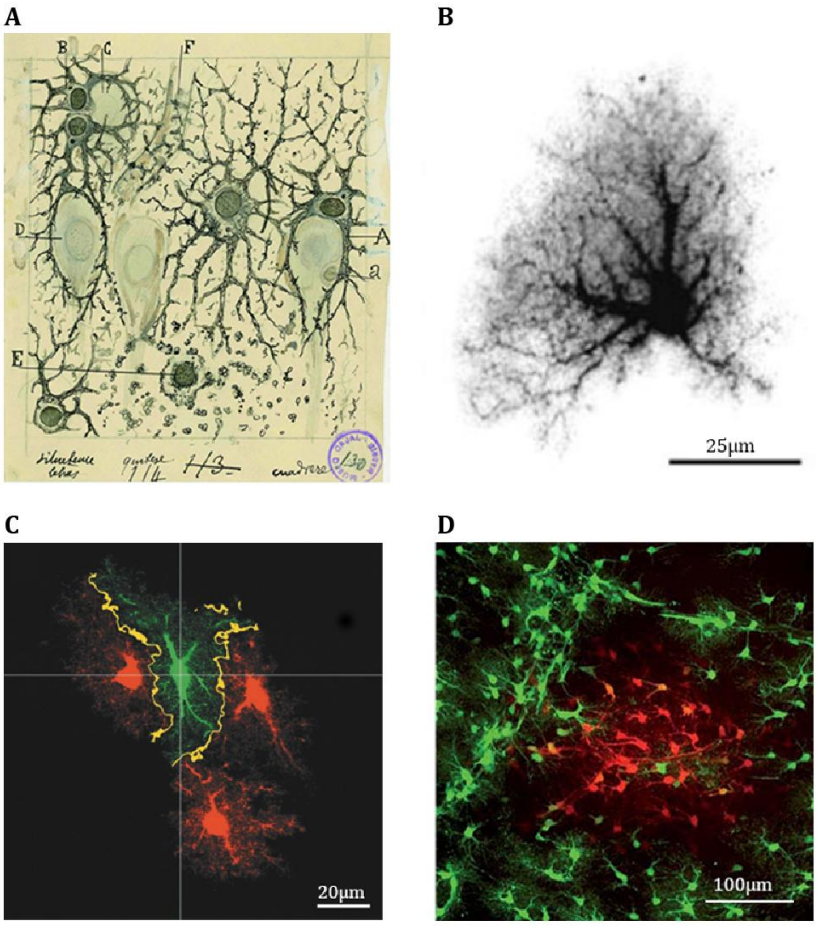


Figure 1 : Morphologie astrocytaire. En A, une illustration de Ramon y Cajal, représentant des astrocytes. La lettre A pointe un astrocyte large autour d'un neurone pyramidal indiqué en a. Au niveau de la lettre B, des astrocytes jumeaux forment un nid autour d'une cellule indiquée par la lettre C. La lettre D indique une cellule entourée par deux branches astrocytaires d'un même astrocyte. Au niveau de la lettre E, une cellule présente des signes d'autolyse et la lettre F pointe un vaisseau sanguin. La microphotographie en B présente la morphologie ramifiée d'un astrocyte injecté avec un colorant fluorescent (adaptée de Wilhelmsson et al, 2006). L'image C est une illustration de l'existence de domaines astrocytaires (adaptée de Bushong et al, 2002). On remarque le recouvrement limité (couleur jaune) entre le domaine de l'astrocyte coloré en vert et les domaines des astrocytes colorés en rouge. En D, la photographie adaptée de Rouach et al, 2008 illustre l'existence d'un réseau astrocytaire. L'illustration a été obtenue chez des souris qui expriment l'eGFP sous le contrôle du promoteur de la GFAP. De la sulforhodamine B, un colorant fluorescent rouge qui passe les jonctions gap, a été dialysé pendant 20 minutes à travers une pipette d'enregistrement au sein d'un astrocyte périvasculaire. Notez le grand nombre d'astrocytes où la sulforhodamine B a diffusé. Ainsi, les astrocytes peuvent appartenir à un vaste réseau, le syncytium astrocytaire, couplés entre eux par des connexines. On notera que tous les astrocytes

où la sulforhodamine a diffusé n'expriment pas la glial fibrillary acidic protein (GFAP) car ils n'apparaissent pas tous en jaune.

La morphologie des astrocytes est bien établie, cependant, quels sont les marqueurs spécifiques à ces cellules ? Quel phénotype les caractérise et permet de déterminer avec précision s'il s'agit de cellules astrocytaires ou non ?

B.2- Astrocyte : quel phénotype ?

Pour identifier de manière fiable les astrocytes, nous devons disposer de critères spécifiques. Je montrerai dans un premier temps que les astrocytes expriment une myriade de récepteurs, transporteurs et canaux. Je présenterai ensuite quels sont les marqueurs caractéristiques des cellules astrocytaires. Et nous verrons que de nombreux marqueurs, bien que très utilisés, ne permettent pas d'objectiver l'ensemble des astrocytes ou ne sont pas spécifiques des seules cellules astrocytaires. Dans une troisième partie, j'aborderai une caractéristique particulière des astrocytes qui est leur réactivité.

B.2.1- Protéines exprimées par les astrocytes

Les astrocytes, nous l'avons vu, sont très nombreux dans le système nerveux et sont proches des capillaires et des neurones. Sont-ils en capacité de recevoir des messages de leur environnement et en retour de produire de l'information intelligible par les autres cellules du système nerveux ? Pour permettre cette communication intercellulaire, il est nécessaire de posséder un nombre important de capteurs et de pouvoir exprimer un grand nombre de signaux, permettant des réponses variées et adaptées à chacune des situations qui peuvent être rencontrées. Les astrocytes sont effectivement équipés d'un arsenal de récepteurs, transporteurs, pompes et canaux et sont capables de libérer des molécules de signalisation.

Les astrocytes expriment de nombreux canaux ioniques voltage-dépendants à leur membrane *in vitro* (Bevan et al., 1985) et *in vivo* ((Bordey et Sontheimer, 2000; Matute et Miledi, 1993). Il s'agit de canaux potassiques, calciques et chlorures voltage-dépendants. Ils possèdent aussi des canaux ioniques sensibles au calcium (potassiques et chlorures ; Park et al., 2009; Price et al.,

2002), au volume (volume-regulated anion channels : VRAC ; Mongin et Kimelberg, 2002) ou à l'adénosine tri-phosphate (ATP ; canaux potassiques à rectification entrante importants pour le potentiel de repos des astrocytes; Ransom and Sontheimer, 1995) ainsi que des canaux à eau de type aquaporine 4 (Aqp4 ; Nielsen et al., 1997). Au-delà des pompes, échangeurs et co-transporteurs ioniques classiques, les astrocytes expriment des transporteurs du glutamate (transporteur du glutamate de type 1 ou GLT-1 et transporteur du glutamate/aspartate ou GLAST ; Rothstein et al., 1994) et des transporteurs du lactate ou transporteur monocarboxylique (MCT) de type 4 (Pierre et Pellerin, 2005). Les astrocytes ont également la capacité de répondre à de très nombreux neurotransmetteurs. Ainsi, les astrocytes possèdent des récepteurs ionotropiques et métabotropiques du glutamate (Bowman et Kimelberg, 1984; D'Antoni et al., 2008 respectivement) et du GABA ($GABA_A$: MacVicar et al., 1989 ; $GABA_B$: Kang et al., 1998). Ils expriment aussi des récepteurs adrénergiques de type alpha et béta (Aoki, 1992; Shao et Sutin, 1992), purinergiques (Franke et al., 2001; Porter et McCarthy, 1995), sérotoninergiques (Whitaker-Azmitia et al., 1993), histaminergiques (Hösli et Hösli, 1984), dopaminergiques (Miyazaki et al., 2004), muscariniques (Van Der Zee et al., 1993), aux opioïdes (Ruzicka et al., 1995), aux endocannabinoïdes (Navarrete et Araque, 2008) et à divers neurotransmetteurs peptidergiques. Le panel des récepteurs ne s'arrêtent pas à celui des neurotransmetteurs mais comprend aussi des récepteurs aux cytokines (récepteurs aux cytokines anti-inflammatoires comme l'interleukine 4 (IL-4) et IL-10, ou pro-inflammatoires telles les interleukines 1β (IL-1 β), IL-6, le tumor necrosis factor alpha (TNF-α), et l'interferon γ (INF-γ ; Bélanger et al., 2011), des récepteurs aux chémokines comme la chémokine CXCL12 (CXCR4 et CXCR7 receptors ; Schönemeier et al., 2008; Tanabe et al., 1997) et des récepteurs aux facteurs de croissance comme le transforming growth factor de type béta (TGFb) et les neurotrophines. Même si elle est longue, cette liste n'est pas exhaustive et il est important de souligner que ce nombre important de récepteurs et leur variété contribuent à l'intégration de l'astrocyte au sein du réseau complexe des cellules du système nerveux. En effet, même si j'ai souvent cité les premiers travaux démontrant la présence des récepteurs au niveau des

astrocytes, de nombreuses études ont été réalisées depuis pour démontrer la fonctionnalité de ces récepteurs. Ainsi, les astrocytes sont capables de détecter les messages envoyés par les autres cellules composant le système nerveux. Mais quelles sont les molécules pouvant être libérées par les astrocytes pour permettre une réelle communication inter-cellulaire?

Les astrocytes sont capables de libérer de nombreuses molécules informatives. Comme certaines de ces molécules sont aussi libérées par les neurones, par analogie, elles ont été appelées des gliotransmetteurs. Pour être appelée un gliotransmetteur, une molécule doit satisfaire à différents critères : 1) être synthétisée et stockée dans une cellule gliale, 2) être libérée de façon régulée, 3) agir de manière paracrine ou autocrine et 4) avoir un rôle dans des processus physiologiques et/ou pathologiques. On reconnait classiquement comme des gliotransmetteurs astrocytaires le glutamate (Araque et al., 2000; Bonansco et al., 2011; Parpura et al., 1994), le GABA (Gallo et al., 1986 ; Kozlov et al., 2006), l'ATP (Coco et al., 2003; Guthrie et al., 1999; Newman, 2003a) mais également la D-sérine (Henneberger et al., 2010; Schell et al., 1995; Yang et al., 2003). La D-sérine est le co-agoniste endogène du récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA ; Mothet et al., 2000) au même titre que la glycine. Pour être activé et fonctionnel, le récepteur NMDA doit fixer une molécule de glutamate, son agoniste, et une molécule de D-sérine ou de glycine, ses co-agonistes. La D-sérine est synthétisée par l'enzyme sérine racémase à partir de L-sérine et serait dégradée par l'enzyme D-amino acide oxydase (DAAO). Les astrocytes peuvent également libérer des facteurs de croissance comme le GDNF (glial cell line derived neurotrophic factor ; Schaar et al., 1993) et les neurotrophines 3 et 4 (NTF-3 et NTF-4 respectivement ; Friedman et al., 1998) mais aussi des cytokines comme le TNF-alpha (Beattie et al., 2002), et des chémokines comme CXCL12 encore appelée stromal derived growth factor 1 (SDF-1 ;Bajetto et al., 1999). On peut noter que les astrocytes sont aussi capables de libérer la protéine S100β (Shashoua et al., 1984), protéine sur laquelle je vais revenir plus longuement car elle est utilisée comme marqueur astrocytaire. On peut se demander si parmi l'ensemble des molécules envisagées précédemment ainsi que parmi les protéines structurales et enzymatiques,

certaines sont spécifiques des astrocytes permettant ainsi de différencier les astrocytes des autres types cellulaires. Si oui, quels sont les marqueurs les plus couramment utilisés ?

B.2.2- Quels marqueurs astrocytaires ?

Je propose de mettre l'accent ici sur des protéines exprimées de manière abondante par les astrocytes du tissu nerveux sain et adulte. Puis, je présenterai plus en détails les deux marqueurs astrocytaires les plus utilisés dans les études immunohistochimiques : la protéine des filaments intermédiaires (glial fibrillary acidic protein, GFAP) et la protéine chélatrice de calcium S100β.

Depuis environ 10 ans, des études visant à décrire le transcriptome des astrocytes ont été réalisées en utilisant des puces à ARN ou en réalisant un séquençage à haut débit d'ARN. L'étape limitante a été l'obtention d'ARNm d'une population pure d'astrocytes isolée à partir de tissus nerveux. L'existence de lignées transgéniques de souris avec des astrocytes exprimant spécifiquement des molécules fluorescentes ont été mises à profit dans ce contexte ainsi que des méthodes de plus en plus sophistiquées d'isolation de types cellulaires. Ces études réalisées sur du tissu nerveux sain (Cahoy et al., 2008; Lovatt et al., 2007; Zhang et al., 2014) s'accordent pour confirmer la validité de six marqueurs astrocytaires et d'en proposer un nouveau. Les six marqueurs astrocytaires sont l'Aqp4, le récepteur au FGF (fibroblast growth factor) de type 3, le transporteur du glutamate GLT-1, la connexine 30 (Cx30), la connexine 43 (Cx43) et la GFAP. Le nouveau marqueur astrocytaire proposé et validé est une enzyme appelée Aldh1L1 (aldehyde dehydrogenase 1 family, member 1) qui catalyse la transformation du 10-formyltétrahydrofolate en tétrahydrofolate (Cahoy et al., 2008; Zhang et al., 2014 ; Fig. 2D). On notera que ces études s'accordent aussi pour dire que les gènes codant pour un transporteur de l'urée (Slc14a1), un échangeur d'anions (Slc4a4), le récepteur Toll-like de type 3 (Tlr3) et une protéine dont la fonction est inconnue (megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1 homolog, Mlc1) figurent parmi les gènes les plus sur-exprimés dans les astrocytes. A ma connaissance les études permettant de valider au niveau du transcrit et de la protéine, l'expression spécifique de ces derniers gènes au niveau des astrocytes n'ont pas été réalisées.

Un point particulier peut être fait pour la protéine chélatrice de calcium S100β. En effet, son gène semble bien sur-exprimé par les astrocytes (Lovatt et al., 2007) mais sa spécificité astrocytaire est sujette à débat alors qu'elle figure parmi les deux marqueurs astrocytaires les plus utilisés pour la visualisation en microscopie des astrocytes. En effet, même si elle est présente dans les astrocytes, elle peut aussi être détectée dans les précurseurs des oligodendrocytes et les oligodendrocytes eux-mêmes (Hachem et al., 2005; Haglid et al., 1976; Ludwin et al., 1976; Rickmann et Wolff, 1995a; Steiner et al., 2008) ainsi que dans une sous-population de neurones (Rickmann et Wolff, 1995b). On notera que les données les plus convaincantes concernant une localisation cellulaire autre qu'astrocytaire de S100β ont été obtenues chez la souris (Hachem et al., 2005; Vives et al., 2003). De plus, chez le rat, il n'y a pas de neurones S100β positifs dans le thalamus latéral (Rickmann et Wolff, 1995b) et la caractérisation oligodendrocytaire du marquage S100β dans le cerveau de rat repose sur une simple reconnaissance de forme sans utilisation de marqueurs spécifiques des oligodendrocytes (Haglid et al., 1976; Ludwin et al., 1976; Rickmann et Wolff, 1995a). L'immunodétection de la protéine S100β dans le thalamus de rat semble donc permettre de visualiser spécifiquement les astrocytes. La protéine S100β est une protéine de la famille des protéines S-100, possédant deux sites de liaison au calcium en motif main EF de type hélice/boucle/hélice. Cette protéine est située dans le cytoplasme des astrocytes et leur noyau. C'est un atout important car elle permet après détection immunohistochimique de visualiser le corps cellulaire des astrocytes. Elle peut être sous forme soluble, ou associée à la membrane, aux centrosomes, aux microtubules et à des filaments intermédiaires. Ainsi, cette protéine semble pouvoir interagir avec le cytosquelette (Sorci et al, 1998) et contribuer à la formation et au désassemblage des microtubules (Hesketh and Baudier, 1986; Sorci et al., 2000). La protéine S100β cytoplasmique aurait un rôle dans la morphologie, la différentiation et la migration astrocytaire (Brozzi et al., 2009; Millward et al., 1998). Elle est, de manière attendue, également impliquée dans l'homéostasie calcique des astrocytes, puisque les astrocytes d'une souris S100β-/- expriment une plus grande réponse calcique à la suite de traitements pharmacologiques entrainant une entrée ou une libération de

calcium (Xiong, 2000). En plus de ses rôles au sein des astrocytes, la protéine S100β peut être libérée (Shashoua et al., 1984) et agir sur les cellules adjacentes telles qu'astrocytes, neurones et cellules microgliales. Ainsi, il semble que cette protéine puisse avoir des effets neurotrophiques ou neurotoxiques en fonction de sa concentration extracellulaire (Van Eldik et al., 1991; Huttunen et al., 2000). De plus, S100β stimulerait la prolifération des astrocytes à faible dose (Selinfreund et al., 1991). Elle stimulerait également la production astrocytaire de l'enzyme inductible de synthèse du monoxyde d'azote (inducible nitric oxyde synthase ou iNOS) via la voie NFκB (Hu et al., 1996; Lam et al., 2001)qui pourrait conduire à une apoptose astrocytaire (Hu et Van Eldik, 1996) et neuronale (Hu et al., 1997). Elle contribuerait à l'augmentation de la production astrocytaire d'IL-1β (Hu et Van Eldik, 1999) ainsi que de celle d'IL-6 et de TNF-α (Ponath et al., 2007). La protéine S100β peut également agir sur les cellules microgliales. Une forte concentration de cette protéine peut induire une augmentation de la production microgliale de NO (en réponse à l'application d'une endotoxine bactérienne, Petrova et al., 2000 ou en réponse à l'application d'IFN-γ, Adami et al., 2001), de cyclo-oxygénase 2 (COX-2 ; Bianchi et al., 2010), d'IL-1β (Kim et al., 2004) et de TNF-α (Bianchi et al., 2010). Il est notable de constater que le TNF-α peut induire la libération de la protéine S100β par les astrocytes (Edwards et Robinson, 2006). La protéine S100β aurait donc des effets bénéfiques à faible dose (effets trophiques sur les astrocytes et les neurones) et des effets délétères à forte dose (apoptose neuronale et neuroinflammation sur laquelle je reviendrai). Ainsi, la protéine S100β semble posséder de nombreux rôles au sein de l'astrocyte et du système nerveux en général. C'est un marqueur extrêmement utilisé pour caractériser les astrocytes de par son abondance et sa localisation au niveau du corps cellulaire. On notera que la protéine peut être libérée et agir sur les cellules adjacentes, effet qui est très intéressant dans un contexte de communication intercellulaire entre plusieurs partenaires.

Le marqueur astrocytaire le plus utilisé est sans conteste la GFAP. La GFAP est une protéine des filaments intermédiaires présente dans les astrocytes matures (Fig. 2A) et pendant le

développement astrocytaire. La GFAP fait donc partie du cytosquelette de l'astrocyte. Découverte par Eng en 1971 (Eng et al., 1971) dans le cerveau de patients atteints de sclérose en plaques, le gène murin de la GFAP a été cloné en 1984 (Lewis et al., 1984) et le gène humain en 1989 (Reeves et al., 1989). L'utilisation de ce marqueur doit être réalisée de manière éclairée. En effet, la GFAP ne permet pas de visualiser l'ensemble des astrocytes. Il semble que 40% des astrocytes ne soient pas GFAP immunopositifs (Walz et Lang, 1998 ; Fig. 2C). Par contre, toute cellule exprimant la GFAP est un astrocyte. La GFAP ne marquerait donc qu'une sous-population de cellules astrocytaires, représentant tout de même plus de la moitié de celle-ci (Fig. 2C et D). De plus, la GFAP n'est pas exprimée au niveau des prolongements distaux des astrocytes. Ceci explique que seulement 15% du volume total d'un astrocyte soit immunopositif pour la GFAP, comme vous pouvez le constater sur l'illustration présentée en Fig. 2B (Bushong et al., 2002). Même si elle permet la visualisation des astrocytes, le rôle cellulaire de la GFAP est peu connu. Il semble que la GFAP puisse avoir un rôle dans la migration et la mobilité des cellules astrocytaires (Lepekhin et al., 2001), dans la croissance, la prolifération et la morphologie des cellules astrocytaires (Rutka et Smith, 1993; Toda et al., 1994). Il semble enfin que la GFAP pourrait avoir un rôle de protection au cours de la survenue de diverses lésions du système nerveux. En effet, des études portant sur des souris knock-out pour la GFAP ($GFAP^{-/-}$) indiquent que ces souris meurent plus suite à des lésions de la moelle épinière cervicale obtenues par écrasement (Nawashiro et al., 1998) et ont des lésions cérébrales plus importantes suite à des interruptions du flux sanguin cérébral (Nawashiro et al., 2000). De plus, dans un modèle d'ischémie cérébrale, la plasticité synaptique post-lésionnelle est diminuée chez des souris $GFAP^{-/-}$ et la mort neuronale augmente dans ces conditions (Tanaka et al., 2002). Le rôle de cette protéine est donc encore méconnu, mais pourrait contribuer aux diverses fonctions occupées par l'astrocyte au sein du système nerveux que nous aborderons par la suite.

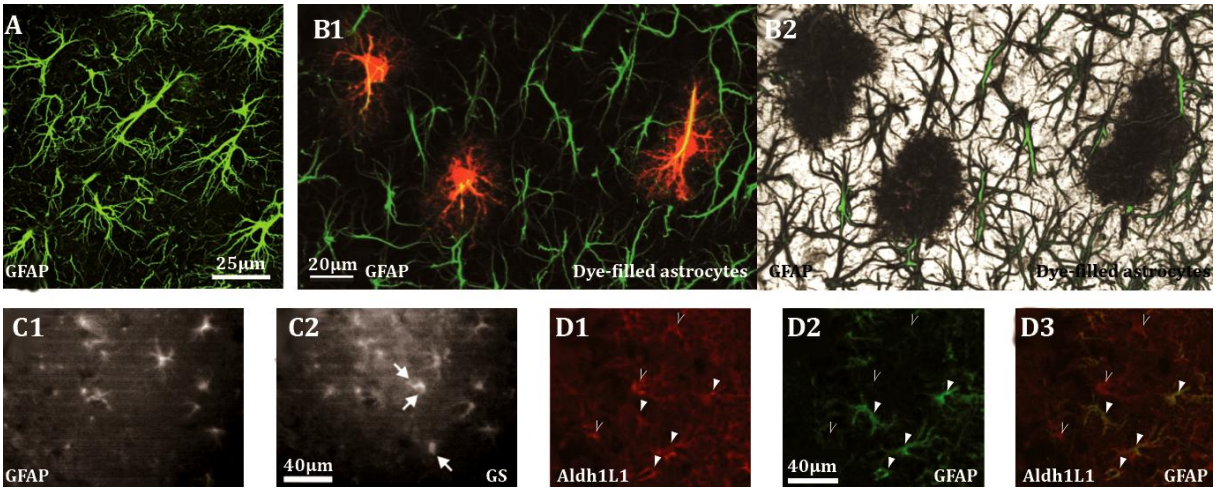


Figure 2 : Expression de la protéine GFAP dans les astrocytes. En A l'illustration adaptée de Pekny et al, 2014, présente en vert le marquage de la protéine des filaments intermédiaires GFAP. Les microphotographies B1 et B2, adaptées de Bushong et al, 2002, montrent que le marquage GFAP ne permet pas de marquer l'ensemble du volume astrocytaire : en vert, le marquage GFAP et en rouge des astrocytes injectés avec un marqueur fluorescent. Les illustrations C1 et C2, adaptées de Walz et Lang, 1998, montrent qu'il existe des cellules non $GFAP^+$ mais GS^+ dans l'hippocampe où les oligodendrocytes n'expriment pas la GS. De même, les illustrations D1, D2 et D3, adaptées de Cahoy et al, 2008, montrent des cellules $Aldh1L1^+$ mais pas $GFAP^+$ (têtes de flèches vides). Ainsi, la protéine GFAP n'est pas présente dans la totalité des astrocytes.

On notera que, dans certaines études immunohistochimiques, la détection de l'enzyme glutamine synthase (GS), qui est une ligase qui catalyse la transformation du glutamate en glutamine, a été utilisée pour visualiser les astrocytes (Fig. 2 C2). Effectivement elle est exprimée au sein des astrocytes (Norenberg et Martinez-Hernandez, 1979) mais aussi au sein des oligodendrocytes de la substance grise (Miyake et al., 1992). Comme nous le verrons dans le paragraphe sur la réactivité astrocytaire, les astrocytes réactifs ne présentent pas de sur-expression importante de la GS ce qui a conduit à une moindre utilisation de la GS comme marqueur astrocytaire. Plus récemment, des anticorps dirigés contre Adhl1L1 ont été utilisés pour visualiser les astrocytes (Dinh et al., 2014; Lo et al., 2011 ; Fig. 2D1). Même si des études réalisées sur des souris Aldh1L1-GFP montrent qu'Aldh1L1 serait bien un marqueur spécifique astrocytaire, les études immunohistochimiques concernant l'expression d'Aldh1L1 sont encore récentes, peu nombreuses et manquent donc encore de recul.

Les astrocytes expriment donc plusieurs marqueurs permettant de les différencier des autres cellules du système nerveux. Plus ou moins spécifiques, ces marqueurs sont retrouvés en

abondance dans les cellules astrocytaires et permettent de pouvoir les étudier. Leur utilisation a permis la découverte d'une caractéristique particulière: la possibilité pour ces cellules astrocytaires de changer de phénotype. Ce phénomène est appelé la réactivité astrocytaire.

B.2.3- La réactivité astrocytaire, un phénotype particulier

Qu'est-ce que la réactivité astrocytaire ? Comment distinguer les astrocytes réactifs de ceux non réactifs ? Quelles sont les caractéristiques de ce phénotype ? Bien que ce phénomène soit de plus en plus étudié, il existe toujours des phénomènes non élucidés et encore de nombreuses caractéristiques à découvrir. Je propose de vous présenter ici les éléments majeurs qui caractérisent le phénotype de la réactivité astrocytaire.

En parcourant la littérature, une définition de ce phénomène m'a beaucoup plu. Détaillée et précise, elle a été émise par Michael V. Sofroniew en 2009 (Sofroniew, 2009). Elle repose sur quatre points. Premièrement, la réactivité astrocytaire correspond à un ensemble de changements au sein de l'astrocyte, survenant en réponse à toutes formes de lésions et de pathologies du système nerveux central, incluant des perturbations même très subtiles. On parle alors d'astrocytes réactifs. Deuxièmement, les changements subis par les astrocytes réactifs dépendent et varient en fonction de la nature et de la sévérité de la lésion. Ces changements peuvent être des altérations progressives et graduelles dans l'expression moléculaire, une hypertrophie progressive de la cellule et, dans les cas sévères, une prolifération astrocytaire aboutissant à la formation d'une cicatrice gliale. Troisièmement, les changements astrocytaires sont régulés par des voies de signalisations qui sont spécifiques au contexte et aux événements. Ces signaux peuvent modifier à la fois la nature et le degré des modifications astrocytaires. Quatrièmement, les changements subis par les astrocytes ont le potentiel d'altérer leurs fonctions à la fois par des gains et des pertes qui ont des impacts bénéfiques et délétères pour les cellules environnantes. Ainsi, la réactivité astrocytaire n'est pas une réponse tout ou rien. Ce sont des changements progressifs et graduels dans l'expression de gènes, dans le

fonctionnement et la morphologie cellulaire régulés subtilement par des signaux complexes intracellulaires et intercellulaires.

Les principales caractéristiques morphologiques d'un astrocyte réactif sont une hypertrophie, caractérisée par l'épaississement des prolongements et une augmentation de la taille du corps cellulaire et du nombre de prolongements (Strömberg et al., 1986 ; Fig. 3). Même si le nombre de prolongements émis par le corps cellulaire ainsi que le nombre de prolongements visibles à plus de 25µm du corps cellulaire augmentent, les astrocytes réactifs ne s'étendent pas, leurs domaines restent inchangés par rapport aux astrocytes non réactifs et les recouvrements inter-domaines ne sont pas augmentés (Fig. 4A et B ; Wilhelmsson et al., 2006). Le phénotype de réactivité astrocytaire est caractérisé par une augmentation de l'expression de protéines des filaments intermédiaires. Ainsi, la protéine GFAP est sur-exprimée et est le marqueur le plus utilisé pour caractériser ce phénotype (Fig. 4B et Fig. 3 ; pour exemple : Calvo et al., 1991; Cerutti et Chadi, 2000; Codeluppi et al., 2009; Wang et al., 2008).

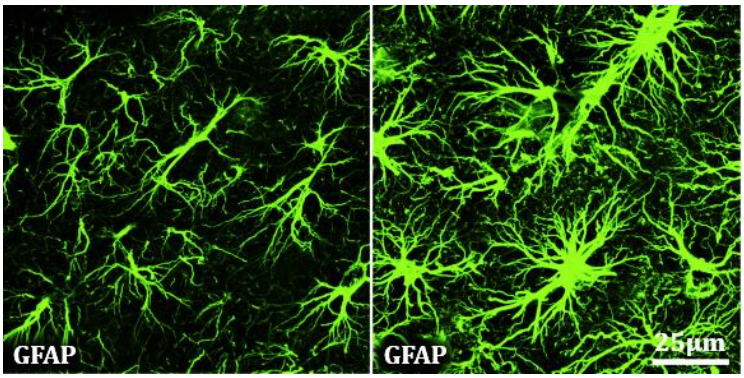


Figure 3 : Illustration des modifications de l'immunomarquage de la protéine astrocytaire GFAP. L'illustration, adaptée de Wilhelmsson et al, 2006, présente en vert, le marquage de la protéine des filaments intermédiaires GFAP. La photographie de gauche présente des astrocytes non réactifs et celle de droite, des astrocytes réactifs. La photographie montre une augmentation de la surface occupée par l'immunomarquage GFAP et une hypertrophie astrocytaire.

D'autres protéines des filaments intermédiaires, comme la vimentine, la nestine et la synémine, qui sont transitoirement exprimées au cours du développement embryonnaire par les cellules qui donneront les astrocytes (Lendahl et al., 1990; Pixley et de Vellis, 1984; Sultana et al., 2000), sont ré-exprimées par les astrocytes réactifs (pour exemple : Calvo et al., 1991; Duggal et al., 1997; Luna et al., 2010). Ces protéines peuvent donc servir de marqueurs de réactivité

astrocytaire. De nombreuses autres protéines sont régulées dans les astrocytes réactifs. Ainsi, l'expression de la protéine S100β est augmentée dans les astrocytes réactifs (do Carmo Cunha et al., 2007; Cerutti et Chadi, 2000; Chadi et Gomide, 2004). Il existe également des modifications des voies de signalisation comme celle de la p38 MAPK (Roy Choudhury et al., 2014), des régulations de l'expression des éphrines et de leurs récepteurs (Wang et al., 2005), ainsi que des modifications dans l'expression des canaux ioniques présents sur les astrocytes réactifs contribuant à modifier leurs propriétés membranaires (Anderová et al., 2004; Black et al., 2009; Westenbroek et al., 1998) et de certains récepteurs comme les récepteurs purinergiques (Rodríguez-Zayas et al., 2010). Parfois, la situation est plus complexe. Ainsi l'expression de certaines protéines par les astrocytes réactifs peut être diminuée ou augmentée en fonction des lésions ou en fonction du temps après la lésion. Il en est ainsi pour l'aquaporine 4 (Hoshi et al., 2011; Vizuete et al., 1999), la connexine 43 (Brand-Schieber et al., 2005; Fonseca et al., 2002; Haupt et al., 2007), les transporteurs astrocytaires du glutamate, notamment GLT-1 (O'Shea et al., 2006; Wang et al., 2008) et les récepteurs purinergiques (Rodríguez-Zayas et al., 2010). Cette liste n'est pas exhaustive, mais un tableau adapté de Michael V. Sofroniew (2009; Tableau 1) récapitule les différents changements moléculaires pouvant survenir au sein des astrocytes réactifs.

Catégories fonctionnelles	**Exemple des modifications moléculaires survenant dans les astrocytes réactifs**
Structurelle	GFAP ↑, Vimentine ↑, Nestine ↑
Régulateurs de la transcription	NF-κB↑, STAT3↑, AMPc ↑, mTor↑
Matrice extracellulaire et interactions cellulaires	Métalloprotéases↑, Ephrines ↑, Collagènes↑↓, intégrines ↑ ; cadhérines ↑↓
Régulateurs de l'inflammation	Cytokines et facteurs de croissance ↑↓; glutathione ↑↓
Homéostasie hydrique et ionique	Aqp4 ↑↓; Transporteurs Na/K ↑↓
Recapture des neurotranmetteurs extracellulaires	Transporteurs du glutamate ↑↓
Régulateurs vasculaires	Prostaglandines ↑↓, Monoxyde d'azote (NO)↑↓
Purines et récepteurs purinergiques	ATP↑↓, Récepteurs P2Y ↑↓
Stress oxydatif	NO synthase ↑↓, superoxyde dismutase ↑↓
Protéines des jonctions gap	Cx43 ↑↓
Energétique	Lactate ↑↓
Remodellage et formation des synapses	Thrombospondine ↑↓

Tableau 1 : Exemples des modifications moléculaires survenant dans les astrocytes réactifs. Tableau adapté de Sofroniew, 2009. Le sens des flèches indique la présence d'une régulation positive ou négative de l'expression moléculaire. Certains membres d'une même famille peuvent présenter des régulations différentielles. De même, une même molécule peut être à la fois régulée négativement ou positivement en fonction de différents paramètres comme l'étiologie de la réactivité astrocytaire ou encore la durée depuis laquelle perdure cette réactivité astrocytaire.

Nous l'avons vu, le phénotype de réactivité astrocytaire est un phénomène graduel. Il est donc possible de ne pas retrouver toutes les caractéristiques que j'ai pu présenter. Ainsi, l'hypertrophie astrocytaire peut être plus ou moins prononcée. On peut distinguer une réactivité modérée (Fig. 4B) que j'ai déjà décrite et une réactivité sévère (Fig. 4C). Dans ce cas, on observe une prolifération astrocytaire qui conduit à des zones de recouvrement entre les domaines astrocytaires voisins. De plus, dans les cas très sévères, les astrocytes réactifs peuvent former une cicatrice gliale, élaborant une barrière neuroprotectrice contre les cellules inflammatoires et les agents infectieux (Fig. 4D ; Faulkner, 2004). La cicatrice gliale promeut la réparation de la barrière hémato-encéphalique et limite l'infiltration des globules blancs (Bush et al., 1999; Voskuhl et al., 2009). De manière générale, la réactivité astrocytaire permet de réduire la perte de synapses après une déafférentation (Wilhelmsson et al., 2004) et peut également présenter un rôle neuroprotecteur dans le cas de lésions modérées ou d'ischémies (Li et al., 2006; Myer et al., 2006). Ainsi la réactivité astrocytaire peut avoir des effets bénéfiques en cas de lésions du système nerveux. Cependant, cette réactivité astrocytaire peut aussi limiter la régénération synaptique après une déafférentation (Wilhelmsson et al., 2004), inhiber la différentiation des progéniteurs des oligodendrocytes en oligodendrocytes matures et leur survie (Su et al., 2011) mais aussi limiter la croissance des neurites et la reconstruction axonale (Goldshmit et al., 2004; Menet et al., 2003)

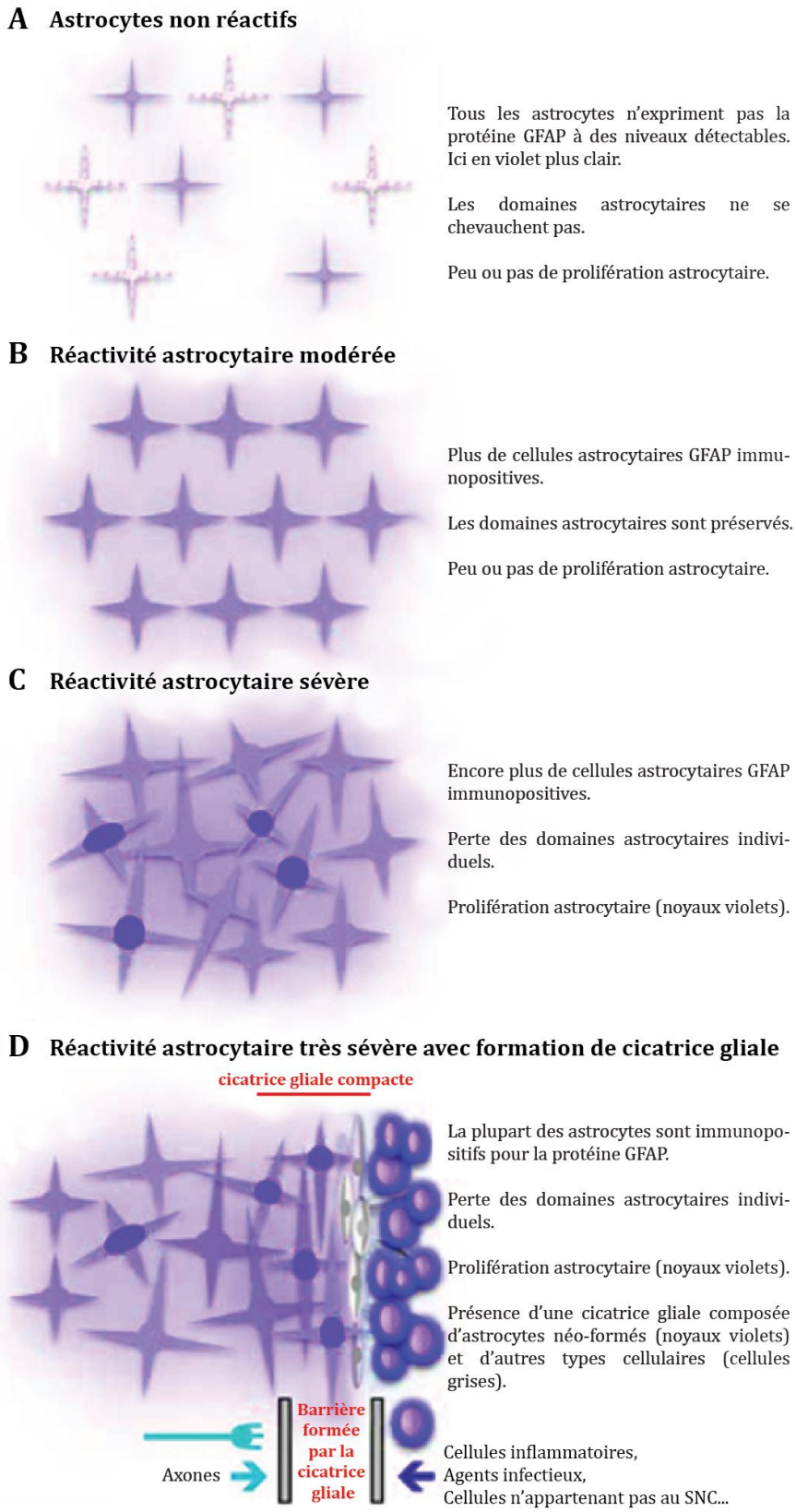


Figure 4 : Illustration des différents stades de la réactivité astrocytaire. En A, représentation schématique des astrocytes non réactifs. En B, réactivité astrocytaire modérée (premier stade de réactivité). En C, réactivité astrocytaire sévère (second stade de réactivité). En D, stade ultime de

réactivité astrocytaire avec formation d'une cicatrice gliale compacte. Illustration adaptée de Sofroniew et Vinters, 2010.

Nous le verrons par la suite, la réactivité astrocytaire observée en condition de douleur neuropathique joue un rôle majeur notamment dans la chronicisation de cette pathologie. La réactivité astrocytaire exerce donc aussi des effets délétères sur le système nerveux. Mais dans quels cas les astrocytes acquièrent-ils un phénotype réactif ? En fait, de très nombreuses molécules peuvent conduire à une réactivité plus ou moins prononcée des cellules astrocytaires. Ces molécules peuvent être libérées dans de nombreuses conditions par exemple lors de lésions cérébrales, d'infection par des agents pathogènes, de maladies neurodégénératives etc. Elles sont synthétisées et libérées par différents types de cellules comme les cellules microgliales ou encore les astrocytes eux-mêmes. Ainsi, des cytokines et des facteurs de croissance comme l'IL-6 et le TNF-α (Balasingam et al., 1994; Chiang et al., 1994; Klein et al., 1997), des médiateurs de l'immunité innée comme le lipopolysaccharide (LPS), mais aussi des neurotransmetteurs et des neuromodulateurs comme l'ATP (Bolego et al., 1997; Neary et al., 1994). Je vous propose un aperçu des acteurs de la réactivité astrocytaire dans la figure 5.

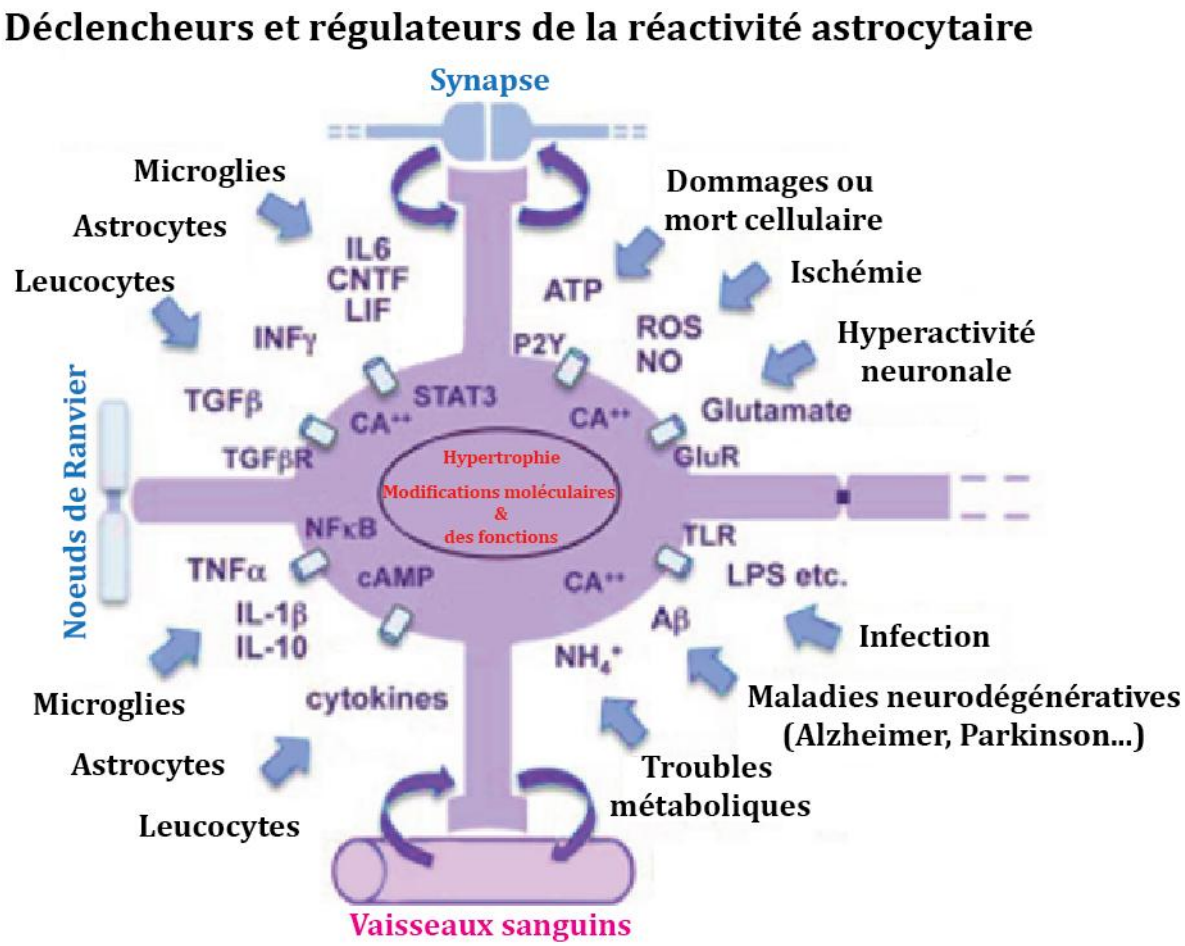


Figure 5 : Représentation schématique des déclencheurs et des régulateurs principaux de la réactivité astrocytaire. L'astrocyte, représenté en violet, peut détecter la présence de molécules très variées. L'expression de ces molécules peut varier en fonction des conditions. Ces modifications contribuent à déclencher et peuvent directement déclencher la mise en place du phénotype de réactivité astrocytaire. Tout ceci conduit à des modifications moléculaires (génomiques, de l'ARNm, protéiques), morphologique (hypertrophie, …) et des modifications des fonctions astrocytaires. Illustration adaptée de Sofroniew et Vinters, 2010.

Maintenant que nous avons abordé ce phénotype caractéristique de la réactivité astrocytaire, nous allons étudier les multiples fonctions que possèdent les astrocytes au sein du système nerveux central.

B.3- Astrocytes, quelles fonctions au sein du système nerveux ?

Les astrocytes, nous l'avons vu, peuvent communiquer avec les autres cellules du système nerveux, mais quels sont leurs rôles ? Les fonctions des astrocytes au sein du système nerveux sont très variées. Les astrocytes contribuent à la synaptogenèse notamment par leur production de trombospondine (Christopherson et al., 2005) et leur présence augmente le nombre de synapses matures et fonctionnelles (Ullian et al., 2001). Très récemment, il a été mis en évidence un rôle des astrocytes dans la phagocytose des synapses inhibitrices et excitatrices aussi bien lors du développement qu'à l'âge adulte (Chung et al., 2013). Ceci suggère un rôle actif des astrocytes dans le remodelage synaptique. La proximité des astrocytes avec les vaisseaux sanguins et leur libération de molécules vasodilatatrices et vasoconstrictrices leur permet également de contrôler le flux sanguin cérébral (Paulson et Newman, 1987; Zonta et al., 2003). Les astrocytes possèdent également un rôle majeur dans le métabolisme énergétique des neurones. Un approvisionnement des neurones en métabolites est en effet assuré par les astrocytes via un mécanisme activité dépendant (McKenna et al., 1996; Pellerin et Magistretti, 1994; Sibson et al., 1998). Les astrocytes ont la capacité à la fois d'absorber le glucose qui est une source d'énergie apportée par la circulation sanguine, et d'alimenter les neurones en leur fournissant des métabolites énergétiques (comme le lactate). De plus, le réseau astrocytaire permet la circulation du glucose et de ses dérivés vers les sites de plus haute demande énergétique (Rouach et al., 2008). Nous l'avons vu, les astrocytes sont très présents au niveau des synapses et peuvent en contacter jusqu'à 140 000 (Bushong et al., 2002). Là, ils possèdent un rôle très important dans le maintien de l'homéostasie du pH (transport des ions H^+ et HCO_3^-), des ions (principalement recapture des ions K^+), des neurotransmetteurs (recapture du glutamate) ainsi que de l'homéostasie hydrique. Les astrocytes grâce à l'arsenal de transporteurs, de canaux, de pompes qu'ils expriment vont donc contrôler et réguler chacun de ces paramètres qui sont cruciaux au bon fonctionnement du système nerveux (Amiry-Moghaddam et al., 2003; Manley et al., 2004; Newman, 1996; Pellerin et Magistretti, 1994; Sibson et al., 1998). Les astrocytes font aussi partie de la synapse tripartite. Cette synapse

tripartite est constituée des neurones pré- et post-synaptique et des prolongements astrocytaires qui sont au contact de cette synapse. Au-delà du fait que leur présence exerce une barrière physique à la diffusion des neurotransmetteurs, les prolongements astrocytaires sont aussi capables de réguler les taux d'ions K^+ et de glutamate dans l'espace extracellulaire par leur panel de transporteurs, impactant ainsi l'activité neuronale. Leur large éventail de récepteurs aux neurotransmetteurs leur permet de détecter l'activité synaptique. Cette détection se traduit par des élévations calciques qui conduisent à la libération de gliotransmetteurs qui modifient l'activité neuronale (glutamate : Nedergaard, 1994; Parpura et al., 1994 ; GABA : Kozlov et al., 2006; ATP : Newman, 2003b; D-sérine : (Panatier et al., 2006). Les astrocytes sont aussi capables de modifier les plasticités synaptiques. Ils peuvent contrôler (Jourdain et al., 2007) ou modifier durablement (Perea et Araque, 2007) l'efficacité synaptique par la libération de glutamate. La libération de TNF-alpha leur permet d'exercer une régulation activité-dépendante de la force synaptique (Beattie et al., 2002). Leur libération de D-sérine contrôle les plasticités dépendantes des récepteurs NMDA (Panatier et al., 2006; Yang et al., 2003). Enfin, les taux de glutamate maintenus dans le milieu extra-synaptique par l'activité spontanée des astrocytes détermineraient le seuil de déclenchement des phénomènes de plasticité synaptique (Bonansco et al., 2011).

Un point reste obscur concernant le fonctionnement des astrocytes : le rôle des vagues calciques qui peuvent être observées dans le syncitium astrocytaire (Cornell-Bell et al., 1990). En effet, suite à la stimulation d'un récepteur membranaire, l'augmentation calcique dans un astrocyte se propage (par voie intracellulaire via les jonctions gaps et/ou extracellulaire via la libération d'ATP) aux astrocytes voisins. S'agit-il d'un mode de communication entre cellules distantes ? S'agit-il d'un mode de réponse à des épisodes de forte activité neuronale ? S'agit-il d'une plasticité astrocytaire ? A l'avenir ces questions devront être abordées *in vivo*.

Les astrocytes possèdent donc des rôles variés et dont les enjeux pour le bon fonctionnement du système nerveux sont cruciaux. Ces cellules ne sont donc pas des cellules passives, servant

uniquement de support de nutrition et de cohésion entre les neurones, mais sont réellement des cellules actives à tous les niveaux et notamment au niveau de l'activité synaptique. Les cellules de support sont devenues des partenaires synaptiques décisifs.

C- La microglie

Le terme microglie vient du grec μικρός et γλία, respectivement petit et glue ou colle La microglie regroupe des cellules de petite taille à l'opposé de la « macroglie », dont les astrocytes font partie. Chez les invertébrés il existe déjà des cellules neurogliales comparables à la microglie (Sonetti et al., 1994), elle a donc été conservée au cours de l'évolution et son rôle doit donc être important pour le fonctionnement du système nerveux. Les cellules microgliales sont d'origine mésodermique. Elles ont pour origine des progéniteurs macrophagiques nés précocement dans le sac vitellin (Alliot et al., 1999). Ils migrent ensuite dans le tube neural lors de son développement. Ils colonisent le neuroectoderme dès le 8° jour de développement embryonnaire chez les rongeurs (Alliot et al., 1999; Ginhoux et al., 2010) et le premier trimestre chez les humains (Monier et al., 2007). Ces progéniteurs macrophagiques donnent alors des progéniteurs microgliaux qui se différencient en cellules microgliales *in situ* dans le parenchyme. Les cellules microgliales sont maintenues tout au long de la vie sans participation d'un pool de macrophages plus tardifs (issus de progéniteurs myéloïdes du foie ou de la moelle osseuse) qui aurait été apporté par le flux sanguin (Ginhoux et al., 2010). En effet, les cellules microgliales ont un pouvoir mitotique élevé. Les cellules microgliales sont donc les macrophages résidents du système nerveux qui sont distincts des autres macrophages issus de progéniteurs myéloïdes plus tardifs (notamment de la moelle osseuse) (Schulz et al., 2012). J'aborderai les caractéristiques morphologiques des cellules microgliales dans un premier temps puis présenterai leurs protéines et marqueurs principaux. Enfin, je détaillerai leurs différentes fonctions et décrirai le phénomène de réactivité microgliale et ses caractéristiques.

C.1- Morphologie microgliale

Les cellules microgliales sont des cellules ramifiées possédant un petit corps cellulaire légèrement allongé faisant entre 3 et 4µm de large et 6 µm de long (Shapiro et al., 2009). Il existe plusieurs types de microglie dans un cerveau sain, classés en fonction de leur morphologie (Fig. 6 A, B et C ; Lawson et al., 1990). Les cellules compactes sont rondes ou légèrement allongées et possèdent trois prolongements courts et épais. Ces cellules microgliales sont présentes dans les organes circumventriculaires. Les cellules ramifiées longitudinalement possèdent un corps cellulaire allongé, de longs prolongements parallèles aux axones voisins. Elles sont présentes dans les faisceaux de fibres. Le troisième type de microglie est celui des cellules ramifiées radialement. Elles sont les plus nombreuses et sont présentes dans la substance grise. Elles présentent de nombreux prolongements (entre 3 et 5) partant d'un corps cellulaire arrondi ou légèrement allongé. Ces prolongements présentent eux-mêmes de nombreuses ramifications. Le nombre de cellules microgliales dans le cerveau adulte de souris a été estimé à 3,5 millions (Lawson et al., 1990). Elles représentent 5% des cellules du cortex cérébral et 12% des cellules de la substance noire (Lawson et al., 1990). Leur abondance varie en fonction des structures cérébrales d'environ 21 cellules/mm^2 dans le cervelet à environ 165 cellules/mm^2 dans le pallidum ventral (Lawson et al., 1990). Il existe donc également une hétérogénéité dans l'abondance des cellules microgliales en fonction des structures cérébrales. Chez l'humain, cette hétérogénéité est présente également. Il existe cependant une différence notable : le nombre de cellules microgliales dans la substance blanche est plus élevé que dans la substance grise, à l'inverse de ce que l'on observe chez les rongeurs. Le thalamus humain présente environ 10% de cellules microgliales (Mittelbronn et al., 2001).

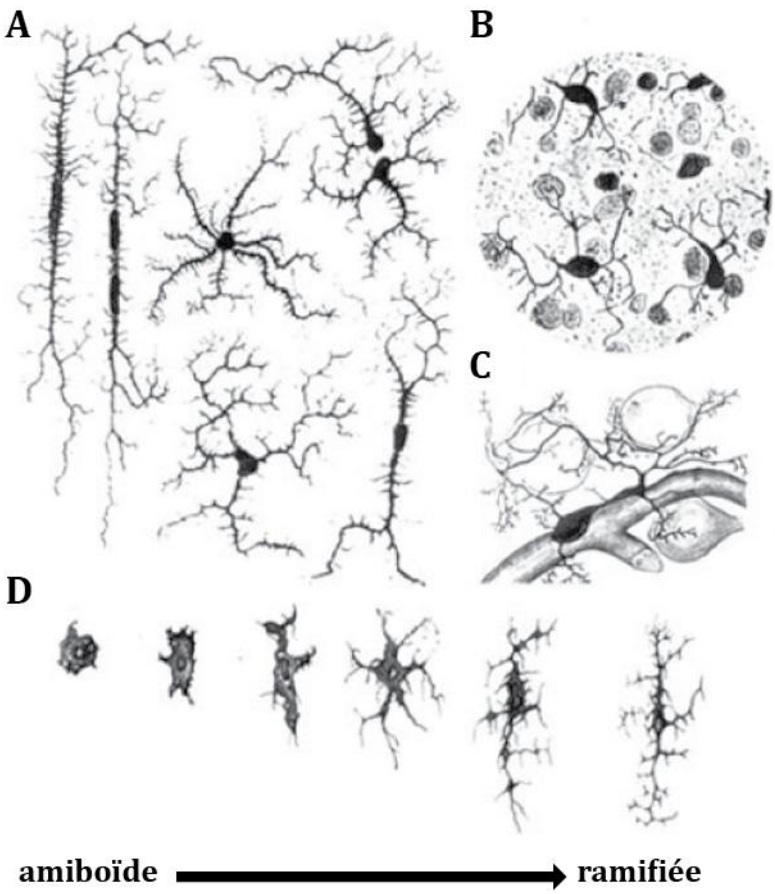


Figure 6 : Schémas des différents types de cellules microgliales. Les cellules microgliales sont illustrées par Pio des Rio Hortega en 1932 (A), par Paul Glees en 1955 (B), Wilder Penfield en 1932 (C) et John Kershman en 1939 (D). En A, B et C, on observe des morphologies variées et en D une transformation de cellules extrêmement ramifiées en cellules amiboïdes. Figure adaptée de Kim et de Vellis, 2005.

Grâce à l'utilisation de souris transgéniques chez lesquelles les cellules microgliales expriment un marqueur fluorescent, il a été possible de suivre le devenir *in vivo* de cellules microgliales en utilisant un microscope bi-photons. Ainsi, il est apparu que, dans le cerveau adulte sain, les prolongements microgliaux sont très dynamiques et scannent le microenvironnement du parenchyme en permanence. Chaque cellule microgliale occupe un domaine qui lui est propre d'approximativement 50 000 μm^3 (Nimmerjahn et al., 2005). Les sous-prolongements peuvent réaliser des extensions, des rétractions durant quelques secondes à quelques minutes pouvant faire jusqu'à quelques micromètres ou bien peuvent se rétracter jusqu'à disparaître (Davalos et al., 2005; Wake et al., 2009). Toutes ces caractéristiques font de la microglie une cellule sentinelle. Nous y reviendrons quand nous aborderons les rôles de la microglie.

Mais quels sont les marqueurs spécifiques de ces cellules microgliales? Quel phénotype les caractérise et permet de déterminer avec précision s'il s'agit de cellules microgliale ou non ?

C.2- Microglie : quel phénotype ?

C.2.1- Protéines exprimées par les cellules microgliales

Les cellules microgliales expriment une très grande variété de canaux ioniques (pour revue voir Eder, 1998). Au-delà des pompes à protons (Shirihai et al., 1998), des échangeurs Na+/Ca2+ (Nagano et al., 2004) et des transporteurs de bicarbonates (Faff et al., 1996), elles expriment à un haut niveau l'antiport glutamate/cystine (Domercq et al., 2007) ainsi que le transporteur du glucose de type 5 (Payne et al., 1997). La microglie possède également un large éventail de récepteurs : récepteurs aux neurotransmetteurs, aux neurohormones et neuromodulateurs, aux cytokines et chémokines notamment. Parmi les récepteurs aux neurotransmetteurs, les récepteurs purinergiques (P2X et P2Y) sont les plus exprimés (pour revue voir Inoue, 2006). On peut aussi trouver des récepteurs glutamatergiques de différents types (Hagino et al., 2004; Noda et al., 2000; Taylor et al., 2005), des récepteurs GABAergiques de type B (Charles et al., 2003) et des récepteurs nicotiniques (De Simone et al., 2005). Parmi les récepteurs aux neurohormones et neuromodulateurs (pour revue voir Kettenmann et al., 2011), on peut citer les récepteurs aux neurotrophines (Mizoguchi et al., 2009). Les cellules microgliales expriment des récepteurs aux interleukines, à l'interféron et au TNF-α ainsi qu'aux chémokines (pour revue voir Kettenmann et al., 2011). Parmi ces dernières, je citerai la fractalkine CX3CL1 (récepteur CX3CR1 ; Maciejewski-Lenoir et al., 1999). Enfin, des récepteurs appartenant à d'autres systèmes sont aussi exprimés par les cellules microgliales : des récepteurs de reconnaissance d'agents infectieux et de molécules libérées lors de lésions du tissu nerveux avec les toll like receptors (TLR ; Jack et al., 2005; Lehnardt et al., 2002) et de récepteurs du complément (complement receptor 3 (CR3) encore appelé cluster of differentiation molecule 11 b (CD11b) ou macrophage-1 antigen (Mac-1) ou integrin alpha M (ITGAM) ; Akiyama et McGeer, 1990a). Cette liste n'est pas exhaustive mais l'abondance des récepteurs exprimés par la microglie souligne les capacités variées d'interactions avec l'environnement que possède la microglie.

De nombreux travaux réalisés majoritairement sur des cellules en culture ont montré que les cellules microgliales libèrent de nombreuses molécules. Par contre, on soulignera que, lors de leur mise en culture, les cellules microgliales expriment un phénotype réactif que nous verrons dans le paragraphe suivant. Dans ces conditions, les cellules microgliales peuvent libérer une grande variété de molécules pro-inflammatoires comme le TNF-alpha, les interleukines IL-1β et IL-6 ainsi que les chémokines CCL2 (ou MCP-1), CXCL10 et CCL3 (pour revue voir Hanisch, 2002). Elles peuvent aussi libérer des gliotransmetteurs comme l'ATP (Pascual et al., 2012), le glutamate (Persson et al., 2006; Takeuchi et al., 2006) ainsi que le NO (Boje et Arora, 1992). La microglie peut exprimer également l'enzyme COX-2 ainsi que son produit majeur la prostaglandine E2 (PGE2 ; Akundi et al., 2005).

Nous l'avons vu, les cellules microgliales expriment un grand nombre de molécules, mais toutes ne sont pas purement spécifiques des cellules microgliales. Quels sont les marqueurs microgliaux typiques permettant de différencier la microglie des autres types cellulaires ? Quels sont les marqueurs les plus couramment utilisés ?

C.2.2- Quels marqueurs microgliaux ?

Les cellules microgliales expriment plusieurs marqueurs permettant de les différencier des autres cellules du tissu nerveux. Les deux marqueurs les plus utilisés dans les études morphologiques de la microglie avec une approche immunohistochimique sont CD11b (Akiyama et McGeer, 1990b)et la protéine ionized binding adapter molecule 1 (Iba-1 encore appelée AIF-1), une protéine cytoplasmique chélatrice de calcium (Mittelbronn et al., 2001), Je reviendrai plus longuement sur ces deux marqueurs à la fin du paragraphe. Au-delà de ces deux marqueurs, il est généralement admis qu'en conditions physiologiques, les cellules microgliales sont les seules à exprimer le récepteur à la fractalkine, CX3CR1 (Harrison et al., 1998). Ainsi, dans le but de visualiser les cellules microgliales, des souris transgéniques ont été créées où la GFP a été insérée dans le gène du récepteur de la fractalkine (Jung et al., 2000). Les cellules microgliales sont les principales cellules neurales, là encore en conditions physiologiques, à exprimer les

récepteurs purinergiques ionotropiques $P2X_4$ et $P2X_7$ (Cavaliere et al., 2005; Hide et al., 2000; Light et al., 2006). Elles expriment également, de manière plus importante que les autre cellules neurales en conditions physiologiques, les récepteurs purinergiques métabotropiques $P2Y_6$, $P2Y_{12}$ et $P2Y_{13}$ (Haynes et al., 2006; Light et al., 2006; Ohsawa et al., 2007; Visentin et al., 2006) bien que le marqueur $P2Y_{12}$ n'ait pas été retrouvé sur la microglie dans une étude (Cavaliere et al., 2005). Ces récepteurs purinergiques possèdent un rôle dans l'homéostasie et la communication via les purines et certains, comme par exemple le récepteur $P2Y_{12}$, peuvent être impliqués dans la capacité de migration de la microglie et sa polarisation (Haynes et al., 2006; Ohsawa et al., 2007). La microglie exprime également les récepteurs TLRs 1 à 9. Les cellules microgliales seraient les seules cellules du tissu nerveux à exprimer de forts taux de l'ARNm de TLR4, récepteur spécifique du LPS (Lehnardt et al., 2002). Les cellules microgliales dans un contexte de lésions du système nerveux expriment également le marqueur cluster of differentiation 68 (CD68), un marqueur macrophagique (Lee et al., 2002) ainsi que le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (MHCII), une protéine extracellulaire impliquée dans la présentation des antigènes (Perry, 1998). Nous l'avons dit les deux marqueurs les plus utilisés par les différentes études immunohistochimiques pour caractériser les cellules microgliales sont les marqueurs Iba-1 et CD11b. Iba-1 est une protéine cytoplasmique de 17kDa, chélatrice de calcium à motif de main EF (Imai et al., 1996) qui est spécifiquement exprimée par les cellules microgliales (Okere et Kaba, 2000). Là encore, pour visualiser les cellules microgliales, des souris transgéniques ont été créées avec l'EGFP qui s'exprime sous le contrôle du promoteur du gène Iba-1 (Hirasawa et al., 2005). Iba-1 est présente dans tout le cytoplasme et jusque dans les prolongements de ces cellules (Shapiro et al., 2009). Bien que cette protéine soit extrêmement utilisée en recherche, il semble que peu d'études se soient penchées sur ses fonctions au sein de la microglie. Il est important de relever qu'une étude récente a permis de montrer que le marqueur Iba-1 ciblait à la fois les cellules microgliales et des macrophages périvasculaires (Zeisel et al., 2015). Afin de pouvoir discriminer ces deux types cellulaires, il semble nécessaire d'étudier deux marqueurs Lyve1 et Mrc1. Les cellules Iba-1^+/Lyve$^-$/Mrc1^- seraient des cellules

microgliales et les cellules Iba-1$^+$/Lyve$^+$/Mrc1$^+$, dont la forme est amiboïde, seraient des macrophages périvasculaires.

Le second marqueur très utilisé en recherche est CD11b. Clonée pour la première fois chez l'humain en 1988 (Corbi et al., 1988a), son gène est localisé au sein d'un cluster impliqué dans l'adhésion cellulaire (Corbi et al., 1988b). CD11b est une sous-unité d'une intégrine qui est un récepteur transmembranaire impliqué dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire ainsi qu'un récepteur d'un facteur du complément 3 (Reid et al., 1993). La microglie exprime constitutivement cette protéine (Akiyama et McGeer, 1990a). Cette protéine est principalement impliquée dans les propriétés de phagocytose des cellules microgliales (Choucair-Jaafar et al., 2011; Flaherty et al., 1997).

La difficulté avec les marqueurs microgliaux provient du fait que majoritairement ils vont aussi révéler les macrophages infiltrés dans le système nerveux notamment en cas de lésions. Dans ce cas, la microglie, tout comme les astrocytes, possède un phénotype très spécifique et particulier ou phénotype dit réactif.

C.2.3- La réactivité microgliale, un phénotype particulier

A l'instar des astrocytes, la microglie possède également la capacité de changer de phénotype. Elle devient alors « réactive » ou « active ». Tout comme celui de réactivité astrocytaire, le phénotype de réactivité microgliale n'est pas tout ou rien. Il s'agit d'un phénomène graduel et évolutif. Cette réactivité peut être initiée par une infection, une lésion traumatique, une ischémie, une maladie neurodégénérative ou une altération de l'activité neuronale, c'est-à-dire dans tous les cas où l'homéostasie du système nerveux est menacée. La réactivité microgliale va induire une réponse immunitaire initiale pro-inflammatoire, lors de laquelle la microglie pourra libérer de nombreuses molécules pro-inflammatoires comme le TNF-α et les interleukines IL-6 et IL1-β (pour exemple Iwama et al., 2011; Même et al., 2006; Persson et al., 2005). Cette première phase est suivie le plus souvent par une phase anti-inflammatoire, qui permet de

promouvoir la réparation du système nerveux et de retrouver une homéostasie tissulaire. La microglie peut alors augmenter l'expression des molécules comme l'interleukine IL-4 et le TGFβ (Ponomarev et al., 2007). La réactivité microgliale peut être caractérisée par une évolution graduelle de la morphologie des cellules microgliales (Fig. 6D et Fig. 7A1 à A4 ; pour exemple Avignone et al., 2008). Le nombre de prolongements augmente, les prolongements sont plus épais et le corps cellulaire est plus volumineux (comparer Fig. 7 A1 et A4 et B1 et B2 ; Iwama et al., 2011; Shapiro et al., 2008). On peut aboutir à une forme amiboïde de la microglie dans certains cas sévères (Fig. 6D). Le nombre de cellules microgliales présentes sur le site de lésion peut également augmenter via notamment des phénomènes de prolifération (Iwama et al., 2011; Sugama et al., 2007).

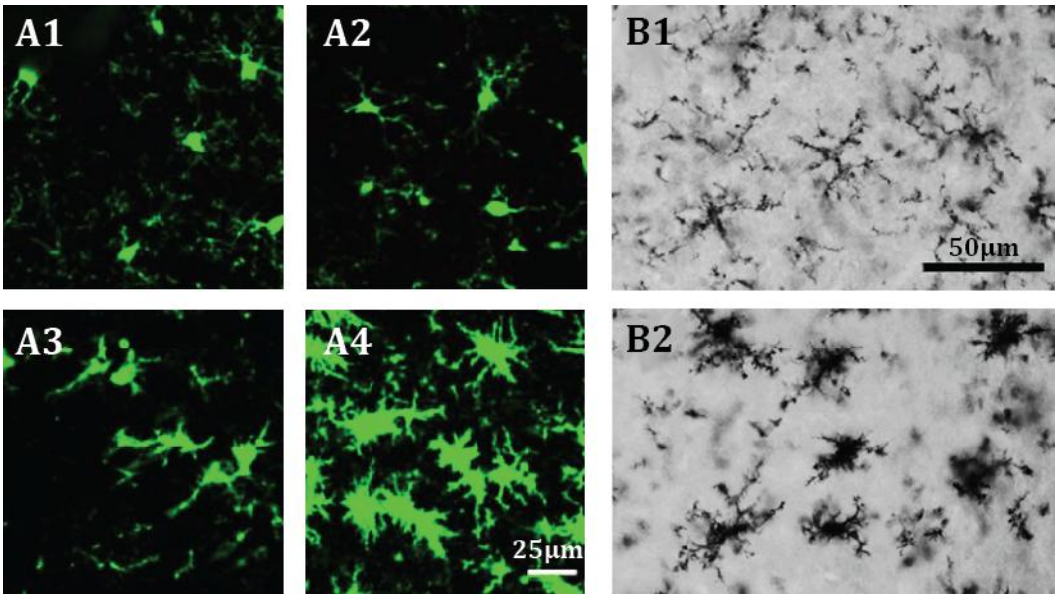


Figure 7 : Réactivité morphologique de la microglie. Figures A, adaptées d'Avignone et al, 2008 : dans cette étude, la microglie exprime la GFP, marqueur fluorescent vert sous le contrôle du promoteur du gène CX3CR1 spécifique. Les microphotographies illustrent l'évolution de la morphologie de cellules microgliales dans la région CA1 de l'hippocampe dans un modèle animal d'épilepsie par injection intrapéritonéale de kaïnate. Figure A1, après l'injection de PBS (solution tampon phosphate), la microglie présente une morphologie non réactive. Les figures A2, A3 et A4 illustrent les modifications de la morphologie des cellules microgliales 3, 24 et 48 heures après l'injection respectivement. Dans les figures B, adaptées de Sugama et al, 2007, les cellules microgliales présentes dans la substance grise autour de l'aqueduc cérébral sont immunomarquées contre la protéine CD11b/c. La photographie B1 présente la morphologie microgliale en condition contrôle et B2, 2 heures après un stress par immersion de l'animal dans l'eau. Là encore, la morphologie microgliale varie énormément.

Lors du phénotype de réactivité microgliale, la microglie peut sur-exprimer de très nombreuses molécules et exprimer *de novo* certains gènes et protéines. Ainsi, en plus de la surexpression de molécules pro-inflammatoires que nous avons abordée précédemment, la microglie réactive peut sur-exprimer la forme inductible de l'oxyde nitrique synthase (iNOS ou NOS2) ainsi que des métalloprotéases de la matrice comme la MMP2 (Iwama et al., 2011), mais aussi les protéines CD11b et Iba-1 (Graeber et al., 1988a; Ito et al., 1998) ou encore augmenter le nombre de récepteur de la fractalkine CX3CR1 présents sur sa membrane (Harrison et al., 1998). Elle peut également exprimer *de novo* des protéines comme le transporteur du glutamate astrocytaire GLT-1 (van Landeghem et al., 2001; López-Redondo et al., 2000; Xin et al., 2009). La sur-expression des protéines CD11b et Iba-1 en condition de réactivité microgliale explique que cela soit les marqueurs les plus utilisés pour identifier les cellules microgliales puisqu'elles permettent la visualisation de la microglie du cerveau sain ainsi que la microglie du cerveau lésé. La réactivité microgliale se traduit donc par des modifications morphologiques, des altérations de l'expression génique et, nous le verrons, des changements fonctionnels.

Quels facteurs peuvent induire une réactivité microgliale ? Il va s'agir de tout signal indiquant une perturbation de l'homéostasie du système nerveux : les agents infectieux, les molécules libérées lors des traumatismes ou ischémies, les protéines anormales observées lors des maladies neurodégénératives, les molécules signalant une altération de l'activité neuronale, etc. Ainsi, des médiateurs de l'immunité innée comme le LPS (Lee et al., 1993; Persson et al., 2005; Si et al., 1998), le TNF-α (Persson et al., 2006), les dépôts de plaques β amyloïdes (Maezawa et al., 2011; Meda et al., 1995) ou l'α-synucléine (Zhang et al., 2005), mais aussi des neurotransmetteurs comme l'ATP (Avignone et al., 2008) peuvent conduire à une réactivité microgliale. A l'opposé de ces molécules que l'on peut qualifier d' « on », c'est-à-dire qui promeuvent la réactivité microgliale, il existe des facteurs « off » qui au contraire maintiennent la microglie dans son état non réactif (par exemple CD200). Une diminution ou une disparition de ces facteurs « off » peuvent donc aussi conduire à une réactivité microgliale (pour CD200 :

Broderick et al., 2002). Enfin, on notera qu'une fois la réactivité microgliale enclenchée, d'autres molécules comme les interleukines IL-4 et IL-13 (Freilich et al., 2013; Zhao et al., 2006b) peuvent mener la microglie vers un phénotype anti-inflammatoire et conduire à une phase de réparation. Je vous propose le tableau n°2 adapté de la revue d'Hanisch et Kettenmann en 2007 qui présente un plus vaste ensemble de facteurs et modulateurs de la réactivité microgliale.

Classe des composants	**Signaux et modulateurs de la réactivité microgliale**
ADN/ARN viral, structures de surface, d'origine fongique ou bactérienne	Ligands ou agonistes des récepteurs TLR1,2,3,4,6,9
Protéines endogènes anormales	Protéines prions, peptide Aβ
Complément	Système du complément: C1q, C5a
Anticorps	Immunoglobulines de diverses classes et isotypes IgA, IgB, IgM
Cytokines	CSF, IL1β, IL-2, IL-4,IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IFN-γ, TGF-β, TNF-α
Chémokines	Ligands ou agonistes des récepteurs CCR3, CCR5, CXCR2, CXCR, CXCR4, CX3CR1, IL-8R
Facteurs neurotrophiques	BDNF, GDNF, NGF, NTF-3, NTF-4
Composés plasmatiques	Albumine, fibronectine, fibrinogène, thrombines
Autres protéines et peptides	Apolipoprotéine E, protéines S100, CD40L, VIP
Composés liés à la neurotransmission	ATP et purines associées, agonistes β adrénergiques, glutamate, kainate, NMDA
Ions	K+, Mn2+
Autres composés	PGE2, cannabinoïdes, opioïdes, hormones stéroïdes, vitamine D3

Tableau 2 : Tableau présentant des signaux et des modulateurs de la réactivité microgliale. D'après Hanish et Kettenman, 2007.

Lorsque la microglie possède ce phénotype dit réactif, elle peut avoir de nombreux rôles au sein du système nerveux notamment des rôles neuroprotecteurs. En effet, chez le rat, une greffe de cellules microgliales au niveau de la moelle épinière lésée induit une repousse axonale (Rabchevsky et Streit, 1997). L'application de cellules microgliales sur des cultures organotypiques d'hippocampe réduit la mort neuronale suite à une privation d'oxygène et de glucose (Neumann, 2006). De plus, grâce à l'utilisation de souris où la prolifération des cellules microgliales a été spécifiquement empêchée, une augmentation du nombre de cellules

apoptotiques a été observée lors de l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (Lalancette-Hebert et al., 2007). La microglie est donc neuroprotectrice lors d'accidents vasculaires cérébraux. Cependant, le phénotype de réactivité microgliale peut également être extrêmement dommageable pour le système nerveux en conditions pathologiques comme par exemple dans les lésions de la moelle épinière. En effet, l'application d'un inhibiteur fonctionnel de la microglie, la minocycline –un antibiotique de type tétracycline de seconde génération- à la suite d'une lésion de la moelle épinière permet de réduire la mort des oligodendrocytes ainsi que la dégénérescence des axones et favorise le retour de la coordination des membres (Stirling, 2004). De même, quand on inhibe la prolifération microgliale, le nombre de neurones apoptiques après lésion de la moelle épinière est diminué (Tian et al., 2007). La réactivité microgliale peut également être délétère pour la neurogénèse adulte dans différents modèles de lésions du système nerveux (Ekdahl et al., 2003; Liu et al., 2007).

Le phénotype de réactivité microgliale, tout comme celui de la réactivité astrocytaire, possède donc une ambivalence. Cette ambivalence repose pour beaucoup sur le type d'atteintes du système nerveux et les conditions dans lesquelles la réactivité va avoir lieu. Il reste encore de très nombreuses inconnues dans ce phénomène et de nombreuses études sont encore nécessaires pour permettre de mieux comprendre ses mécanismes et sa genèse. Au-delà de ce phénotype particulier, la microglie exerce des rôles cruciaux au sein du système nerveux. Longtemps ignorés et peu étudiés, ces rôles, vous allez le découvrir, sont nécessaires et sont exercés en permanence. Leurs découverte a permis d'éliminer la vision manichéenne de la microglie résidente versus activée. La microglie exerce toutes ses fonctions « à plein temps » et la microglie activée est en fait seulement une microglie plus active.

C.3- Microglie, quelles fonctions au sein du système nerveux ?

Les cellules microgliales sont impliquées dans plusieurs rôles essentiels au bon fonctionnement du système nerveux aussi bien pendant le développement qu'à l'âge adulte.

Au cours du développement, les cellules microgliales semblent déterminer le bon nombre de neurones. En effet, de nombreux neurones sont éliminés au cours du développement par le processus de mort cellulaire programmée. Au-delà de leur rôle classique de phagocytose des neurones apoptotiques en tant que phagocytes résidents du système nerveux, les cellules microgliales peuvent promouvoir la mort cellulaire programmée (dans la rétine : Frade and Barde, 1998; dans le cervelet : Marín-Teva et al., 2004). Le bon nombre de neurones est aussi régulé par les cellules microgliales en influençant positivement la neurogenèse (Walton et al., 2006). L'action de la microglie est donc ambivalente : stimulation de la neurogenèse et induction de l'apoptose neuronale. Nous verrons plus bas que la microglie est aussi importante pour définir le bon nombre de synapses au cours du développement.

Nous l'avons vu les prolongements microgliaux présentent une grande motilité dans le système nerveux adulte sain avec des extensions et des rétractions. Au cours de cette motilité, des contacts de la microglie avec les neurones et les synapses mais aussi avec les astrocytes et les vaisseaux sanguins peuvent être observés. Ces cellules microgliales, équipées d'un large panel de récepteurs, peuvent donc prendre en compte toute modification de leur environnement. Elles peuvent ainsi détecter des signaux purinergiques (Haynes et al., 2006) ou NO (Dib-Hajj et al., 2007) libérés lors de microlésions ou de lésions plus conséquentes, orientant ainsi leur motilité et pouvant déboucher sur une migration vers la source du signal. Ainsi, on a pu montrer que si la barrière hémato-encéphalique est endommagée ou si on réalise une lésion au laser, les cellules microgliales vont très rapidement entourer la zone lésée. Elles vont former un cercle autour de la zone, réalisant des protrusions au niveau de leurs prolongements vers la zone lésée et rétractant leurs prolongements situés du côté opposé (Davalos et al., 2005; Eichhoff et al., 2011; Nimmerjahn et al., 2005). On parle donc d'un rôle de sentinelle (Nimmerjahn et al., 2005). Cette exploration permanente de l'environnement dépend de l'activité neuronale (Wake et al., 2009). Au cours de cette exploration, les cellules microgliales peuvent bien sûr phagocyter des débris cellulaires.

Des études en microscopie électronique ont montré que les cellules microgliales sont en contact, au niveau d'une synapse, avec l'élément pré-synaptique et post-synaptique ainsi qu'avec les prolongements astrocytaires (Tremblay et al., 2010). Elles sont donc dans une position privilégiée pour jouer un rôle dans la mise en place et le fonctionnement synaptique.

Plusieurs études suggèrent que les cellules microgliales seraient importantes pour le bon développement des synapses et notamment joueraient un rôle dans l'élimination synaptique au cours du développement. Ainsi, des souris n'exprimant plus le récepteur CX3CR1 au niveau de la microglie (je rappelle que le récepteur CX3CR1 est le récepteur de la fractalkine libérée par les neurones) présentent un plus grand nombre d'épines dendritiques et de synapses immatures (Paolicelli et al., 2011). A l'âge adulte cette souris va présenter une potentialisation à long terme de la transmission synaptique dans l'hippocampe moins importante, c'est-à-dire une plasticité synaptique réduite (Rogers et al., 2011). Enfin, une étude a montré que l'injection de LPS à une ratte gestante induisait la présence de réactivité microgliale à la naissance chez les ratons et que, chez ces rats devenus adultes, la transmission synaptique glutamatergique était modifiée (Roumier et al., 2008). Les cellules microgliales sont donc fondamentales pour la mise en place et le bon fonctionnement des synapses. Elle pourrait donc être des partenaires synaptiques actifs.

Des études soulignent l'importance des interactions microglie-astrocytes dans la régulation du fonctionnement synaptique. Ainsi, l'ATP libéré par les cellules microgliales active les astrocytes (via le récepteur $P2Y_1$) qui à leur tour libèrent de l'ATP, recrutant ainsi de nouveaux astrocytes, mais les astrocytes libèrent aussi du glutamate (toujours via le récepteur $P2Y_1$: Domercq et al., 2006), ce glutamate entraînant alors une modification de la transmission synaptique (Pascual et al., 2012). Par leur libération d'IL1β et de TNFα, les cellules microgliales peuvent aussi activer les hémicanaux astrocytaires de connexines 43 entrainant une augmentation de calcium intracellulaire et une libération de glutamate qui modifie la transmission synaptique (Abudara et al., 2015). Ces études suggèrent donc que la microglie pourrait agir comme un véritable

régulateur de la neurotransmission via une interaction avec les astrocytes, aboutissant alors à la participation de 4 acteurs fondamentaux dans la transmission synaptique : on aboutirait alors à la notion de synapse quadripartite. On notera que dans chacune de ces études la microglie présente une réactivité suite à une stimulation par le LPS. Ainsi les preuves de la participation microgliale au fonctionnement synaptique ont été obtenues dans un contexte de réactivité microgliale.

Quand les cellules microgliales détectent une perturbation de l'homéostasie du système nerveux central, elles présentent des activités qui s'exacerbent et/ou des activités spécifiques : une prolifération (Graeber et al., 1988b), une migration vers le site lésé ou pathologique, une importante production de cytokines et chémokines et une importante activité de phagocytose. La microglie activée est donc bien une microglie plus active.

Les cellules microgliales sont donc fondamentales pour la surveillance du système nerveux et pour faire face aux perturbations de celui-ci. Elles sont aussi importantes pour la mise en place des circuits neuronaux et leur bon fonctionnement. Ce dernier rôle semble nécessiter une étroite collaboration avec les astrocytes. Un dialogue continuel entre astrocytes, microglie et neurones semble donc exister. Comme les astrocytes, dans leur lutte contre les perturbations du système nerveux, les cellules microgliales peuvent être ambivalentes en ayant des effets neuroprotecteurs mais aussi des effets délétères.

Astrocytes et cellules microgliales sont pour moi des cellules fascinantes par leurs capacités à nous surprendre, à changer de morphologie, et par leur hétérogénéité… Mon travail de thèse a porté sur ces cellules dans un contexte particulier : celui de la douleur chronique neuropathique. Avant de vous présenter ce qu'est la douleur chronique, quels en sont ses mécanismes et ses singularités, je vous propose d'aborder le thème de la douleur. Après tout, qu'est-ce que la douleur ? Comment la définir ? La douleur est une expérience sensorielle complexe, pour mieux la comprendre, je vous propose de suivre l'évolution du concept de douleur au fil des siècles et

d'aborder ensuite les rôles profonds de l'environnement sur la perception de la douleur par l'individu.

II- La douleur, une expérience sensorielle complexe

Du latin *dolor, souffrance ou douleur,* le mot douleur est un mot-concept très riche. En effet, le mot douleur peut être utilisé dans de nombreux contextes. Il suffit de regarder les synonymes du mot douleur pour se rendre compte de l'amplitude de son utilisation. Ainsi, la douleur côtoie les champs lexicaux de la mort (deuil, déchirement, martyre, larmes), des émotions (angoisse, peine, souffrance, désespoir, désolation), du destin (affres, affliction, malheur, épreuve, détresse), de la religion (géhenne, supplice, martyre, calvaire, repentir, contrition, torture) et bien sûr d'autres plus descriptifs du symptôme : brûlure, rhumatisme, contractions, élancement, plaie… A travers ce vocabulaire transparait l'impact important de la culture et de la société sur le terme même de douleur. J'aborderai ici l'évolution du concept de douleur au cours du temps et nous verrons que le regard de la société fait évoluer le rapport aux soins et les pratiques médicales. Dans un second temps, je présenterai comment la culture et l'environnement peuvent influer sur la douleur.

A- De l'antiquité à nos jours, un concept en perpétuelle évolution

La douleur est un phénomène qui de tout temps a intrigué les Hommes. De nombreuses hypothèses au phénomène douloureux se sont succédées au fil des siècles : le courroux de Divinités ou de Dieu, des pratiques magiques, des lésions physiques, de la folie etc.. Nous savons que les sumériens, environ cinq mille ans avant nous, utilisaient déjà le pavot pour soulager les douleurs. Ainsi, de tout temps, soulager la douleur et expliquer les causes de ce phénomène ont été des priorités pour les médecins et les soignants quels qu'ils soient. Plus récemment, le travail des chercheurs sur la douleur a permis et permet encore des avancées importantes dans la compréhension de la physiologie de la douleur et des pathologies comme les douleurs chroniques. Mais comment sommes-nous arrivés à notre conception actuelle de la douleur ? Quelle est cette conception ? Comment les pratiques ont-elles évolué au fil du temps ? Nous

verrons dans cette partie comment le concept de la douleur, de ses causes et ses méthodes de prises en charge ont évolué au cours du temps pour arriver à notre définition actuelle de la douleur.

Dans un premier temps de l'histoire de la douleur, le concept de douleur était intimement lié aux divinités. Les douleurs physique et morale étaient également souvent confondues. Chez les grecs, il existe les esprits de la douleur et de la souffrance ou Algées, l'esprit du chagrin, de la douleur et des lamentations ou divinité Penthus, et le fleuve de la douleur parmi les fleuves des enfers ou Achéron. Les divinités peuvent être en colère et la douleur pourra être alors un châtiment divin. Ainsi, Artémis préside aux douleurs de l'enfantement par l'envoi de ses flèches aux femmes en couches. Il existe de multiples divinités guérisseuses comme Epione, déesse-nymphe de l'apaisement de la douleur et femme d'Asclépios, lui-même médecin, divinisé et vénéré comme le Dieu de la médecine. Il existe aussi Apollon, Iaso, Hygie… Au cours de cette période, les prêtres médecins vont devenir peu à peu des philosophes médecins et élaborer des théories philosophiques de la douleur entraînant peu à peu la médecine hors de l'influence religieuse. Ainsi, le philosophe grec Platon (428-347 av J.C) pense que la douleur et le plaisir bien qu'opposés sont tous deux des affections touchant l'ensemble du corps et sont toutes deux ressenties par le centre de l'Âme de l'Homme : le cœur. Aristote (384-322 av J.C), philosophe grec émérite, quant à lui pense que la douleur trop intense est nuisible et qu'elle est due à une augmentation de la sensibilité aux différentes sensations, notamment une exacerbation du toucher causé par un excès de chaleur vitale. Démocrite d'Abdère (430-370 av J.C), qui proposa la théorie des quatre humeurs (qui sera diffusée plus largement par Hippocrate de Cos), pense que la maladie est une altération de ces humeurs. Ceci fait de la maladie un phénomène naturel et non pas divin. Un médecin-philosophe grec parmi les plus connus est Hippocrate (430-380 av J.C), dit le Grand ou de Cos. Il est traditionnellement considéré comme le père de la médecine. Dans son *Corpus Hippocraticum* il propose des drogues d'origine végétale comme le suc de pavot, la belladone, la jusquiame, le lierre, l'écorce de saule, pour leurs vertus sédatives, narcotiques et

analgésiques. Ainsi, l'utilisation d'opium était prescrite et la fleur de pavot somnifère ornait le temple de Morphée, Dieu des songes De même, l'écorce de saule (contenant, nous le savons, de l'acide salicylique) était également recommandée pour soulager les douleurs de l'enfantement et lutter contre la fièvre.

Ainsi au IV^{ème} siècle avant notre ère, en Grèce, la douleur est présentée comme un sujet philosophique, décrite comme la conséquence d'un déséquilibre des humeurs et est traité par l'application de diverses substances pour permettre de soulager la douleur.

Après la conquête de la Grèce par les romains, les médecins grecs arrivèrent nombreux à Rome. Là, de nombreux médicaments sont prescrits et Pedanius Dioscorides (40-90), médecin pharmacologue et botaniste grec, dans son « *De Materia Medica* » propose près de neuf cent substances pour permettre de soulager les malades. Nous citerons pour exemple les effets analgésiques du pavot, de la mandragore, de la belladone, du lierre, de la laitue blanche et de la jusquiame. De plus, un siècle avant notre ère, Aulus C. Celsus (25 av J.C.-50 ap J.C.), médecin et écrivain romain, propose que chaque douleur puisse être diagnostiquée en fonction de sa topographie et de ses signes associés à visée diagnostique et pronostique (« *De re medicina* »). Claude Galien (131-216), médecin grec, découvre quant à lui le rôle conducteur des nerfs et localise l'âme rationnelle dans le cerveau (les ventricules plus précisément) et le pneuma sensoriel dans le cœur. Il pense toujours que la douleur est une passion de l'âme et qu'elle est ressentie par le cœur. Pour lui, la douleur indique l'organe malade. Il sera une des références en termes de médecine pendant plusieurs siècles.

Nous l'avons vu, l'antiquité gréco-romaine a permis un changement dans le concept de la douleur : passant de la punition divine à une approche philosophique proposant la douleur comme une aide à la localisation d'un organe malade. Les médecins prescrivent également des traitements pour soulager ces douleurs, en utilisant des extraits végétaux. Le Moyen-Âge ne va pas permettre d'avancées, nous pourrions même qualifier cette période de recul quant aux

traitements proposés et aux approches de la douleur. En fait, l'influence du christianisme sur le comportement face à la douleur est très importante, ceci est lié notamment aux souffrances du Christ lors de la Passion. La douleur est perçue comme un châtiment infligé par Dieu et un moyen expiatoire de s'absoudre du pécher originel. La douleur acquiert alors une valeur rédemptrice et l'usage des plantes sédatives est limité voire même condamné car potentiellement magique, maléfique et païen. Cette période du Moyen-Âge est donc assez dramatique pour les traitements de la douleur et replace la douleur comme pouvant résulter d'un châtiment divin. La douleur est perçue comme étant un symptôme du tact, conséquence d'un déséquilibre de la qualité des quatre humeurs. Il faudra attendre la Renaissance pour que l'approche de la douleur soit remise en question par les médecins et philosophes. Ainsi, le philosophe René Descartes (1596-1650) étudiera les sens et la douleur. Il propose que le point de convergence et d'analyse de toutes les sensations se trouve dans la glande pinéale, donc dans le cerveau. Il est alors le premier à proposer cette hypothèse. Lors de la Renaissance, il existe trois positions différentes sur le comportement face à la douleur. Dans le premier cas, on a une attitude humaine mais résignée, une compassion envers la douleur extrême. Dans le second cas, la douleur est perçue comme nécessaire à la guérison, tel un sixième sens vigilent. Lors des opérations chirurgicales, réalisées sans anesthésie à l'époque, les cris ont leur utilité… La troisième approche présente la douleur comme une ennemie intérieure redoutable, destructrice devant être supprimée. Une fois le signal d'alarme donné, il ne doit pas être prolongé. Pierre J. G. Cabanis (1757-1808), médecin, physiologiste et philosophe français dira « Rien de ce qui peut causer la douleur est salutaire, elle doit toujours être regardée comme nuisible ». Le chirurgien-en-chef des armées napoléoniennes, le Baron Dominique-Jean Larrey (1766-1842), dira en 1812 « Guérir parfois, soulager souvent, comprendre toujours ». Il sera le premier français à soutenir l'usage de l'anesthésie pour les chirurgies. A cette même époque les découvertes en matière de physiologie vont permettre de mieux comprendre de nombreux mécanismes comme l'intégration des stimulations sensorielles grâce aux découvertes des récepteurs cutanés

notamment par Filippo Pacini (1812-1883) et Georg Meissner (1829-1905), le rôle des terminaisons libres dans la douleur par Maximilian von Frey (1852-132), mais également la différentiation des racines postérieures sensitives et ventrales motrices de la moelle épinière par François Magendie (1783-1855) et Sir Charles Bell (1774-1842).

Ainsi, en près de vingt siècles, presque aucun progrès en matière de traitements n'a été fait. Après un obscurantisme lié au Moyen-Âge, la Renaissance est une période où les usages des traitements antalgiques prescrits autrefois commencent peu à peu à être réutilisés. Il faudra cependant attendre les transformations de la médecine en médecine moderne pour mieux comprendre la douleur et mieux la traiter. Ainsi, Félix Hoffman (1868-1946) synthétise en 1897 l'acide acétylsalicylique, molécule active présente dans l'écorce de saule. La morphine est isolée de l'opium en 1805 par Friedrich W. Sertürner (1783-1841). En 1906, Sir Charles Scott Sherrington (1857-1952), médecin et scientifique britannique inventeur du mot synapse, découvre les nocicepteurs. Il s'agit de récepteurs détectant des stimuli potentiellement dangereux pour l'organisme. Ces nocicepteurs ne seront acceptés par la communauté scientifique qu'après les travaux du neuroscientifique américain Edward R. Perl (1926-2014) en collaboration avec Paul R. Burgess et Paul Bessou en 1967 et 1969 respectivement (Bessou and Perl, 1969; Burgess and Perl, 1967). Après de longues années de débat sur l'anesthésie, la pratique de l'anesthésie générale sera rendue obligatoire en 1847, laissant le chirurgien seul, sans les cris du patient…

De nos jours, de très nombreux progrès ont été réalisés sur le plan neurophysiologique. Nos connaissances des mécanismes physiopathologiques générateurs de douleurs sont bien meilleures. En effet, de nombreux laboratoires dissèquent les mécanismes impliqués dans les mécanismes physiologiques et pathologiques de la douleur. Il existe également aujourd'hui une différenciation entre la douleur chronique ou pathologique et la douleur aigüe symptomatique. Enfin, les patients sont pris en charge de manière interdisciplinaire afin de traiter à la fois le

corps malade et les conséquences psychiques de tels événements. La douleur n'est plus une fatalité, en 2004, la lutte contre la douleur est devenue une priorité de santé publique.

Actuellement, il existe une association internationale pour l'étude de la douleur, l'IASP (international association for the study of pain). Cette association donne des critères, des outils et des définitions pour permettre d'améliorer la communication avec les patients, mieux les comprendre et améliorer la prise en charge et le traitement des douleurs. La définition actuelle de la douleur donnée par l'IASP est la suivante : « La douleur est une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle ou décrite en ces termes. ». La douleur est donc une expérience sensorielle (encodage et analyse de la qualité, de l'intensité, de la durée et de la localisation des stimulations nocives : on parle de nociception) et une expérience émotionnelle/affective (caractère désagréable). On soulignera de plus que le lien de cause à effet entre la douleur et la lésion n'est pas obligatoire : les douleurs sans lésions apparentes sont donc reconnues.

Ainsi, après plusieurs siècles et différents concepts de la douleur, actuellement, l'aspect complexe de l'expérience douloureuse est pris en charge en incluant à la fois ses composantes sensori-discriminatives mais aussi ses composantes affectives, émotionnelles et socioculturelles. Nous verrons à travers ce manuscrit, que les structures supra-spinales jouent un rôle clef dans les diverses facettes de cette expérience.

Nous en avons tous conscience, l'expérience douloureuse n'est pas la même d'un individu à l'autre... Mais à quoi cela pourrait-il être dû ? Quels facteurs peuvent influencer notre jugement et notre apprentissage de l'expérience douloureuse ? Je discuterai ici du rôle de l'environnement, notamment de la culture dans l'expérience de douleur en m'appuyant sur des études anthropologiques.

B- L'environnement : un protagoniste important

L'intégration de la douleur est un phénomène actif et conscient. Il est nécessaire de pouvoir identifier cette douleur. Pour cela, l'individu a recours à ses expériences passées vécues mais aussi aux expériences transmises par l'environnement, c'est-à-dire par ses proches, sa culture etc. L'individu doit nommer la douleur, cette dénomination va nécessairement l'attirer dans des systèmes de valeurs qu'il a appris. Le langage va bien sûr être un élément clef de cette description et un vocabulaire caractéristique de la douleur pourra être utilisé. Ce dernier va être différent en fonction de la langue utilisée. L'usage de métaphores pour décrire la douleur est très fréquent et codifié au sein d'une culture donnée. On donnera l'exemple de l'étau, de la sensation de brûlure ou encore de coups de poignard. Toutes ces métaphores doivent permettre de décrire au mieux la douleur pour qu'elle soit comprise par les autres et intégrée par soi-même. L'individu doit donc pouvoir communiquer cette information sous forme de gestes, de mots, de cris, de mimiques spécifiques à sa culture, afin d'adopter un comportement compréhensible permettant de partager et de transmettre son expérience de douleur aux autres.

Ainsi, l'intégration et la communication de la douleur sont propres à chacun et codifiées par l'environnement à la fois culturel et social de l'individu mais aussi par l'environnement immédiat auquel il fait face au moment de son expérience douloureuse. Plusieurs indices existent aujourd'hui pour montrer que le rôle de l'environnement joue un rôle important dans l'expérience douloureuse.

Je présenterai ici deux citations que je trouve très intéressantes. Elles proposent une approche anthropologique de l'expérience douloureuse, que nous savons être différentes en fonction des cultures.

« *Ce ne sont pas seulement les malades qui intègrent leur douleur dans leur vision du monde, mais également les médecins et les infirmières, qui projettent leurs valeurs, et souvent leurs préjugés, sur ce que vivent les patients dont ils ont la charge*. » Extrait du livre *Anthropologie de la douleur* de

l'anthropologue et sociologue David Le Breton (né en 1953) et professeur à l'université de Strasbourg (Le Breton, 2006). « *La réponse pratique n'est pas de connaître en détail l'infini des cultures, mais d'être au courant de ces variétés et de la variété, et de la manière dont elles peuvent affecter les pratiques de santé[…] et de rendre les praticiens sensibles à l'héritage culturel du patient, à leur propre héritage, et ce qu'il devient lorsque ces différents héritages se rencontrent.* » Irving K. Zola (1935-1994), écrivain américain.

De même, l'expérience douloureuse est modulée par le rôle social attribué à chacun. Ainsi, la représentation sociale de l'expérience douloureuse est différente en fonction du sexe (Keogh and Denford, 2009). La société détermine également ce qui est acceptable en termes de douleur de ce qui ne l'est pas. Ceci permet aux individus de se situer afin de se construire une identité stable et cohérente avec leur douleur et de faciliter la relation avec les autres. Ces balises vont également avoir un rôle dans le mode de prise en charge des patients par les médecins et les traitements qui leurs seront administrés. La société a donc un impact important sur la perception de la douleur, aussi bien sur la perception de l'expérience douloureuse de chaque individu que sur la perception de la douleur de l'autre.

L'environnement proche lors du stimulus douloureux va également modifier l'expérience de douleur. Ainsi, Krahé et ses collègues en 2013 ont réétudié vingt-six études conduites chez les humains sur une douleur induite expérimentalement (Krahé et al., 2013). Dans ces études, on mesurait les seuils douloureux des participants en présence d'une autre personne connue ou non, plus ou moins proche, ou de l'expérimentateur seul. Ces études montrent que les personnes qui accompagnent le participant, en fonction de leur implication, de leur rôle actif ou non, de leurs relations plus ou moins fortes avec le participant vont induire des modifications de la perception de la douleur chez les participants. Selon les cas, les seuils douloureux seront plus bas ou plus élevés. Ces résultats sont extrêmement intéressants. Nous y reviendrons mais nous savons grâce aux techniques d'imagerie cérébrale, que ces résultats sont dus à des modifications de l'activité de diverses structures supra-spinales. Ces structures supra-spinales sont également

impliquées dans le phénomène d'empathie (Mutschler et al., 2013). L'empathie a un rôle clef dans le fonctionnement social et donc le comportement. Se mettre à la place d'une personne qui souffre semble être un processus automatique (van der Heiden et al., 2013). La relation aux autres et notamment leurs expressions faciales peuvent également modifier notre intégration d'une expérience douloureuse. Ainsi, si on présente des visages tristes avant un stimulus douloureux aux participants, l'intensité de la douleur ressentie et son inconfort seront plus importants et leur humeur sera moins bonne. Le changement d'humeur est corrélé aux modifications de la perception de l'intensité du stimulus. Des visages neutres ou heureux ne semblent pas causer de modification de la perception douloureuse (Bayet et al., 2014). Des tests sur des placebos ont permis de mettre en évidence que le fait de visualiser des photographies de visages douloureux ou heureux augmentait l'analgésie induite par le placebo à l'inverse de visages neutres. Les visages heureux augmentent l'analgésie de manière plus importante.

Nous l'avons vu, l'environnement exerce une action importante sur la perception de l'expérience douloureuse. Il est donc un protagoniste actif dans l'intégration des stimuli douloureux. Il est nécessaire de connaître ces phénomènes et leurs mécanismes pour pouvoir améliorer la prise en charge des patients. Pour comprendre ces mécanismes, il est nécessaire d'étudier la manière dont un stimulus douloureux est intégré jusqu'à sa perception consciente. En effet, ce sont certaines des structures supra-spinales impliquées dans l'intégration de la nociception qui vont être impliquées dans ces modifications de la perception de la douleur.

Comment un stimulus douloureux est-il détecté et comment le message nociceptif est-il acheminé et intégré pour aboutir à la perception consciente de ce stimulus ?

III- Du stimulus douloureux à sa perception consciente

Comment un stimulus douloureux devient-il perceptible consciemment ? Quelles sont les voies anatomiques d'intégration de la nociception ? Je vous propose d'aborder brièvement les nocicepteurs, le relais spinal et les voies ascendantes, puis de manière plus détaillée le relais thalamique et enfin l'intégration corticale. Je vous présenterai à la fin de cette partie le concept de matrice centrale de la douleur. Nous verrons que l'intégration de la nociception est un processus précis impliquant de nombreuses structures interconnectées pour aboutir à la perception consciente de la douleur.

A- Du stimulus aux voies ascendantes

Lorsqu'un stimulus douloureux survient, il est détecté par les nocicepteurs. Découverts par Charles S. Sherington en 1906, les nocicepteurs seront adoptés par la communauté scientifique à la suite des travaux de Burgess, Perl et Bessou (Bessou and Perl, 1969; Burgess and Perl, 1967; Whitehorn and Burgess, 1973). Ces nocicepteurs ont la capacité de détecter des stimuli qui peuvent potentiellement endommager les tissus. Ils se situent dans de très nombreux tissus : cutanés, musculaires, vasculaires, articulaires, osseux et viscéraux. Ces récepteurs nociceptifs sont activés soit directement par le stimulus nociceptif (une stimulation de forte intensité) soit indirectement par des molécules algogènes (littéralement, *qui provoque la douleur*) qui sont libérées lors de la lésion d'un tissu (la lésion est le signal initial). Il existe plusieurs types de nocicepteurs : des nocicepteurs polymodaux, répondant à des stimuli mécaniques et thermiques, des mécano-nocicepteurs répondant à des stimuli mécaniques uniquement, des thermo-nocicepteurs répondant à des stimuli thermiques uniquement et des chémo-nocicepteurs répondant à des molécules telles l'histamine, l'acide ou la capsaïcine (substance active du piment). Ainsi, les nocicepteurs peuvent détecter différents stimuli physiques et chimiques.

Les membranes cellulaires des nocicepteurs possèdent de nombreux canaux. La figure 8 (adaptée de Scholz et Woolf, 2007), vous illustre différents canaux permettant la transduction des différents stimuli détectés par les nocicepteurs. Par exemple, on peut citer le canal TRPV-1

pour *transient receptor potential vanilloid 1*, canal ionotropique détectant des molécules de la famille des vanilloïdes comme la capsaïcine. TRPV-1 répond également à des stimulations thermiques supérieures à 44°C (Caterina et al., 1997). Tous ces canaux sont nécessaires à la bonne détection des informations nociceptives par le système nerveux et contribuent à la survie de l'individu par la préservation de son intégrité physique au sein de son environnement.

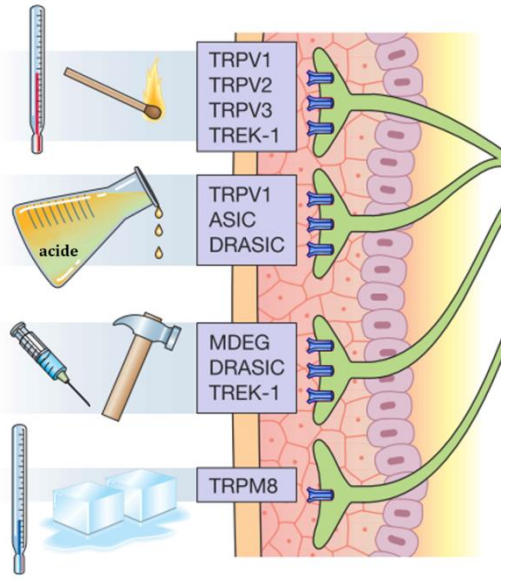


Figure 8 : Illustrations des différents canaux permettant la transduction des informations codées par les nocicepteurs.
Avec : TRPV pour transient receptor potential vanilloid, TREK pour potassium channel subfamily K, ASIC pour acid-sensing ion channel, DRASIC pour DRG acid-sensing ion channel, MDEG pour mammalian degenerin, TRPM pour transient receptor potential cation channel subfamily M.
Illustration adaptée de Scholz et Woolf, 2002.

L'information détectée par les récepteurs sensoriels est transmise via leurs prolongements vers le système nerveux : on parle de fibres afférentes. Le tableau 3 vous présente les différentes caractéristiques de ces fibres. Les fibres Aβ sont des fibres de gros diamètre, richement myélinisées, elles proviennent majoritairement de la peau et acheminent les stimuli mécaniques non nociceptifs. Les fibres Aδ sont plus petites et moins myélinisées, elles acheminent l'information douloureuse. Les fibres C, encore plus petites et non myélinisées, transmettent elles aussi l'information nociceptive mais également les informations thermiques non douloureuses. Ces deux derniers types de fibres sont donc les fibres transportant la majorité des informations nociceptives. Les propriétés respectives de ces fibres, notamment à travers la vitesse de conduction de l'information nerveuse, aboutissent à une discrimination temporelle dans la détection du stimulus douloureux. Les fibres Aδ permettent une détection rapide et aigüe

du stimulus alors que les fibres C, dont la conduction est plus lente, apportent une réponse différée et plus diffuse.

Fibre Aβ	**Fibre Aδ**	**Fibre C**
Fibre myélinisée de large diamètre (6-12µm). Sensibilité tactile. **Fibre non nociceptive**	Fibre peu myélinisée de diamètre intermédiaire (1-5µm). Sensibilité nociceptive : mécanique, thermique et chimique. **Fibre nociceptive**	Fibre non myélinisée de petit diamètre (0,2 à 1,5µm). Sensibilité nociceptive : mécanique, thermique et chimique Sensibilité non nociceptive : thermique et démangeaisons. **Fibre nociceptive et non nociceptive**

Tableau 3 : Tableau résumant les principales propriétés des fibres afférentes sensorielles. Tableau adapté de Julius et Basbaum, 2001.

Tous les corps cellulaires des nocicepteurs se trouvent au sein de ganglions : les ganglions rachidiens dorsaux pour les afférences provenant du tronc et des membres et le ganglion crânien de Gasser pour les afférences en provenance de la tête. Comme ces neurones sont pseudo-unipolaires, leurs prolongements vont ainsi projeter à la fois vers la périphérie, où ils auront leurs terminaisons sensorielles, mais également vers des neurones présents au sein de la moelle épinière, pour les informations en provenance du tronc et des membres, et du complexe du trijumeau pour celles en provenance de la sphère oro-faciale. Ce sont donc des neurones sensoriels primaires. Ils réalisent la transduction nociceptive c'est-à-dire la transformation d'un stimulus nocif en un message nerveux.

La moelle épinière est le premier relais des informations douloureuses provenant du tronc et des membres. La moelle épinière est une structure appartenant au système nerveux central. Située sous le tronc cérébral, elle peut être divisée en quatre segments : cervical, thoracique, lombaire et sacré. Chacun de ces segments reçoit des fibres en provenance de parties spécifiques du corps, de manière ségrégée. Il existe donc une somatotopie rostro-caudale de la moelle

épinière. La moelle épinière, comme le reste du système nerveux central, peut être subdivisée en deux « entités » : la substance blanche et la substance grise. La substance blanche regroupe des faisceaux d'axones ascendants et descendants. Dans la moelle épinière, elle est située en périphérie (Fig. 9) et on peut parler de cordons dorsaux, latéraux et ventraux selon leur position. La substance grise quant à elle regroupe les corps cellulaires des neurones. Elle se situe au centre de la moelle épinière, autour du canal rachidien. La substance grise peut elle-même être divisée en deux parties : la corne dorsale, sensitive, qui reçoit les afférences sensitives de la périphérie et la corne ventrale, motrice, qui renferme les corps cellulaires des motoneurones et émet des efférences motrices vers les jonctions neuro-musculaires (Fig. 9). La taille des neurones et leurs différences de densité au sein de la substance grise a permis d'en établir une cartographie. Par des approches cyto-architecturales, le neuroscientifique suédois Bror Rexed (1914-2002) a établi dans les années 1950 une nomenclature de la substance grise de la moelle épinière. Elle est constituée de différentes couches ou laminae comme vous pouvez l'observer sur la figure 9. Ce sont principalement les laminae I, IIo (o pour outer, donc externe), V et VI qui sont impliquées dans l'intégration des informations nociceptives.

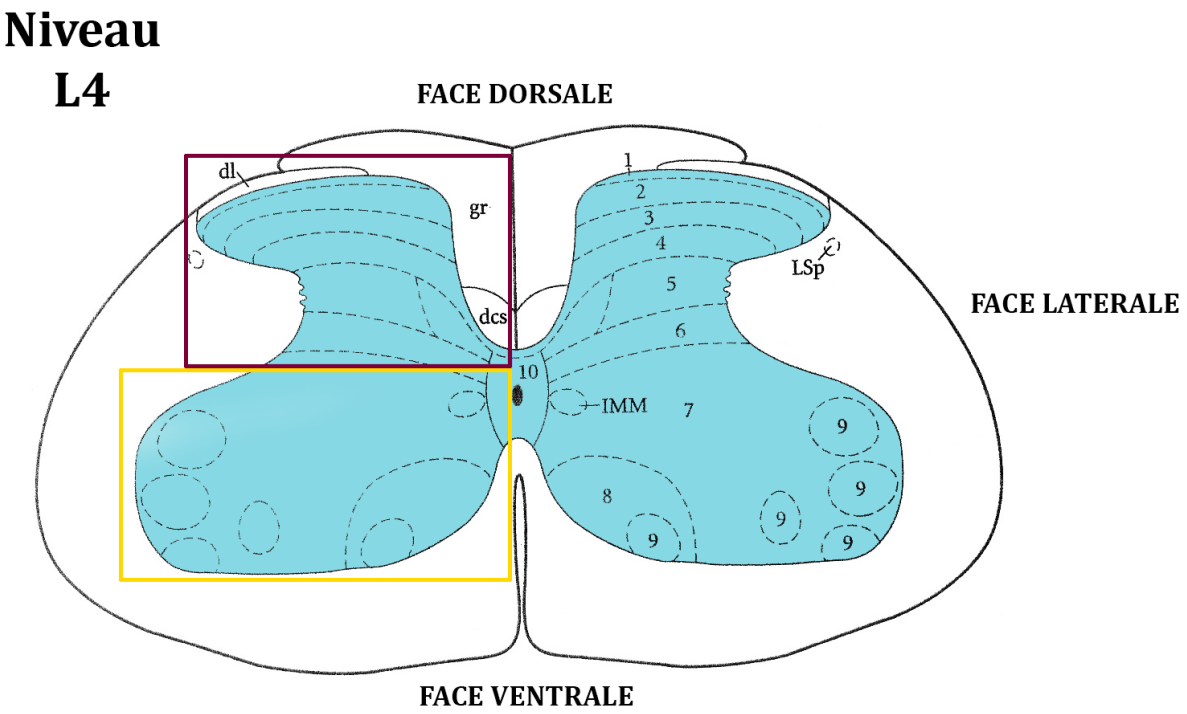


Figure 9 : Représentation schématique d'une coupe transversale au niveau lombaire 4 de la moelle épinière de rat, présentant les dix couches (laminae) de Bror Rexed. La zone blanche délimitée en noir, représente la substance blanche, celle coloriée en bleu la substance grise. La corne dorsale (gauche) de la moelle épinière, recevant les afférences sensorielles, est dans le cadre bordeaux et la corne ventrale (gauche), émettant les afférences motrices, est dans le rectangle jaune. dl = faisceau de Lissauer ; gr = faisceau gracile ; dcs = faisceau corticospinal dorsal ; LSp = noyau spinal latéral ; IMM = colonne intermédiomédiane

Les neurones présents dans la corne dorsale de la moelle épinière et impliqués dans l'intégration de la nociception sont de plusieurs types. Les deux types principaux sont les neurones nociceptifs spécifiques à haut seuil (appelés neurones NS, pour nociceptifs spécifiques) et les neurones à convergence, encore appelés nociceptifs non-spécifiques ou polymodaux ou encore neurones à large gamme réceptive (appelés WDR, pour wide dynamic range). Les neurones NS ne répondent qu'à des stimulations nociceptives de haute intensité (Fig. 10 B). Ils sont présents en majorité au sein des laminae I-II et en plus faible quantité au sein de la lamina V. Ils reçoivent des afférences provenant de fibres Aδ et C. Les neurones WDR sont présents en majorité au sein de la lamina V et en plus faible quantité au sein des laminae I-II. Ils reçoivent à la fois des afférences de fibres sensorielles nociceptives (Aδ et C) et non nociceptives (Aβ). Ces neurones répondent de manière croissante en fonction de l'intensité du stimulus (Fig. 10 A). Ils peuvent répondre pour un stimulus tactile à bas seuil mais aussi pour une stimulation nociceptive de

haute intensité (Fig. 10 A). Un même neurone WDR peut recevoir des afférences provenant de tissus cutanés, viscéraux, musculaires ou articulaires. Cette convergence d'informations est un substrat anatomique au phénomène bien connu de douleurs projetées. Un exemple de douleur projetée est la douleur ressentie dans le bras gauche lors d'un infarctus du myocarde, qui correspond à une lésion viscérale cardiaque.

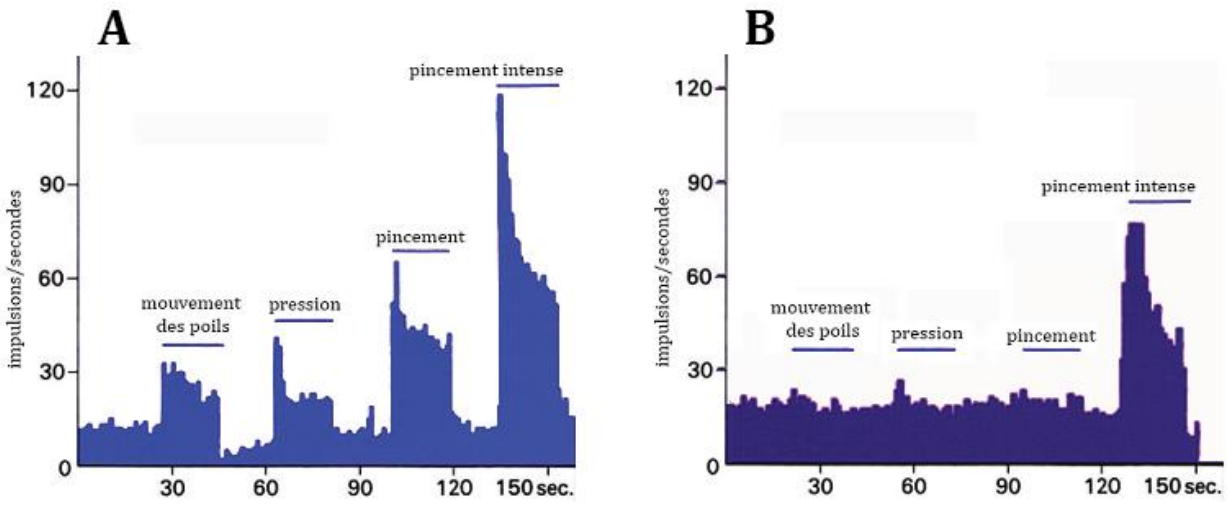


Figure 10 : Caractéristiques des deux principaux types de neurones nociceptifs rencontrés au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière : les neurones WDR et NS. Les figures A et B représentent les impulsions par secondes en fonction de l'application de diverses stimulations. En A, les réponses d'un neurone spinal de type WDR et en B, celles d'un neurone spinal de type NS. Le neurone WDR en A répond à plusieurs types de stimulations, et accentue sa décharge en fonction de l'intensité du stimulus. Le neurone NS quant à lui répond uniquement à un stimulus douloureux intense. D'après Besson, 1985.

Des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière sont des neurones de projection et vont donc transmettre l'information nociceptive vers les centres supérieurs. Ces neurones de projection se trouvent majoritairement dans la lamina I et de manière moindre dans les laminae V-VI. L'articulation synaptique nocicepteurs-neurones de projection peut être directe (monosynaptique) ou indirecte (polysynaptique) avec des interneurones excitateurs ou inhibiteurs intermédiaires. Ces interneurones peuvent projeter au sein d'une même couche de la substance grise, dans une autre couche mais au sein du même segment ou carrément dans un autre segment. Chacun des protagonistes (neurones de projection et interneurones) peut

appartenir aux classes que nous avons vues précédemment : WDR ou NS. Des circuits synaptiques complexes existent donc dans la corne dorsale de la moelle épinière et représentent donc la première étape de l'intégration de l'information douloureuse. Cette étape contribue au codage sensori-discriminatif des informations douloureuses en provenance de la périphérie.

Les axones des neurones de projection et de leurs cibles se regroupent en différents faisceaux. Je présenterai ici l'organisation des faisceaux médullaires relayant les informations nociceptives vers les centres supérieurs chez le rat. Le principal faisceau acheminant les informations nociceptives est le faisceau spino-thalamique. Il achemine majoritairement les informations via le quadrant controlatéral ventrolatéral de la substance blanche de la moelle épinière. En effet, il existe une décussation des fibres. Ainsi, les informations en provenance du côté droit du corps (côté ipsilatéral) seront acheminées puis transmises à des structures cérébrales situées du côté gauche du cerveau (côté controlatéral) et vice versa. Ce faisceau regroupe des axones issus des neurones présents au sein des couches I, IV, V, VII et VIII de Rexed. Ses principales cibles sont les noyaux thalamiques ventropostérolatéral (VPL), central latéral (CL) et postérieur (Po) ainsi que le tronc cérébral (Burstein et al., 1990; Cliffer et al., 1991; Giesler et al., 1976, 1979, 1981).

Le faisceau spino-parabrachial provient des axones de neurones de la couche I principalement (Bester et al., 1997) Ces fibres projettent sur le sous noyau parabrachial interne qui est impliqué dans les réponses cardiovasculaires, autonomes et motivationnelles à la douleur. On note des projections du noyau parabrachial sur l'amygdale, l'hypothalamus mais aussi sur le thalamus avec notamment le noyau paracentral (PC) (Bester et al., 1999). Ce faisceau se trouve dans le cordon dorsolatéral et ses afférences sont majoritairement controlatérales. Il est parfois décrit comme une partie du faisceau spinomésencéphalique.

Le faisceau spino-réticulaire est constitué majoritairement des axones des neurones de projection des couches V, VII et VIII et projette sur la formation réticulée bulbaire puis sur les noyaux thalamiques parafasciculaire (Pf) et ventromédian (Villanueva et al., 1998; Zemlan et al.,

1978). Ce faisceau se situe dans le cordon ventrolatéral et ses afférences sont majoritairement controlatérales.

Le faisceau spino-cervico-thalamique est constitué des axones des neurones des couches III et IV et projette vers le noyau cervical latéral puis les noyaux thalamiques VPL et Po (Blomqvist et al., 1985; Giesler et al., 1988). Il se situe dans le quadrant dorsal de la moelle épinière. Il chemine ipsilatéralement dans la moelle épinière puis controlatéralement après son passage dans le noyau cervical latéral.

Le faisceau des colonnes dorsales, ou lemnisque médian, est constitué des axones des neurones des couches III à V. Il est majoritairement impliqué dans l'intégration de l'information non douloureuse somesthésique et projette vers le thalamus via les noyaux graciles et cunéiformes du bulbe rachidien (Giesler et al., 1984; Ma et al., 1987; Raboisson et al., 1996). Les fibres de ce faisceau cheminent ipsilatéralement dans la moelle épinière puis controlatéralement après le bulbe rachidien. Cependant, et c'est la raison pour laquelle je vous le présente, des preuves de l'implication de ces fibres dans la nociception ont été avancées. De nombreuses données prouvent que certaines fibres acheminent des informations nociceptives viscérales (Al-Chaer et al., 1997, 1998; Hirshberg et al., 1996). De plus, la lésion de cette voie des colonnes dorsales est capable de diminuer les symptômes douloureux dans des modèles de douleur viscérale (Al-Chaer et al., 1998; Willis et al., 1999).

Pour finir, le faisceau spino-hypothalamique est constitué d'axones de neurones présents dans les couches I, V et X de la moelle épinière. Ce faisceau est impliqué dans la transmission d'informations nociceptives. Le trajet de ses fibres est complexe mais *a priori* aboutit à des projections hypothalamiques et thalamiques aussi bien ipsilatérales que controlatérales (pour revue voir Giesler et al., 1994).

Cette présentation organisée mais simplifiée des faisceaux ascendants de l'information nociceptive ne doit pas masquer la complexité de ces voies. Ainsi, certains noyaux cérébraux

(par exemple le noyau parabrachial) peuvent recevoir des informations en provenance de plusieurs voies ascendantes (elles émettent donc de nombreuses collatérales) et certaines régions décrites ici comme des cibles indirectes (par exemple l'amygdale) peuvent aussi recevoir des projections directes de la moelle épinière.

En ce qui concerne les projections, j'ai souvent utilisé le terme « majoritairement controlatéral » ce qui sous-entend donc que certaines projections sont bilatérales. De plus certaines afférences projettent effectivement bilatéralement par exemple sur le thalamus (voir le faisceau spinohypothalamique). Nous garderons donc à l'esprit que les afférences nociceptives vont projeter principalement sur le thalamus controlatéral mais qu'elles vont aussi avoir accès au thalamus ipsilatéral.

Au-delà de ces faisceaux ascendants, il existe aussi une modulation (inhibitrice mais aussi facilitatrice) des informations nociceptives via des fibres en provenance des centres supérieurs. Ces fibres descendantes peuvent agir sur les fibres afférentes ou sur les neurones de projection (directement ou sur les interneurones les contactant). On citera la substance grise périaqueducale de laquelle partent les principales fibres qui forment le système inhibiteur descendant de la douleur. Elle reçoit des informations nociceptives via le faisceau spinomésencéphalique.

Enfin, on notera que pour les informations douloureuses de la face, le faisceau trigémino-thalamique les transmet du complexe du trijumeau dans le tronc cérébral vers les noyaux ventropostéromédian (VPM) et Po, le thalamus médian et aussi le VPL (Fukushima et Kerr, 1979; Iwata et al., 1992).

Dans cette première partie, nous avons abordé la manière dont le stimulus est détecté et dont l'information est acheminée vers des structures supra-spinales. Maintenant, je vous propose de nous focaliser sur une structure supra-spinale cruciale dans l'intégration de la nociception : le

thalamus, cible principale des faisceaux de fibres en provenance de la moelle épinière et du complexe du trijumeau.

B- Le thalamus, une structure clef dans l'intégration de la nociception

L'implication du thalamus, et de manière plus générale de l'ensemble des structures supra-spinales, dans l'intégration de la douleur n'a été découverte et étudiée que tardivement. En effet, l'hypothèse du rôle du thalamus dans l'intégration du processus douloureux n'a été émise qu'entre la fin du XIXème siècle et le début du XXème. En 1911, Head et Holmes remarquèrent que les soldats présentant des lésions du lobe pariétal du cortex ressentaient toujours la douleur. Ils pensèrent donc que le cortex n'était que faiblement impliqué dans le processus d'intégration de la douleur et proposèrent que le thalamus soit une structure clef dans ce processus. Plusieurs études de cas ont pu mettre en évidence les effets analgésiques de l'interruption du faisceau spinothalamique par la cordotomie antérolatérale et laissaient présumer le rôle important du thalamus dans l'intégration de la nociception. Un argument supplémentaire au rôle fondamental du thalamus dans l'intégration de la nociception a été la description en 1906 par Déjerine et Roussy du syndrome thalamique. J'y reviendrai plus longuement dans le chapitre concernant thalamus et douleur neuropathique. L'essor des connaissances actuelles sur le rôle des structures supra-spinales dans la nociception est majoritairement dû à deux facteurs. D'une part, les ablations neurochirurgicales (thalamotomies par exemple) et les stimulations électriques de structures supra-spinales à visées antalgiques chez des patients douloureux chroniques ont permis d'explorer les rôles de différentes structures. D'autre part, l'avènement de techniques d'imagerie de très haute résolution aussi bien temporelle que spatiale a permis de visualiser *in vivo* et en temps réel les activités de l'ensemble des structures cérébrales lors d'un stimulus douloureux. Là encore j'y reviendrai plus longuement dans le chapitre sur thalamus et douleur neuropathique.

Le thalamus est une structure bilatérale située au-dessus du troisième ventricule. Claude Galien lui donna le nom de *thalamus nervorum opticorum* en raison des projections visuelles flagrantes

en direction de cette structure. Du grec *θάλαμος (chambre),* il s'agit d'une structure d'origine embryonnaire proencéphalique. Le proencéphale se subdivise en télencéphale, futur cortex cérébral et ganglions de la base, et en diencéphale. Le diencéphale peut être subdivisé en quatre structures : l'épithalamus, le thalamus dorsal, le thalamus ventral et l'hypothalamus. Au cours de l'embryogénèse le développement du thalamus est concomitant à celui des structures télencéphaliques. A la fin du développement embryonnaire, le thalamus possède un rôle central au sein du système nerveux, à travers les contacts synaptiques que ses différents noyaux réalisent avec la plupart des régions cérébrales.

Le thalamus est un relais supra-spinal majeur, au cœur des échanges d'informations entre les voies ascendantes nociceptives et les divers cortex mais aussi au cœur des contrôles descendants de la nociception. Quelle est donc son anatomie ? Quels sont les noyaux thalamiques impliqués dans l'intégration de la nociception ?

Le thalamus est constitué d'un ensemble de noyaux (Fig. 11, A). Ces derniers peuvent être divisés en groupes et sous-groupes. Parmi cet ensemble de noyaux, je présenterai les noyaux thalamiques impliqués dans l'intégration de la nociception et ceux qui peuvent les moduler La liste des afférences et efférences de chaque noyau n'est bien sûr pas exhaustive et je ne présenterai que celles qui me sont apparues les plus significatives. Enfin, j'ai essayé de présenter une synthèse des données obtenues principalement chez les rongeurs (rat) mais aussi chez les primates (homme et singes) et les félins (chat). Cette synthèse peut s'avérer difficile car il existe des terminologies différentes pour un même noyau et des inconsistances entre différentes espèces.

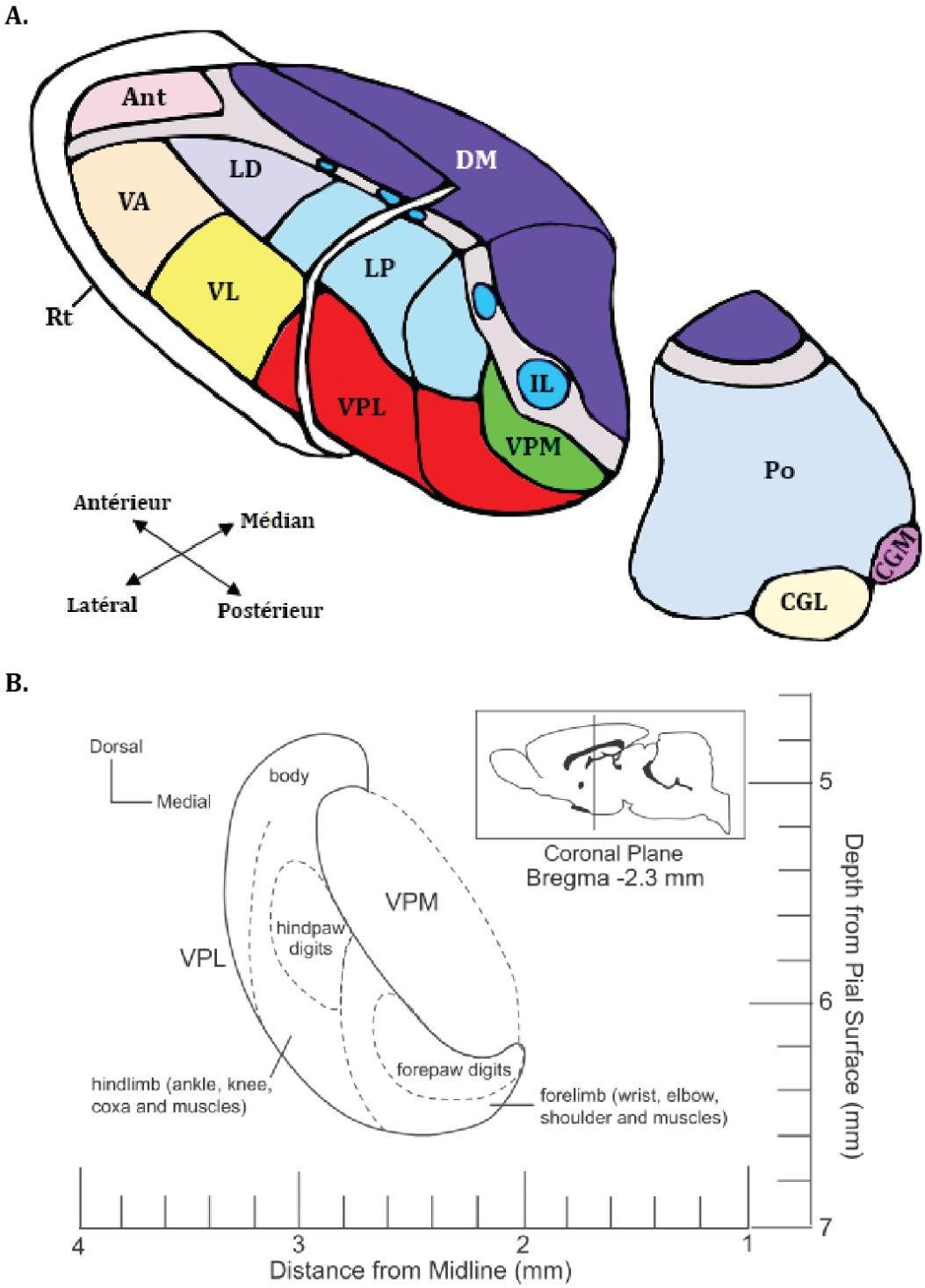


Figure 11 : Représentation schématique des différents noyaux thalamiques chez le rat. En A, tous les noyaux thalamiques avec les abréviations suivantes : Ant pour le noyau antérieur, VA pour le noyau ventral antérieur, LD pour le noyau latéral dorsal, VL pour le noyau ventral latéral, LP pour le noyau latéral postérieur, VPL pour le noyau ventropostérolatéral, VPM pour le noyau ventropostéromédian, IL (tous les noyaux bleu turquoise) pour les noyaux intralaminaires, DM pour le noyau dorso-médian, Po pour le noyau postérieur, Rt pour le noyau réticulaire, CGL et CGM pour les corps géniculés ou genouillés latéral et médian respectivement. En B, somatotopie du noyau VPL avec la délimitation des sous régions recevant les afférences des pattes postérieurs (hindlimb + hindpaw digits), des pattes antérieures (forelimb + forepaw digits) et du reste du corps (body) adaptée de Francis et al, 2008.

B.1- Le groupe latéral

Le groupe latéral est divisé en sous-groupe dorsal et ventral et seul le sous-groupe ventral est impliqué dans la nociception.

Le sous-groupe ventral postérieur est constitué des noyaux VPL et VPM. Ces noyaux présentent une organisation somatotopique. En effet, le noyau VPM reçoit uniquement les informations de la tête et du crâne alors que le VPL reçoit les informations en provenance de l'ensemble du reste du corps avec des projections organisées pour les membres et le tronc (Fig. 11,B). Cette somatotopie est retrouvée aussi bien chez les rats (Francis et al., 2008; Guilbaud et al., 1980), que chez les primates (Kenshalo et al., 1980) ou les humains (Yamada et al., 2007). Ainsi, la projection des fibres est ségrégée en fonction de leur provenance.

Les noyaux VPL et VPM reçoivent les informations somesthésiques majoritairement via le faisceau spino-thalamique (Weng et al., 2000) et la voie des colonnes dorsales (Villanueva et al., 1998) pour le VPL et du faisceau trigémino-thalamique (Iwata et al., 1992) et du noyau du faisceau solitaire pour le VPM. Des neurones répondant à des stimulations nociceptives sont présents dans ces noyaux. Ainsi, on a pu enregistrer de très nombreux neurones WDR répondant à des stimulations nociceptives et non nociceptives d'origine cutanée avec des champs récepteurs de petite taille et majoritairement controlatéraux (Apkarian et Shi, 1994; Bushnell et al., 1993; Guilbaud et al., 1980; Kenshalo et al., 1980). Il existe également des neurones répondant à des stimulations viscérales douloureuses sans somatotopie évidente dans le VPL (Brüggemann et al., 1994; Houghton et al., 2001).

Les efférences du VPL et du VPM projettent principalement sur le cortex somatosensoriel primaire (CSS1). Le VPM projette aussi sur le cortex somatosensoriel secondaire (CSS2), le cortex pré-frontal (CPF ; pour revue : Almeida et al., 2004) et le cortex gustatif (Nakashima et al., 2000; Pritchard et al., 1986). VPL et VPM sont impliqués dans l'intégration des informations

somesthésiques et, pour ce qui m'intéresse, de la composante sensori-discriminative de la nociception (localisation, intensité et discrimination du stimulus douloureux).

Chez les grands singes et les humains notons la présence du noyau ventropostéroinférieur (VPI). Ce noyau possède des neurones répondant à l'application d'un stimulus douloureux (Apkarian et Shi, 1994). Il reçoit des afférences des faisceaux cervico-thalamique et spino-thalamique et projette des efférences vers le CCS2 (Craig, 2006; Stevens et al., 1993). Ceci lui confère un rôle sensori-discriminatif de la douleur mais également un rôle dans le traitement de la composante affective et cognitive de la nociception. A ma connaissance, il n'existe pas de consensus sur la structure thalamique qui pourrait correspondre chez le rat au VPI des primates.

B.1- Le groupe médian

Le groupe médian est constitué d'un seul grand noyau : le noyau dorso-médian (DM). Ce noyau est divisé en trois sous-noyaux (et cela même chez les petits rongeurs) : le noyau magnocellulaire médian, le noyau parvocellulaire central et postérieur et le noyau multiforme latéral. Le noyau DM reçoit des afférences du faisceau spinothalamique, de l'amygdale, des structures olfactives ainsi que de la substance grise périaqueducale (Bay et Cavdar, 2013; Krout et Loewy, 2000; Leonard, 1972). Ce noyau DM présente une concentration discrète de neurones nociceptifs à larges champs récepteurs, souvent bilatéraux (Dong et al., 1978). Les projections issues du noyau DM thalamique sont dirigées vers les cortex cingulaire antérieur et frontal (Krettek et Price, 1977; Wells, 1966). Le noyau DM est impliqué dans l'intégration de la composante affective de la nociception.

B.2- Le groupe postérieur

Le groupe postérieur possède plusieurs sous-noyaux : le noyau latéral postérieur, le noyau postérieur (Po) et les corps géniculés latéral et médian (CGL et CGM respectivement qui relaient les informations visuelles et auditives). Il existe également chez les primates et les humains (Blomqvist et al., 2000) le noyau VMpo correspondant à la partie postérieure du noyau

ventromédian. Les espèces ne possédant pas de VMpo présentent un équivalent à travers l'association entre le Po et le noyau thalamique submédian. Seuls les Po et submédians (VMpo chez les primates) participent à l'intégration des informations nociceptives. On notera que le noyau submédian ou submedius est un noyau médian mais nous le traitons ici car il va de pair avec le Po.

Le noyau VMpo, reçoit des fibres du faisceau spinothalamique et contient des neurones répondant à des stimulations douloureuses (Craig et Zhang, 2006). Les efférences de ce noyau VMpo projettent notamment vers l'insula (Craig, 2014). Le VMpo est impliqué dans l'intégration de la composante émotionnelle et sensori-discriminative de la nociception (pour revue, Craig, 2003).

Le noyau Po reçoit des afférences des faisceaux spino-cervico-thalamique et spinothalamique (Al-Khater et al., 2008). Le noyau Po établit des connections avec le striatum ainsi que les cortex CSS1, CSS2 et insulaire (Haque et al., 2010; Shi et Cassell, 1998; Smith et al., 2012; Spreafico et al., 1987). Il possède des neurones répondant à des stimulus douloureux (Apkarian et Shi, 1994; Guilbaud et al., 1980) et est impliqué dans l'intégration de la composante émotionnelle de la nociception.

Le noyau submedius a été mis en évidence chez le rat. Il reçoit des projections en provenance des couches superficielles et profondes de la moelle épinière, du noyau trigéminal et de la substance grise périaqueducale (Coffield et al., 1992; Iwata et al., 1992; Yoshida et al., 1992). Les efférences sont dirigées vers les cortex pré-frontal et orbito-frontal (CPF et COF ; Coffield et al., 1992; Yoshida et al., 1992). Des études réalisées sur les rongeurs (Roberts and Dong, 1994; Zhang et al., 1996) ont montré le rôle du noyau submedius dans l'inhibition de la douleur. En effet, le cortex orbito-ventro-latéral, sur lequel projette le noyau submedius, projette à son tour sur la substance grise périaqueducale qui exerce une action inhibitrice sur les circuits de la

douleur au niveau spinal (Zhang et al., 1998). Ce noyau est donc notamment impliqué dans l'anti-nociception et l'intégration de la composante affective et motivationnelle de la nociception.

B.3- Le groupe des noyaux intralaminaires

Le groupe des noyaux intralaminaires (IL) est réparti dans la lame médullaire interne, entourant le thalamus. Il est constitué de quatre sous-noyaux (Fig. 12) : les noyaux centro-médian (CM), paracentral (PC), central latéral (CL) et parafasciculaire (Pf).

Ces noyaux reçoivent des afférences issues des faisceaux spinothalamique et trigéminothalamique mais également du striatum, de structures du tronc cérébral et de la substance grise périaqueducale (Dado et al., 1994; Gauriau and Bernard, 2004; Krout and Loewy, 2000; Krout et al., 2002; Nakamura et al., 2006). Dans ces noyaux IL, les neurones répondent à des stimulations nociceptives viscérales et non viscérales (Nishikawa et al., 1999; Ren et al., 2009). Ces noyaux projettent des efférences notamment vers les cortex préfrontal, cingulaire antérieur, insulaire, moteur et somatosensoriel mais également vers l'amygdale et le striatum (Hoover and Vertes, 2007; Nakamura et al., 2006; Vertes et al., 2012). Ces noyaux sont impliqués dans l'intégration de la composante émotionnelle de la nociception et possèdent également un rôle dans le comportement de fuite vis-à-vis du stimulus douloureux.

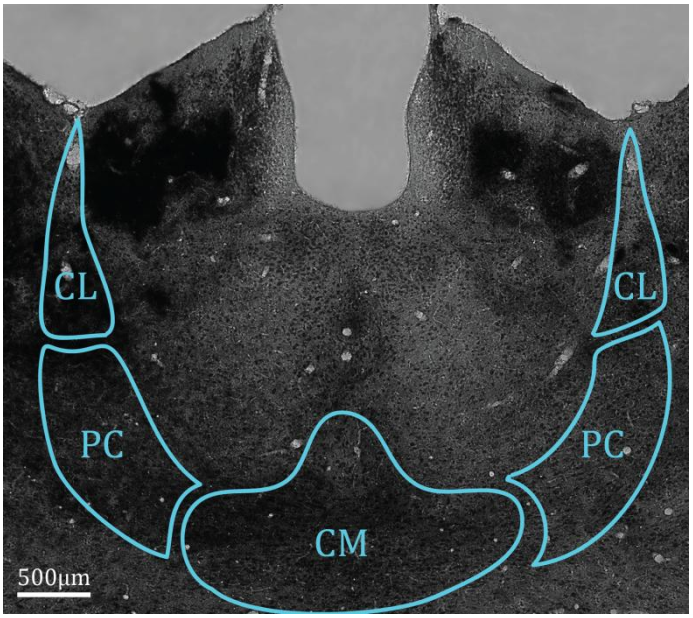


Figure 12 : Illustration de l'anatomie de trois des quatre noyaux intralaminaires sur une coupe de cerveau de rat traitée pour la visualisation de l'acétylcholine estérase. Les noyaux centro-médian (CM), paracentral (PC) et central latéral (CL) sont représentés par des contours bleu turquoise. Le noyau parafasiculaire (Pf) est plus postérieur et n'apparait pas sur cette illustration (image Lucie Blaszczyk).

B.4- Le noyau réticulaire

Ce noyau possède un rôle très important au sein du thalamus puisqu'il a pour rôle la régulation de l'activité thalamique. Il possède de nombreux neurones GABAergiques (Nagai et al., 1983). Il est connecté avec plusieurs aires corticales, mais également avec les autres noyaux thalamiques (Guillery et al., 1998; Minderhoud, 1971). Il n'est donc pas directement impliqué dans l'intégration de la nociception, mais, par son rôle de modulateur de l'activité thalamique, il pourrait jouer un rôle majeur dans certaines pathologies. Ainsi une moindre activité du noyau réticulaire aboutit à lever le frein qu'il exerce sur les noyaux thalamiques qui deviennent alors hyperactifs. Cela pourrait être un des éléments à l'œuvre dans les dysfonctionnements observés dans un contexte de douleur chronique. J'y reviendrai plus longuement dans le chapitre thalamus et douleur neuropathique.

On notera qu'il existe des boucles thalamo-cortico-thalamiques pour tous les noyaux relais du thalamus soit directes (par exemple VPL-CSS1-VPL) soit transitant par le noyau réticulaire (et donc inhibitrices). En résumé, chez le rat, il existe des noyaux thalamiques majoritairement impliqués dans l'intégration de la composante soit sensori-discriminative (VPL/VPM) soit cognitivo-affective (DM, IL, Po et submedius) de la douleur.

C- L'intégration corticale : l'éveil de la conscience

L'intégration de l'information nociceptive au niveau cortical est le moment où l'individu va prendre conscience de la douleur. Il va pouvoir l'exprimer, la localiser, la décrire notamment en terme d'intensité. Il pourra comparer cette expérience douloureuse avec celles qu'il a déjà expérimentées et ainsi laisser place à des émotions et à la part subjective de la douleur, qui est propre à chaque individu.

Il existe plusieurs aires corticales impliquées dans l'intégration de la nociception. Ces aires ont été déterminées par la présence de neurones NS et/ou WDR mais aussi par leur activation en imagerie cérébrale suite à des stimulations nociceptives. Les principales aires sont les cortex somesthésiques, le cortex insulaire, le cortex cingulaire antérieur (CCA), le cortex préfrontal (CPF) et le cortex orbito-frontal (COF).

L'intégration des informations nociceptives est réalisée dans les cortex somatosensoriels au sein des cortex CSS1, CSS2 et cortex pariétal postérieur (CPP). Le CSS1 possède un rôle majeur dans l'intégration de la composante sensori-discriminative de la nociception. En effet, les champs récepteurs de ses neurones répondant à des stimulations nociceptives sont controlatéraux et de petite taille. Le CSS1 code bien sûr l'intensité du stimulus douloureux (Kenshalo et al., 1988). Le CPP et le CSS2 sont des cortex somatosensoriels dits associatifs. Le CSS2 intègre la composante spatio-temporelle, l'attention au stimulus nociceptif et en second plan l'intensité du stimulus (Coghill et al., 1999; Peyron et al., 1999; Talbot et al., 1991; Timmermann et al., 2001). Le CPP contribue à l'orientation vis-à-vis de la stimulation sensorielle (Andersen et al., 1987; Deiber et al., 1991; Grafton et al., 1992; Peyron et al., 1999). Le CSS1 est connecté avec les autres aires corticales comme le CSS2, le cortex insulaire, le CCA et le cortex moteur. Il émet également des projections descendantes notamment vers le thalamus. Les projections du CSS2 sont dirigées vers le CSS1, l'amygdale, le cortex insulaire, l'hippocampe et le CCA (Eickhoff et al., 2006). Le CPP reçoit des afférences provenant des trois systèmes sensoriels : auditif, visuel et somesthésique

mais aussi du cortex insulaire. Ce cortex projette des connections vers les CSS1, CSS2, CPF et les cortex moteurs primaire et secondaire.

Le cortex insulaire, ou insula, reçoit des projections provenant de différentes structures notamment du thalamus, du CSS2, de l'amygdale, du COF et CCA et émet des informations vers l'amygdale, le CPP et le CPF. L'insula est impliquée dans l'intégration de la composante émotionnelle et affective de la nociception (Apkarian et al., 1999; Sawamoto et al., 2000). Chez les humains, l'insula possède un rôle dans l'intégration de l'intensité de la douleur et sa représentation (Baliki et al., 2009; Ogino et al., 2007).

Le CCA est impliqué dans l'intégration de la composante affective de la nociception mais également dans la sélection de la réponse à une stimulation nociceptive (Davis et al., 1997; Vogt et al., 1996). Les neurones du CCA possèdent de larges champs récepteurs bilatéraux pouvant englober toute la surface du corps (Yamamura et al., 1996). Le CCA est notamment en relation avec les CPF et CPP, le système moteur, l'hypothalamus, l'amygdale et l'insula.

Le lobe frontal est constitué de trois grands ensembles : le cortex moteur, celui pré-moteur et le CPF. Le CPF peut être divisé en trois sous-régions : le CPF dorsolatéral, ventrolatéral et orbitofrontal. Généralement, quand on parle de cortex préfrontal, on entend CPF dorsolatéral et ventrolatéral et le COF est placé à part. Globalement, ces structures ont un rôle de superviseurs et de régulateurs. Ils participent particulièrement aux mécanismes de l'attention et de l'émotion liés au stimulus nociceptif (Godinho et al., 2008; Hsieh et al., 1994; Kong et al., 2006; Simpson et al., 2001). Le CPF reçoit des afférences du tronc cérébral et du noyau DM du thalamus. La partie dorsolatérale du CPF reçoit et émet des informations vers les régions impliquées dans l'attention et la cognition, alors que la partie ventrolatérale du CPF échange des informations avec les régions impliquées dans le traitement des émotions. Le COF reçoit des afférences du noyau DM du thalamus, de l'insula et de l'amygdale. Il projette des fibres vers les CSS1 et CSS2, le CPF, le cortex moteur et le système limbique (insula, amygdale).

En résumé, toutes les aires corticales impliquées dans l'intégration des informations nociceptives sont reliées entre elles, soit directement (réseaux intracorticaux) soit indirectement via le thalamus et diverses structures limbiques (amygdale, hippocampe, hypothalamus par exemple). Enfin, comme il existe une spécification des noyaux thalamiques, il existe des aires corticales majoritairement impliquées dans l'intégration de la composante soit sensori-discriminative (CSS1) soit cognitivo-affective (CSS2, CPP, cortex insulaire, CCA, CPF et COF) de la douleur.

D- Le concept de la matrice centrale de douleur

Pour des raisons de clarté, j'ai abordé dans les parties précédentes les voies d'intégration de la nociception de manière individualisée, mais ces structures travaillent ensemble et forment un réseau, une matrice. En effet, il n'existe pas un unique centre de la douleur. La douleur est multidimensionnelle et produite par des activités neuronales distribuées, habituellement générées par des entrées sensorielles mais pouvant être générées indépendamment. Initié par la notion de neuromatrice développée par Ronald Melzack pour expliquer le phénomène de membre fantôme (Melzack, 1990), le concept de matrice centrale de douleur propose que la douleur soit le reflet de l'activité d'un ensemble de structures. En fait, la matrice de douleur est un système fluide, avec plusieurs réseaux en interaction. Elle est constituée de trois niveaux : la matrice nociceptive, la matrice de perception et la matrice de réévaluation. La matrice nociceptive reçoit principalement des projections du faisceau spinothalamique. Elle est activée lors d'expériences physiologiques de douleur. Les structures impliquées dans cette matrice sont notamment le thalamus postérieur, l'insula postérieure, le CSS1 et la partie médiane du cortex cingulaire. Les caractéristiques des structures impliquées sont notamment l'induction de la douleur par leur stimulation (Mazzola et al., 2006) et une analgésie induite par une lésion localisée de ces structures (Greenspan et al., 1999). La lésion des structures corticales peut également conduire au développement de douleurs neuropathiques (pour revue voir Garcia-Larrea, 2012). Le fonctionnement de cette matrice est inconscient et persiste lors du sommeil

(Bastuji et al., 2012), du coma et de l'état végétatif (Boly et al., 2008; Kassubek et al., 2003). La matrice de perception quant à elle est notamment constituée de l'insula antérieure, du CCA, de la partie dorsolatérale du CPF et du CPP. Les points communs de ces structures sont qu'aucune de ces structures ne reçoit d'afférences directes du faisceau spinothalamique et que leurs stimulations n'entraînent pas de sensation douloureuse ni leurs lésions d'analgésie. Ces structures sont également impliquées dans d'autres contextes non douloureux et leur implication dans la matrice dépend du contexte dans lequel le stimulus survient (Büchel et al., 2002; Peyron et al., 1999; Seminowicz et al., 2004). Cette matrice rend l'information nociceptive consciente. En effet, une information sensorielle ne peut devenir consciente que si elle est distribuée à un ensemble de structures cérébrales (Dehaene et al., 2001, 2006). Cette matrice peut aussi moduler les réactions végétatives et les sensations internes ainsi que l'activité dans la matrice nociceptive (l'anticipation d'un stimulus douloureux ou au contraire la distraction peuvent respectivement augmenter ou diminuer l'activité dans la matrice nociceptive ; (Bantick, 2002). La dernière matrice, la matrice de réévaluation, contient des structures comme la partie antérolatérale du CPF et le COF. Ces structures sont impliquées dans l'identification de la signification émotionnelle des stimuli, dans la production des états affectifs et dans le contrôle volontaire des émotions désagréables (pour revue voir Etkin et al., 2011). Cette matrice est impliquée dans l'empathie douloureuse, les analgésies méditatives et la modification de la perception douloureuse par les croyances (Godinho et al., 2006, 2012; Wiech et al., 2008). Par ses relations avec les structures sous-corticales, notamment la substance grise périaqueducale qui exerce des contrôles inhibiteurs descendants sur les systèmes nociceptifs spinaux, cette matrice peut entraîner des changements dans l'activité des systèmes ascendants (Leknes et al., 2013).

J'ai décrit ici le parcours de l'information nociceptive, depuis la détection du stimulus douloureux jusqu'à sa perception consciente. Au cours de ma thèse j'ai étudié plus particulièrement une pathologie, celle de la douleur neuropathique. La douleur neuropathique

appartient à un grand ensemble de pathologies regroupées sous le terme de douleur chronique. Je vous propose maintenant d'étudier plus en détails la douleur chronique, sa définition, sa prévalence et ses différentes composantes.

IV- Quand la douleur devient pathologique : la douleur chronique

La douleur est nécessaire à la survie de l'individu et au maintien de son intégrité physique. C'est un signal d'alerte et un mécanisme adaptatif. On parle donc de douleur adaptative ou physiologique. Cependant, il existe une douleur non-adaptative, non protectrice qui résulte d'un dysfonctionnement du système nerveux. On parle alors de douleur pathologique. Au-delà de cette distinction sur la douleur comme vrai ou faux signal d'alarme, on peut aussi caractériser les douleurs en fonction de leur durée. Lorsque la douleur persiste au-delà de 3 mois et devient récurrente, on parle de douleur chronique. On admet que les douleurs pathologiques sont persistantes.

A- La douleur chronique : une pathologie invalidante

En France, plus de 21 millions de personnes souffrent de douleurs chroniques (31,7% de la population française). Dans 19,9% des cas, soit plus de 13 millions de personnes, ces douleurs sont modérées à sévères (Bouhassira et al., 2008). Une étude européenne montre que 19% des adultes de la population européenne souffrent de douleurs chroniques modérées à sévères (Breivik et al., 2006). Il n'existe actuellement aucun traitement permettant de soulager totalement et définitivement les personnes qui en souffrent. De fait, ces personnes vont devoir vivre quotidiennement avec leurs douleurs et ceci a de très nombreuses répercussions. La qualité de vie de ces personnes est nettement dégradée et très souvent cette pathologie conduit à la perte de l'emploi et à l'isolement social. Le nombre de personnes pensant activement au suicide au sein des personnes souffrant de douleurs chroniques est de 13% (Smith et al., 2004) contre 3,9% dans la population française (INPES).

La survenue des douleurs chroniques est très souvent associée au développement d'autres pathologies et symptômes. Ainsi, les patients douloureux chroniques présentent des déficits cognitifs, notamment une altération de la prise de décision émotionnelle et des déficits mnésiques (Apkarian et al., 2004a; Luerding et al., 2008; McCracken and Iverson, 2001). De plus, d'autres pathologies comme l'anxiété, les troubles du sommeil et la dépression sont bien souvent associées aux douleurs chroniques (McWilliams et al., 2004). Ces déficits peuvent contribuer à la perte de l'emploi et l'isolement de la personne. Il existe donc, au-delà des douleurs en elles-mêmes, un ensemble de facteurs aggravants pouvant entraîner l'isolement social de la personne atteinte.

La survenue des douleurs chroniques et des pathologies associées est corrélée à des modifications et des remaniements au niveau de diverses structures cérébrales. Ainsi, le volume de la substance grise cérébrale peut diminuer dans des régions associées à la modulation de l'attention ou de la cognition (Seminowicz et al., 2010) ou encore dans des régions associées à l'intégration de la nociception (Gustin et al., 2011). L'activité de certaines structures varie également comme nous le verrons dans les parties suivantes.

Ainsi, la douleur chronique est extrêmement invalidante, préjudiciable pour les individus qui en souffrent et il n'existe pas de traitement permettant de soulager définitivement les patients. De plus, la douleur chronique a un coût socio-économique élevé à cause de l'impact de cette pathologie sur la qualité de vie et le recours aux soins des patients. Les personnes souffrant de douleurs chroniques doivent souvent limiter leur activité professionnelle et/ou domestique. De fait le nombre d'arrêts de travail, de consultations et la durée de celles-ci sont importants (HAS, Ministère de la Santé). Pour lutter contre cette pathologie handicapante et coûteuse, le ministère de la santé a fait de la lutte contre la douleur une priorité de santé publique depuis 2004.

Qu'est-ce que la douleur chronique ? Quels en sont les composantes ? Quels en sont les symptômes ? Nous allons voir que derrière la douleur chronique, pathologie au singulier, se cache en fait une pluralité de douleurs chroniques, différentes les unes des autres.

B- La douleur chronique, un singulier pluriel

Nous l'avons vu, on caractérise par « douleur chronique » une douleur qui persiste au-delà de 3 mois et devient récurrente. Mais sous cette étiquette unique sont regroupées diverses pathologies avec des caractéristiques différentes. Ainsi, la douleur chronique regroupe des douleurs par excès de nociception, des douleurs psychogènes et des douleurs neuropathiques. Les douleurs par excès de nociception résultent de lésions somatiques ou viscérales (après un traumatisme, une chirurgie ou un cancer). Par exemple, les douleurs cancéreuses peuvent être liées soit au développement tumoral en lui-même soit aux thérapies utilisées pour traiter le cancer. 92,5% des patients cancéreux présentent des douleurs directement liées au cancer et 20,8% des douleurs liées aux thérapies (Caraceni et Portenoy, 1999). Les douleurs cancéreuses peuvent de plus présenter des composantes neuropathiques… La classification des différentes douleurs chroniques est donc ardue. Les douleurs psychogènes sont toutes les douleurs que l'on n'arrive pas à classer parmi les douleurs par excès de nociception ou les douleurs neuropathiques. On peut citer la fibromyalgie et l'algie vasculaire de la face. Enfin, originellement, la définition des douleurs neuropathiques proposait que les douleurs soient initiées ou causées par une lésion primaire ou un dysfonctionnement du système nerveux (Merskey et Bogduk, 1994). Actuellement, la définition est plus précise et propose que la douleur provienne d'une conséquence directe d'une lésion ou d'une maladie affectant le système somatosensoriel (Treede et al., 2008). Il existe ainsi des douleurs neuropathiques d'origine centrale ou périphérique. Les douleurs neuropathiques périphériques causées par des maladies ou des lésions de nerfs, sont par exemple les radiculopathies, comme la sciatique, les neuropathies diabétiques, post-herpétiques ou encore les douleurs chroniques post-chirurgicales. Les douleurs neuropathiques d'origine centrale quant à elles peuvent être la

conséquence d'accidents vasculaires cérébraux, de lésion de la moelle épinière, d'une sclérose en plaques, ou d'autres conditions neurologiques et métaboliques. Enfin on notera que certaines douleurs adaptatives peuvent se prolonger et devenir chroniques comme par exemple l'arthrite rhumatoïde (douleur inflammatoire) qui perdure tant que l'inflammation est présente.

Les douleurs neuropathiques concernent 6,9% de la population française (Bouhassira et al., 2008) et 7 à 8% des adultes du monde entier, soit près de 400 millions d'individus de par le monde (IASP). Selon l'IASP, un clinicien peut confirmer la douleur neuropathique soit en trouvant la lésion nerveuse à l'origine des douleurs soit en présence dans le territoire innervé d'une augmentation de la sensibilité nociceptive ou d'une altération des sensations somesthésiques ou s'il y a douleur en réponse à un toucher léger. C'est à ce type de douleur chronique que je me suis intéressée au cours de ma thèse. Les symptômes douloureux majeurs d'une neuropathie sont des douleurs spontanées paroxystiques comme des décharges électriques ou des coups de poignard et/ou des douleurs persistantes comme des sensations de froid ou de brûlure. La présence de paresthésies (sensation de fourmillements), des douleurs lancinantes, des élancements, des engourdissements sont également des symptômes fréquents. De plus, les patients peuvent présenter des altérations de leur sensibilité. Ainsi, un stimulus initialement non douloureux peut devenir douloureux, c'est le symptôme d'allodynie. De plus, un stimulus initialement douloureux peut devenir encore plus douloureux, ce symptôme est appelé hyperalgésie (Backonja et Stacey, 2004). En plus de ces symptômes de douleurs, nous l'avons vu, il existe des pathologies associées comme la dépression et l'anxiété.

Au sein de la pathologie de douleur chronique, il existe donc une pluralité de pathologies, qui peuvent être regroupées en fonction de leurs origines et de leurs caractéristiques Pour pouvoir étudier ces douleurs, et en disséquer les mécanismes cellulaires, moléculaires et fonctionnels, il est nécessaire d'utiliser des modèles animaux. Je vous propose donc d'aborder dans un premier temps les différents modèles animaux de douleurs neuropathiques. Nous aborderons ensuite les

principaux mécanismes impliqués dans le développement et le maintien de ces douleurs neuropathiques et les traitements proposés actuellement.

V- Quels modèles animaux pour l'étude de la douleur neuropathique?

Nous l'avons vu, de très nombreux patients souffrant de douleurs neuropathiques sont encore insuffisamment soulagés. Il est donc nécessaire de continuer à développer la recherche fondamentale et les études précliniques pour cibler de nouvelles molécules thérapeutiques qui seront par la suite testées en clinique. Les études visant à décrypter les mécanismes moléculaires, cellulaires et physiologiques à l'origine des douleurs neuropathiques sont difficilement réalisables chez l'homme. Depuis les années 80, différents modèles animaux de douleurs neuropathiques ont été développés pour aborder ces problématiques d'un point de vue fondamental et tester de manière pré-clinique des molécules potentiellement intéressantes pour soulager ces douleurs. Les questions éthiques sont fondamentales dans le domaine de l'expérimentation animale. Pour permettre d'adopter de bonnes pratiques de laboratoire et pour encadrer les recherches sur la douleur, il existe plusieurs règles de bonne conduite établies par l'IASP dans les années 1980. Tout d'abord, il faut que les méthodes utilisées dans les expériences provoquent chez les animaux un comportement douloureux analogue à celui observé chez l'homme. Ensuite, les expérimentateurs doivent s'efforcer le plus possible d'atténuer la douleur durant les expériences. Les expérimentateurs doivent également mener une réflexion éthique sur la justification de la pratique et de la poursuite de leurs expériences. Les expérimentateurs doivent bâtir leur plan d'expérience pour que l'animal se trouve, au cours de l'expérimentation, dans une situation physiologique stable. Ensuite, dans les modèles de stimulations nociceptives aigües, l'expérimentateur doit au préalable tester sur lui-même l'intensité du stimulus et permettre à l'animal de pouvoir échapper à la stimulation lors de l'expérience. La durée des expériences doit être aussi courte que possible et le nombre d'animaux utilisés aussi faible que possible. Enfin, une loi européenne a récemment rendu obligatoire, avant toute expérimentation, de soumettre un dossier de saisine auprès du comité d'éthique, afin d'obtenir une autorisation

d'expérimenter sur le projet élaboré. L'étude de mon travail de thèse a été acceptée par le comité d'éthique de Bordeaux sous le numéro de saisine 5012039-A.

Je vous présenterai tour à tour les différents modèles animaux de douleur neuropathiques, puis j'aborderai les différents travaux, notamment ceux effectués par l'équipe de Jeffrey S. Mogil, qui permettent de souligner la complexité de l'interprétation des résultats obtenus en expérimentation animale dans un contexte douloureux. Dans un dernier temps, je présenterai les différentes critiques qui peuvent être faites aux études utilisant ces modèles animaux de douleur neuropathique.

A- Modèles animaux de douleur neuropathique : comment induire la douleur ?

En relation avec mon travail de thèse, je présenterai ici uniquement les différents modèles animaux de lésions de nerfs périphériques.

A.1- Modèle de transsection du nerf sciatique

Présenté en 1979 par Wall et ses collègues (Wall et al., 1979), ce modèle animal a pour but de mimer les symptômes du membre fantôme, liés à des amputations ou des lésions transversales de la moelle épinière. Le modèle de transsection (ou axotomie) consiste à sectionner le nerf sciatique (Fig. 13) et empêcher la ré-innervation soit en insérant la partie proximale du nerf dans un tube de polyéthylène ou encore en enlevant entre 5 et 8 mm de nerf et en insérant la partie proximale du nerf entre les faisceaux musculaires. Cette axotomie conduit à l'interruption immédiate et irréversible des transmissions afférentes et efférentes. La partie distale du nerf sciatique subit une dégénérescence Wallérienne. Les animaux opérés de la sorte réalisent le plus souvent une autotomie de leur membre lésé. Ce modèle ne permet donc pas de conserver la motricité du membre lésé et ainsi de pouvoir quantifier le comportement douloureux. Ce modèle n'est donc presque plus utilisé aujourd'hui.

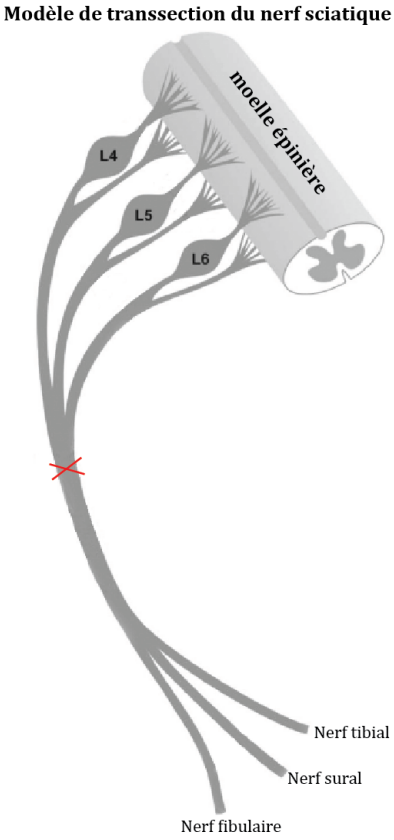


Figure 13 : Représentation schématique du modèle de transsection du nerf sciatique élaboré par Walls en 1979. Figure adaptée de Klusáková et Dubový, 2009.

A.2- Modèle de constriction chronique du nerf sciatique

Développé par Bennett et Xie en 1988, ce modèle de *chronic constriction injury* (CCI) ou constriction chronique du nerf sciatique simule les symptômes de la compression nerveuse chronique, comme le syndrome du canal carpien. Il consiste en quatre ligatures lâches réalisées autour du nerf sciatique à mi-cuisse de l'animal (Fig. 14). Ces ligatures entraînent une réaction inflammatoire locale et l'apparition d'un œdème qui augmente la compression des axones. Les ligatures conduisent à une lésion des fibres afférentes et efférentes. Pour les fibres afférentes, on note une perte importante des fibres hautement myélinisées Aα et Aβ et une perte moindre en fibres Aδ et C (Gautron et al., 1990; Guilbaud et al., 1992; Munger et al., 1992). Dans ce modèle, il existe une dégénérescence Wallérienne de certaines fibres. Les fibres intactes baignent donc dans une soupe de molécules libérées lors de la dégénérescence. Ces molécules peuvent être prises en charge par les fibres afférentes intactes et transportées de manière rétrograde jusqu'aux ganglions rachidiens. Les animaux développent de fortes allodynie et hyperalgésie, à la

fois thermiques et mécaniques. Le désavantage de ce modèle tient dans la variabilité de la force de la ligature réalisée. Ce désavantage peut être minimisé en ayant recours à un manchon de polyéthylène qui va appliquer une compression nerveuse plus standardisée sur le nerf sciatique (modèle du « sciatic nerve cuffing » ; Mosconi and Kruger, 1996).

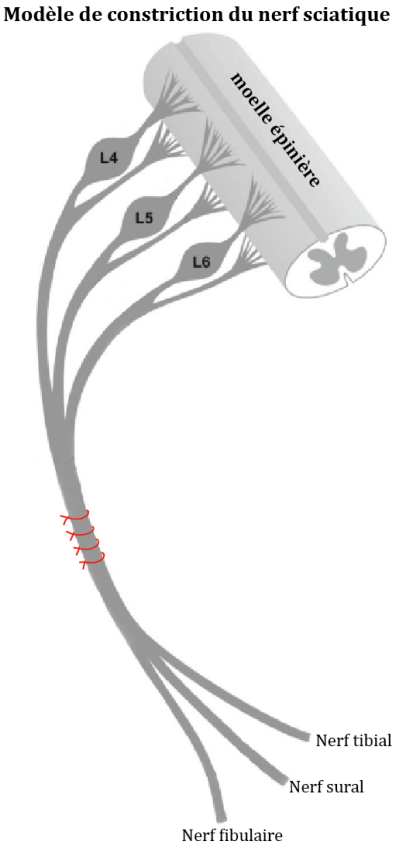


Figure 14 : Représentation schématique du modèle de constriction chronique du nerf sciatique élaboré par Bennett et Xie en 1988. Figure adaptée de Klusakova et Dubovy, 2009.

A.3- Modèle de ligature partielle du nerf sciatique

Développé par Seltzer et ses collègues en 1990 (Seltzer et al., 1990), ce modèle de *partial sciatic nerve ligation* (PSNL) ou modèle de ligature partielle du nerf sciatique simule la contusion nerveuse, la lésion partielle de nerf périphérique. Il consiste en la ligature serrée de près d'un tiers à la moitié des fibres nerveuses au niveau de la face dorsale du nerf sciatique (Fig. 15). La composante inflammatoire est plus faible dans ce modèle mais la dégénérescence Wallérienne distale est toujours présente. Les animaux développent un comportement prononcé d'allodynie et d'hyperalgésie, à la fois thermique et mécanique, ainsi que des douleurs spontanées. Le désavantage de ce modèle tient également dans la variabilité liée à l'expérimentateur. En effet, le nombre de fibres du nerf sciatique ligaturé peut varier entre 33% et 50%, ce qui peut induire une grande variabilité dans le comportement douloureux des animaux.

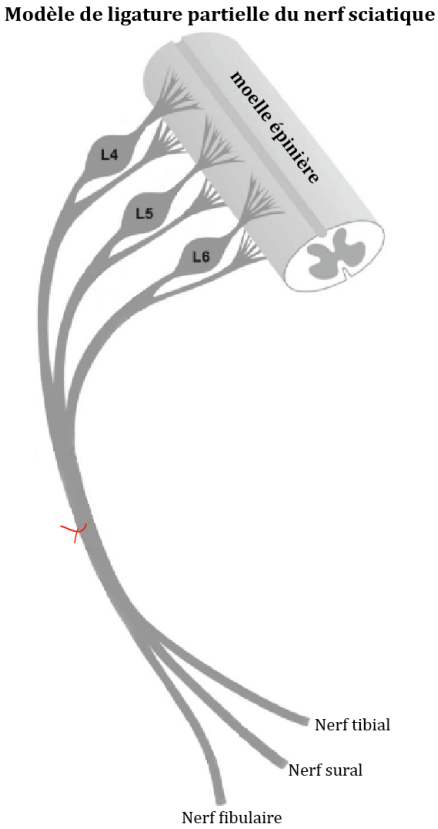


Figure 15 : Représentation schématique du modèle de ligature partielle du nerf sciatique élaboré par Seltzer et ses collègues en 1990. Figure adaptée de Klusakova et Dubovy, 2009.

A.4- Modèle du nerf sciatique épargné

Développé par Decosterd et Woolf en 2000, ce modèle de *spared nerve injury* (SNI) ou modèle du nerf sciatique épargné consiste à ligaturer puis sectionner deux des trois branches du nerf sciatique afin de mimer les symptômes de dénervation partielle d'un membre (Fig. 16). En effet, le tronc du nerf sciatique se divise en trois branches : le nerf tibial, le nerf fibulaire commun (ou nerf péronéal commun) et le nerf sural. Les branches tibiale et fibulaire commune du nerf sciatique sont ligaturées puis un fragment de 2 à 4 mm de long de chaque branche est sectionné afin d'empêcher la ré-innervation, la branche surale est laissée intacte. Ce modèle permet de développer une forte allodynie mécanique et thermique durable ainsi qu'une hyperalgésie thermique. Dans ce modèle, tous les ganglions rachidiens dorsaux (DRG) de L4 à L6 présentent des corps cellulaires de fibres lésées. Il existe plusieurs variantes de ce modèle de douleur neuropathique selon les branches nerveuses sectionnées. Il est nécessaire d'être vigilant afin de savoir comment le modèle a été réalisé précisément dans chaque publication.

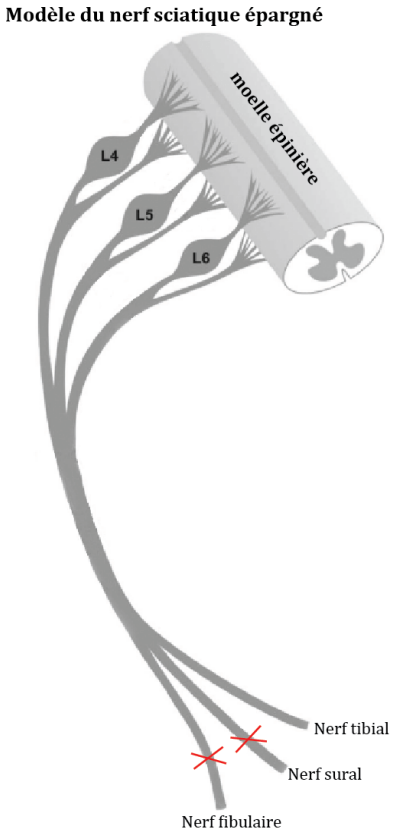


Figure 16 : Représentation schématique du modèle du nerf épargné élaboré par Decosterd et Woolf en 2000. Figure adaptée de Klusakova et Dubovy, 2009.

A.5- Modèle de ligature des nerfs spinaux L5/L6

Développé par Kim et Chung en 1992, ce modèle de *spinal nerve ligation* (SNL) ou ligature de nerfs spinaux se caractérise par la ligature des nerfs spinaux L5 et L6 à proximité de la moelle épinière, juste avant la naissance des racines dorsale et ventrale (Fig. 17). Il s'agit de ligatures serrées. Les DRG contiennent soit une totalité de corps cellulaires de fibres lésées, c'est le cas pour les DRG L5 et L6, soit une totalité de corps cellulaires de fibres non lésées, c'est le cas pour le DRG L4. Ce modèle possède un avantage majeur : son établissement est nettement moins dépendant de l'expérimentateur qui doit ligaturer fortement toutes les fibres des racines. On notera cependant que la chirurgie est délicate et entraîne des lésions tissulaires importantes. Ce modèle SNL permet de développer une allodynie mécanique plus robuste que les modèles de PSNL et CCI (Kim et al., 1997). Il développe par ailleurs des symptômes d'allodynie et d'hyperalgésie thermiques et mécaniques ainsi que des douleurs spontanées. De plus, dans ce modèle il n'existe normalement pas d'autotomie du membre lésé. Ce modèle SNL possède

également une variante, la ligature du seul nerf spinal L5, qui est utilisé sous le terme SNL également. Il faut donc veiller à regarder quelle chirurgie se cache sous l'appellation SNL.

On notera qu'il existe aussi des modèles de lésion des racines nerveuses spinales : notamment compression ou section des racines dorsales. Enfin, un dernier modèle, plus drastique, est également utilisé. Il ne touche non pas les nerfs périphériques mais consiste en la lésion unilatérale de la moelle épinière, le plus souvent sur le segment thoracique 9. Il s'agit du modèle de *spinal cord injury* (SCI), ou lésion de la moelle épinière développé par Gruner en 1992.

Compte tenu de sa grande reproductibilité et de ses importants symptômes douloureux, j'ai choisi d'utiliser le modèle SNL L5/L6 dans mon travail de thèse.

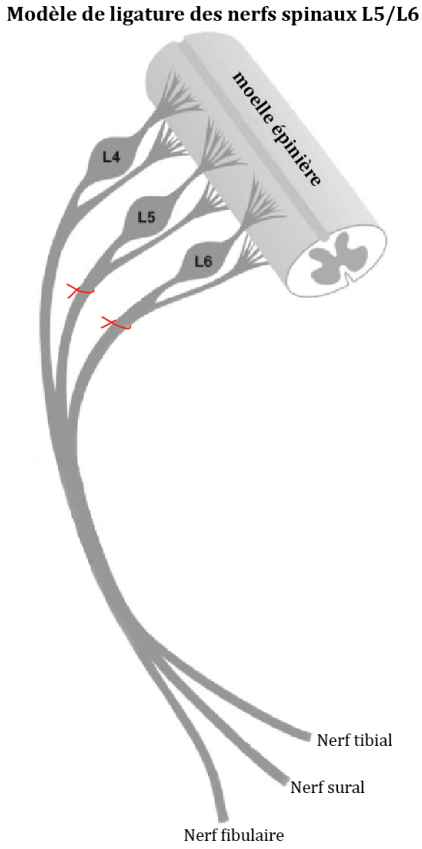


Figure 17 : Représentation schématique du modèle de ligature des nerfs spinaux L5/L6 élaboré par Kim et Chung en 1992. Figure adaptée de Klusakova et Dubovy, 2009.

B- Modèles animaux de douleur neuropathique : comment appréhender la douleur ?

Après avoir choisi le modèle animal de douleur neuropathique que l'on veut utiliser, il reste à savoir comment appréhender la douleur chez l'animal. La douleur, nous l'avons vu précédemment, s'exprime sous différentes formes et notamment par l'expression verbale chez l'homme. Ce registre est inaccessible chez l'animal. Par contre, l'expérimentateur peut observer certains comportements spontanés traduisant une douleur ou une souffrance : protection de la région douloureuse, agressivité (morsures, combats), vocalisations par ultrasons, mutilations (grattage voire autonomie de la région douloureuse), agitation locomotrice (comportements d'exploration et de redressement exacerbés) ou au contraire prostration, tremblements, positions anormales (répartition anormale du poids de l'animal). Au-delà des comportements spontanés observés lors du protocole de suivi post-chirurgical (voir matériels et méthodes), j'ai choisi de quantifier et suivre un comportement spontané : les positions anormales. J'ai ainsi étudié la répartition du poids de l'animal entre les différentes pattes à l'aide du test de distribution pondérale dynamique. Les paramètres physiologiques peuvent aussi être suivis chez les animaux pour objectiver la douleur : dilatation des pupilles, fréquence cardiaque et pression artérielle, fréquence respiratoire, température corporelle, pilo-érection, diurèse et défécations. Au-delà de ces comportements spontanés et de ces paramètres physiologiques, des tests comportementaux ont été élaborés. Il peut s'agir de tests qui mesurent des réponses comportementales évoquées. Dans ce cas, on applique un stimulus nociceptif (mécanique, thermique ou chimique) sur une partie appropriée du corps de l'animal (le plus souvent la patte arrière) qui entraîne le retrait réflexe de cette partie du corps ou de simples comportements innés (vocalisations, léchages, grattages, morsures). Dans ce contexte, j'ai étudié les réponses comportementales à l'application d'une gamme ascendante de soies de Von Frey (stimulus mécanique) sur la zone plantaire en utilisant un score nociceptif basé sur une étude de Vos et ses collaborateurs en 1994. J'y reviendrai plus longuement dans les matériels et méthodes. On soulignera que ce test n'est pas une mesure directe de la douleur mais plutôt de

l'hypersensibilité (allodynie et hyperalgésie) qui accompagne la douleur. Il existe aussi des tests comportementaux basés sur un apprentissage. Il s'agit de tests de conditionnement opérant : par exemple apprendre à mettre fin à une stimulation aversive (y échapper ou s'autoadministrer un analgésique) ou apprendre à préférer un lieu préalablement associé au soulagement de la douleur ou non associé à une stimulation nociceptive. Enfin, on peut aussi étudier des comportements plus complexes qui sont altérés en cas de douleur : l'attention, le sommeil, l'anxiété, les comportements sociaux etc.

C- Complexité et limites des modèles animaux

Bien que les modèles animaux de douleurs neuropathiques soient nécessaires pour la compréhension des phénomènes pathologiques, il nous faut prendre en considération certains paramètres très importants dans l'approche expérimentale de la douleur. En effet, des études ont mis en évidence l'impact considérable de plusieurs paramètres majeurs sur le comportement douloureux animal. Je vous présenterai donc ici les résultats de ces études, qui nous permettent de mieux comprendre les résultats de nos expériences comportementales et ensuite j'aborderai les limites des modèles de douleur chronique et neuropathique.

C.1- Complexité des modèles animaux

Il nous est tous arrivé à un moment ou un autre au cours de nos expériences comportementales de comparer nos résultats avec ceux de nos collègues et, souvent, des différences plus ou moins importantes pouvaient être notées. L'équipe de Jeffrey S. Mogil, a réalisé en 2002 une grande analyse de leurs résultats de tests comportementaux douloureux datant de 1993 à 2001 (Chesler et al., 2002). Ces données ont permis de mettre en avant plusieurs facteurs influençant l'expression et la perception de la douleur chez les rongeurs. Le facteur le plus important est le sexe de l'expérimentateur. En effet, si l'expérimentateur est un homme, sa présence interagit avec le comportement douloureux exprimé par le rongeur et induit une inhibition de l'expression de la douleur, donc une analgésie. L'équipe de Jeffrey S. Mogil a cherché à comprendre cette analgésie et a pu montrer qu'elle est causée par le stress physiologique lié à la

détection de composés chimiques notamment dans la sueur humaine (Sorge et al., 2014). Ainsi, le stress causé par la présence d'un autre mammifère mâle peut induire jusqu'au doublement des taux de corticostérone, mais aussi la diminution du nombre de neurones spinaux c-fos positifs (donc activés) dans un modèle d'injection de zymosan dans la cheville (Sorge et al., 2014). Je trouve que cette étude est extrêmement importante, puisqu'elle montre à quel point le comportement douloureux peut être influencé par l'expérimentateur. Au-delà du sexe de l'expérimentateur, Chesler et ses collaborateurs en 2002 ont pu mettre en évidence le rôle très important du génotype de l'animal testé sur les réponses douloureuses. En fonction de la souche utilisée, les réponses peuvent varier de manière importante. Le troisième point très intéressant mis en évidence par cette étude est l'impact de l'ordre des animaux testés au sein d'une même cage. Les auteurs rapportent que le temps de retrait de la patte à un stimulus douloureux diminue entre le premier rat testé dans une cage et le 4ème et dernier rat de la même cage, démontrant ainsi un effet « ordre de passage » dans le comportement. Il en est de même pour l'analgésie induite par la morphine, dont la dose pour obtenir 50% de soulagement augmente entre le 1er et le 4ème rongeur testé. Ce résultat suggère des communications entre les rongeurs de la cage via divers mécanismes : phéromones, vocalisations… Le stress pourrait être la cause de ce comportement. Les auteurs rapportent également des différences en fonction du moment du test, en relation avec le rythme circadien des animaux, la saison et le taux d'humidité. Concernant le moment de la journée choisi pour réaliser les expériences, il est sûr que les rats étant des animaux nocturnes, les tester pendant notre phase d'activité humaine, en journée, induit forcément un biais. Il peut bien sûr être envisagé de réaliser les expériences en lumière rouge et de dé-cycler les animaux afin que leur période active coïncide avec la nôtre. Le sexe des animaux importe également ainsi que le nombre de rongeurs par cage. Les mâles sont plus stressés par un nombre important de congénères dans la même cage à l'inverse des femelles, qui sont plus calmes (Brown and Grunberg, 1995).

Ainsi, lors des expériences et tests comportementaux, de très nombreux paramètres sont à prendre en considération. Les deux facteurs pour moi les plus notables sont le genre de l'expérimentateur et l'ordre des animaux testés au sein d'une même cage. Pour prendre en compte ces deux facteurs, il s'agira de conserver un même expérimentateur pour l'ensemble de l'étude et de conserver le même ordre de passage pour chacun des animaux durant l'ensemble de l'étude.

Un autre aspect très important concernant les tests comportementaux est la capacité d'empathie chez les rongeurs. L'équipe de Jeffrey S. Mogil a réalisé l'expérience suivante : ils ont placé deux souris d'une même cage dans deux cages se faisant face et où elles pouvaient se voir. Les deux souris recevaient une injection intra-abdominale d'acide acétique. Ils ont noté que le comportement douloureux chez les souris était plus important que quand elles étaient isolées. Quand une souris reçoit une injection de 5% de formol dans une patte et qu'elle observe une souris recevant une injection de 1% de formol, elle présente moins de léchages de la patte douloureuse que si elle observe une souris recevant une injection de 5% de formol (Langford et al., 2006). Les comportements d'empathie ont été retrouvés chez le rat (Ben-Ami Bartal et al., 2011). Enfin, il a été montré que le présence d'un étranger (un inconnu pour un humain ou un rongeur d'une autre cage) induit un taux de stress élevé et que ce stress diminue l'empathie. Le blocage du système glucocorticoïde permettait de retrouver cette empathie. Les auteurs de l'étude proposent donc que l'empathie soit prévenue par le stress de l'interaction sociale avec un individu non familier, ce phénomène serait conservé au cours de l'évolution (Martin et al., 2015).

Ainsi, au-delà de la simplicité apparente de la réalisation de modèles animaux, il est nécessaire de prendre en compte un nombre important de paramètres pour mieux comprendre les résultats expérimentaux mais aussi pour en limiter les biais. Les plans d'expérience devraient donc suivre un déroulement minutieusement préparé pour que chacun de ces facteurs puissent être contrôlés, maîtrisés et connus. En plus de ces facteurs pouvant altérer les réponses

comportementales, il existe des limites aux modèles animaux et des critiques sur les modèles réalisés et utilisés aujourd'hui.

C.2- Limites et critiques des modèles animaux de douleur neuropathique

Le premier point est qu'il existe une réelle différence entre la réalité épidémiologique de la prévalence de la douleur chronique chez les humains et les modèles animaux. En effet, chez les humains, ce sont les femmes d'âge moyen qui sont les plus atteintes par les douleurs chroniques. Or les modèles animaux utilisent majoritairement de jeunes mâles (Mogil et Chanda, 2005). De plus, il existe d'importantes différences en ce qui concerne la douleur en fonction des races et des ethnies chez l'humain et en fonction des souches chez les rongeurs. Or le pourcentage d'études sur la douleur animale qui utilise plus d'une souche à la fois est infime. Ensuite, on pourrait reprocher que les études sur les modèles animaux se focalisent beaucoup sur la douleur en elle-même et n'étudie que trop peu les états qui l'accompagnent comme l'anxiété, la dépression, les dysfonctions cognitives, la diminution de la libido… même si aujourd'hui ces études semblent se développer.

L'autre point important est : pourquoi accorder autant d'importance aux réflexes de retrait à l'application de stimuli mécaniques ou thermiques alors qu'ils sont extrêmement dépendants de l'expérimentateur et qu'ils ne possèdent que peu de correspondance avec les symptômes majeurs retrouvés chez les humains (Vierck et al., 2008)? En effet l'hypersensibilité thermique et mécanique a une faible prévalence chez les humains en regard notamment des douleurs spontanées, d'engourdissement ou de dysesthésie (Backonja and Stacey, 2004). Les tests comme les mesures de la vocalisation, de la distribution du poids entre les différentes pattes (*dynamic weight bearing apparatus*, DWB), des expressions faciales et du pourcentage de toilettage permettraient une caractérisation des symptômes douloureux plus en adéquation avec ceux observés chez les humains (Kurejova et al., 2010; Langford et al., 2010; Mogil et Crager, 2004).

Ainsi, ces modèles animaux possèdent des limites dont il est nécessaire de tenir compte au moment d'élaborer le plan d'expérience de chaque étude. Ces critiques ne sont pas là pour remettre en cause l'élaboration et l'utilisation des modèles animaux de douleur neuropathique, mais au contraire pour en améliorer les utilisations, la compréhension et permettre de mieux coller à la réalité animale et humaine dans la perception de la douleur.

Je vous propose maintenant d'aborder les mécanismes mis en jeu dans la mise en place et le développement des douleurs neuropathiques.

VI- La douleur neuropathique : entre hyperexcitabilité neuronale et réactivité gliale

La douleur neuropathique est un phénomène non adaptatif et incapacitant. Il est le résultat d'un ensemble de modifications et de remaniements profonds au sein du système nerveux. Ces remaniements conduisent à une inefficacité des traitements antalgiques utilisés en conditions de douleur physiologique. Il est donc nécessaire de comprendre la physiologie de cette pathologie pour permettre de déchiffrer les nouveaux mécanismes mis en jeu afin de déceler de nouvelles cibles thérapeutiques plus efficaces. Les modifications s'opèrent à tous les niveaux du système nerveux : périphérique et central. Ces modifications surviennent au niveau du site de la lésion mais aussi à distance.

Je vous propose tout d'abord d'étudier le phénomène de sensibilisation. Cette sensibilisation est un phénomène majeur dans le développement et le maintien des douleurs neuropathiques. Elle survient à deux niveaux: une sensibilisation périphérique et une sensibilisation centrale. Nous nous demanderons alors si les cellules gliales peuvent participer à cette sensibilisation et plus particulièrement à la sensibilisation centrale. Après avoir présenté cet aspect, j'aborderai les traitements qui existent actuellement. Je vous présenterai tout d'abord très brièvement les approches « classiques », puis une nouvelle approche thérapeutique basée notamment sur la pratique de la méditation de pleine conscience. Nous verrons que cette nouvelle approche repose sur des mécanismes supra-spinaux.

A- Une sensibilisation périphérique

Qu'est-ce que la sensibilisation périphérique ? Cette formule correspond à un fait : les fibres afférentes primaires nociceptives augmentent leur réponse aux stimuli douloureux ainsi qu'à l'application de substances pro-nociceptives, et peuvent présenter des potentiels d'action même en absence de stimulation (Kajander et Bennett, 1992; Xie et al., 1995). On dit qu'elles sont sensibilisées. Ce phénomène existe en condition physiologique, mais il ne dure pas longtemps. Il permet alors de protéger la zone lésée de la survenue d'une nouvelle agression de l'environnement. Nous pouvons avoir conscience de ce phénomène lorsque nous nous coupons par exemple : la zone lésée sera plus douloureuse, allodynique, pendant les quelques jours suivant la lésion, le temps de la réparation tissulaire. En condition de douleurs neuropathiques, ce phénomène de sensibilisation survient également, mais est maintenu de manière pathologique. De nombreuses études sur des modèles animaux ont pu mettre en évidence les profonds remaniements qui surviennent au niveau des fibres afférentes. A la suite d'une lésion nerveuse, il existe une inflammation locale autour du site lésé. C'est cette inflammation qui va principalement provoquer la sensibilisation périphérique. Lors de cette inflammation, de nombreuses cellules non-neuronales vont envahir le site lésé, comme notamment de nombreux macrophages (Frisén et al., 1993; Lindholm et al., 1987). Ces cellules non-neuronales ainsi que les fibres lésées vont libérer une « soupe inflammatoire » contenant par exemple les interleukines 6 et 1β, du NO, du NGF et du TNF-α (Bolin et al., 1995; Lindholm et al., 1987; Murphy et al., 1995; Zochodne et al., 1997). Ces molécules peuvent favoriser la régénération axonale, comme IL-1β (Horie et al., 1997), mais peuvent aussi être toxiques, comme le NO (Zochodne et al., 1997). Par contre, cette « soupe inflammatoire » augmente l'excitabilité des fibres afférentes primaires (Michaelis et al., 1997). En agissant sur les fibres afférentes nociceptives qui expriment les récepteurs spécifiques, les diverses molécules vont modifier les propriétés de ces afférences soit rapidement (modulation de l'activité de certains canaux ioniques) soit plus lentement (modifications transcriptionnelles et/ou post-traductionnelles). Par exemple, le NGF est capable de moduler via des cascades intracellulaires les récepteurs

sensibles au chaud (Chuang et al., 2001) mais va aussi augmenter leur nombre (Ji et al., 2002). De même, la « soupe inflammatoire » est capable de moduler les canaux sodiques voltage-dépendants des fibres C en diminuant leur seuil d'activation (Gold et al., 1996). Les nocicepteurs deviennent donc hypersensibles. Au-delà de l'action de la soupe inflammatoire, il a été montré qu'au sein des DRG il existe des dépolarisations croisées excitatrices (Amir et Devor, 1996). Ainsi, une fibre présentant une activation suite à une stimulation ou de manière spontanée pourra activer une fibre non stimulée au sein des DRG. Il est donc possible pour des fibres uniquement liées à des mécanorécepteurs (Aβ par exemple) d'interagir avec des fibres liées à des nocicepteurs comme les fibres C (Cervero et Laird, 1996). Ce phénomène pourrait être important au cours du développement du symptôme d'allodynie. En effet des décharges spontanées de fibres Aα et Aβ ont été enregistrées après lésion nerveuse (Kajander et Bennett, 1992). Elles pourraient décharger spontanément soit parce qu'elles ont été lésées soit parce qu'elles ont été activées par des fibres nociceptives via le mécanisme précédemment décrit. Ce phénomène serait alors exponentiel, de plus en plus de fibres afférentes seraient activées. Ainsi, la sensibilisation périphérique contribue à une augmentation de l'excitabilité des fibres afférentes et à la genèse de potentiels d'actions ectopiques, pouvant survenir en l'absence d'un stimulus douloureux. Ces fibres afférentes projettent au sein de la moelle épinière, premier relais du système nerveux central, pour délivrer leur message. Dans le cas des pathologies liées à des lésions du système nerveux, le message délivré sera biaisé et amplifié.

B- Une sensibilisation centrale

La sensibilisation centrale se produit à divers niveaux du système nerveux central. Bien que la plupart des études se soient attachées à disséquer les mécanismes spinaux, il existe aussi des preuves d'une sensibilisation centrale au niveau supra-spinal. Cette partie sera majoritairement consacrée aux études spinales, puisque je vous présenterai en détails les événements thalamiques observés lors des douleurs neuropathiques dans la partie suivante.

B.1- Les mécanismes possibles

Au sein de la corne dorsale de la moelle épinière, zone de projection des fibres afférentes, il existe là aussi de nombreuses modifications à la suite d'une lésion nerveuse. Ainsi, les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière présentent une hyperexcitabilité : leur seuil est abaissé et leur réponse est augmentée pour des stimulations supraliminaires. Ces modifications de l'activité des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière en condition de douleurs neuropathiques sont dues en partie à la présence de modifications dans l'expression de canaux, récepteurs et protéines de transduction du signal. Ainsi, une étude a montré la présence de modifications dans l'expression spinale de 14 canaux, 25 récepteurs et 42 molécules impliquées dans la transduction du signal quatorze jours après la transsection du nerf sciatique (Yang et al., 2004). On peut noter parmi les canaux, les canaux calciques et sodiques, parmi les récepteurs certaines sous unités des récepteurs AMPA, NMDA, $GABA_A$ et nicotiniques et parmi les molécules clés de voies de signalisation : PKCα (protein kinase c alpha), JNK (c-Jun N-terminal kinases), ERK (extracellular signal-regulated kinases) et p38MAPK (p38 mitogen-activated protein kinases ; Yang et al., 2004).

Les modifications moléculaires des canaux vont entrainer des variations des propriétés intrinsèques des neurones de la corne dorsale. Par exemple, en condition neuropathique, l'expression accrue des canaux calciques de type L (Fossat et al., 2010) pourrait augmenter les propriétés de plateau des neurones WDR (Morisset et Nagy, 1999). L'augmentation de l'expression des canaux sodiques en condition neuropathique va bien sûr conduire à une hyperexcitabilité des neurones nociceptifs spinaux.

La sensibilisation centrale peut aussi se manifester au niveau synaptique. Les fibres afférentes nociceptives libèrent principalement du glutamate qui agit sur des récepteurs AMPA et kaïnate. La fréquence des courants post-synaptiques excitateurs miniatures au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière est augmentée dans les modèles SNI et SNL (Inquimbert et al., 2012; Zhou and Luo, 2015). Ces données suggèrent une libération pré-synaptique accrue de

glutamate. Effectivement, les taux de glutamate dans la corne dorsale de la moelle épinière (Kawamata and Omote, 1996) et dans le liquide céphalo-rachidien (Inquimbert et al., 2012) sont augmentés après lésion de nerfs périphériques. La transmission excitatrice peut aussi être augmentée par un effet post-synaptique. En effet une insertion accrue de récepteurs AMPA est observée au niveau de la membrane des neurones de la corne dorsale en conditions de douleur (Galan et al., 2004). La potentialisation pré- et post-synaptique que je viens d'évoquer conduisent à une dépolarisation importante des neurones de la corne dorsale, les récepteurs NMDA jusqu'alors silencieux vont pouvoir être activés. Cette activation des récepteurs NMDA va permettre une entrée de calcium qui conduit à une potentialisation de la transmission synaptique nociceptive à long terme (LTP) avec pour conséquence une augmentation durable de l'amplitude des courants synaptiques.

Enfin, la sensibilisation centrale peut aussi se manifester au niveau des réseaux neuronaux présents dans la corne dorsale de la moelle épinière. Dès 1965, Melzak et Wall ont proposé que la perte de fonction des neurones inhibiteurs de la corne dorsale de la moelle épinière puisse conduire à une augmentation de la douleur ressentie (Melzack et Wall, 1965). Des études plus récentes ont montré qu'effectivement dans des modèles CCI et SNI, l'incidence, l'amplitude et la durée des courants post-synaptiques inhibiteurs au niveau des neurones de la corne dorsale suite à une stimulation afférente diminuent (Moore et al., 2002). De plus, il existe une diminution de l'expression de l'enzyme GAD65, présente dans les neurones GABA, au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière dans des modèles CCI et SNI (Lorenzo et al., 2014; Moore et al., 2002). En conditions neuropathiques, il existe donc une désinhibition des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière par une diminution de leurs contrôles inhibiteurs. Cette désinhibition augmente bien sûr l'excitabilité des neurones nociceptifs mais pourrait aussi révéler des réseaux neuronaux normalement inactifs en conditions physiologiques (Miraucourt et al., 2007).

L'ensemble de ces modifications conduit donc à une sensibilisation centrale de la transmission des informations nociceptives lors d'une lésion nerveuse. Nous avons vu précédemment qu'au-delà du neurone pré- et post-synaptique d'autres partenaires synaptiques existent : les astrocytes et la microglie. Ces partenaires peuvent-ils participer à la sensibilisation centrale ?

B.2- Réactivité gliale et rôles des interactions neurones-glie

Nous avons vu précédemment que les cellules astrocytaires et microgliales spinales peuvent présenter un phénotype réactif. Dans des modèles PSNL, CCI, SNI et SNL, au-delà des modifications morphologiques de la glie, il existe une surexpression des ARNm et des protéines GFAP et S100β, pour les astrocytes et de CD11b/c et Iba-1 pour la microglie (Beggs et Salter, 2007; Colburn et al., 1999; Ducourneau et al., 2014; Garrison et al., 1991; Hald et al., 2009; Honore et al., 2000; Tanga et al., 2004, 2006). De plus, l'expression de l'ARNm du marqueur microglial TLR4 augmente lors d'une lésion d'un nerf spinal (Tanga et al., 2004). Il en va de même pour l'expression de l'ARNm et/ou de la protéine des récepteurs $P2X_4$ (Tsuda et al., 2003), $P2Y_{12}$ (Tozaki-Saitoh et al., 2008) et CX3CR1 (Lindia et al., 2005; Verge et al., 2004) microgliaux après lésion d'un nerf périphérique. Pour certaines molécules les profils d'expression peuvent être plus complexes. Ainsi, l'expression du transporteur astrocytaire au glutamate GLT-1 va augmenter dans les premiers jours après la lésion nerveuse. Puis, entre 1 à 3 semaines après la lésion, l'expression des transporteurs GLT-1 présents à la membrane des astrocytes diminue (Sung et al., 2003; Wang et al., 2008). Enfin, il existe une sur-expression et une augmentation de la libération de molécules pro-inflammatoires par les cellules gliales comme le TNF-α, les interleukines 6 et 1β, le monoxyde d'azote (NO) et la CCL2 (Detloff et al., 2008; Gao et al., 2009; Kim et al., 2007).

Les cellules gliales spinales possèdent donc un phénotype réactif en conditions de douleurs neuropathiques, mais sont-elles vraiment impliquées dans le développement et le maintien de la pathologie de douleur neuropathique ? Pour savoir si les cellules astrocytaires et microgliales sont nécessaires au développement et au maintien des comportements douloureux, des études

ont utilisé des inhibiteurs fonctionnels des astrocytes et de la microglie, administrés de manière préventive ou curative. Tout d'abord, on peut utiliser des bloqueurs généraux des cellules gliales. Ainsi, la propentofylline bloque la recapture cellulaire de l'adénosine et est un inhibiteur spécifique de la phosphodiestérase IV qui dégrade l'AMPc (Nagata et al., 1985). Elle bloquerait l'activation des cellules gliales en augmentant les taux intracellulaires d'AMPc (Schubert et al., 1997) même si on ne sait pas encore précisément comment elle peut cibler spécifiquement les cellules gliales. Par contre, l'injection intrapéritonéale chronique de propentofylline avant l'installation des symptômes douloureux ou après leur développement dans un modèle de lésion de nerf périphérique diminue la réactivité gliale spinale ainsi que les symptômes douloureux (allodynie et hyperalgésie mécanique ; Raghavendra et al., 2003a; Sweitzer et al., 2001; Tawfik et al., 2008). Le fluorocitrate, quant à lui, est préférentiellement capté par les cellules gliales et inhibe l'enzyme aconitase présente au sein du cycle de Krebs (Fonnum et al., 1997; Hassel et al., 1992). L'arrêt du cycle de Krebs et donc l'inhibition de la respiration oxydative bloquent fonctionnellement les cellules gliales. Dans des modèles de neuropathie périphérique, l'injection intrathécale de fluorocitrate prévient les symptômes douloureux (Milligan et al., 2003) et abolit l'allodynie mécanique quand elle est installée (Zhang et al., 2012). Les résultats obtenus montrent donc que les cellules gliales sont nécessaires au développement et au maintien des douleurs neuropathiques. Comme les astrocytes sont parmi les cellules gliales celles qui métabolisent préférentiellement l'acétate et le citrate extracellulaires (Fonnum et al., 1997), certains auteurs utilisent le fluorocitrate comme un inhibiteur spécifique des astrocytes. A ma connaissance, la démonstration définitive n'a pas été apportée. Par contre, il est nécessaire d'utiliser des inhibiteurs spécifiques des astrocytes ou de la microglie pour disséquer plus finement le rôle respectif de ces cellules dans l'apparition et le maintien des douleurs neuropathiques. Dans ce contexte, la minocycline est une tétracycline qui inhibe spécifiquement la microglie (Tikka et al., 2001). L'injection intra-péritonéale chronique de minocycline empêche la réactivité microgliale spinale normalement observée suite à une lésion d'un nerf spinal aussi bien de manière préventive que curative (Raghavendra et al., 2003b). Par contre, seule

l'administration préventive de minocycline diminue les symptômes douloureux (Raghavendra et al., 2003b). Ces résultats sur le comportement douloureux ont été retrouvés avec des injections intrathécales et dans un modèle SNL (Zhang et al., 2012). Ces résultats suggèrent donc que la microglie serait plus impliquée dans le développement des douleurs neuropathiques que dans leur maintien. Enfin, le L-α aminoadipate (LAA), intermédiaire de la voie métabolique de la lysine, conduit à la dégénérescence des astrocytes (Khurgel et al., 1996) L'administration intrathécale de LAA diminue la réactivité astrocytaire spinale et est seulement capable d'abolir les symptômes douloureux une fois qu'ils sont établis dans un modèle SNL (Wang et al., 2009; Zhuang et al., 2006). Ces résultats suggèrent donc que les astrocytes seraient plus impliqués dans le maintien des douleurs neuropathiques que dans leur développement. Ainsi, l'ensemble de ces données suggère que la microglie pourrait participer à la mise en place alors que les astrocytes assureraient le maintien des douleurs neuropathiques. On notera que même si ces résultats sont extrêmement intéressants, ils ont été obtenus avec des drogues dont la spécificité n'a pas toujours été vérifiée à 100% et qui peuvent aller jusqu'à détruire les cellules gliales (par exemple le LAA). Les interprétations doivent donc être lues en gardant à l'esprit ces points limitatifs.

La réactivité de ces deux types gliaux est-elle suffisante pour le développement et le maintien des symptômes de douleur? Cette question est assez difficile à tester expérimentalement car elle implique de disposer de déclencheurs spécifiques de la réactivité astrocytaire ou de la réactivité microgliale, n'affectant pas directement les neurones. Certaines études ont tiré parti du fait que les cellules gliales mises en culture expriment un phénotype réactif que l'on peut encore amplifier par application d'agonistes de récepteurs surexprimés. Par exemple, Tsuda et collaborateurs ont montré que de la microglie issue de culture primaire, incubée avec de l'ATP qui stimule les récepteurs $P2X_4$ et injectée intrathécalement est capable d'induire de l'allodynie mécanique chez des rats naïfs (Tsuda et al., 2003). Narita et collaborateurs ont montré que ce même protocole expérimental est aussi capable de produire une hyperalgésie thermique (Narita

et al., 2006a). Une approche similaire a été réalisée avec les astrocytes. Ainsi, l'injection intrathécale d'astrocytes issus de culture primaire et stimulés avec du TNFα est capable de révéler une allodynie mécanique chez des rats naïfs (Gao et al., 2010). D'autres études ont utilisé des approches visant à activer spécifiquement un type glial *in situ*. Par exemple, on sait que, dans la moelle épinière, seule la microglie exprime les récepteurs de la fractalkine et qu'ils sont surexprimés en condition de douleur neuropathique (Lindia et al., 2005; Verge et al., 2004). Ainsi l'administration intrathécale de fractalkine entraine une allodynie mécanique et une hyperalgésie thermique chez des rats naïfs (Milligan et al., 2004). Ces données suggèrent donc que la réactivité microgliale, spécifiquement déclenchée par la voie de signalisation dépendante de la fractalkine, est suffisante pour induire le développement d'une allodynie et d'une hyperalgésie. En résumé, il semble donc bien que la réactivité gliale spinale, aussi bien astrocytaire que microgliale, soit suffisante pour induire le développement d'une allodynie mécanique

Comment la réactivité gliale spinale peut-elle être obtenue suite à une lésion nerveuse ? Dans la partie concernant les cellules gliales nous avons vu qu'il existe pléthore de molécules pouvant déclencher la réactivité gliale (voir par exemple fig. 5 et tableau 2). Ce déclenchement est très certainement multifactoriel et les neurones eux-mêmes peuvent jouer un rôle important. Par exemple, nous l'avons vu, la sensibilisation périphérique aboutit à une libération accrue de glutamate (et d'autres neurotransmetteurs/neuromodulateurs comme l'ATP) au niveau des terminaisons sensorielles spinales. Or le glutamate et l'ATP activent les astrocytes et la microglie.

Quels sont alors les effets pro-nociceptifs de la réactivité gliale ? Là encore nous avons vu dans la partie sur les cellules gliales, que, une fois réactives, les cellules gliales peuvent libérer un très grand nombre de molécules. On peut citer des facteurs pro-inflammatoires comme les cytokines et les prostaglandines mais aussi des neurotrophines et des neuromodulateurs tels que l'ATP ou le monoxyde d'azote (pour revue McMahon et al., 2005). Ces médiateurs peuvent agir non

seulement sur les neurones et donc moduler leur activité, mais également sur les cellules gliales elles-mêmes, renforçant leur réactivité. Ces interactions réciproques entre les cellules gliales et les neurones constituent une « boucle d'amplification » neuro-gliale, qui permet l'amplification de l'information nociceptive (pour revue voir Watkins et Maier, 2003). Dans ce contexte, on peut citer la fractalkine (ou CX3CL1) qui est une chémokine extracellulaire liée à la membrane neuronale. Dans la moelle épinière, les neurones de la corne dorsale ainsi que les terminaisons sensorielles expriment la fractalkine (Clark et al., 2007; Lindia et al., 2005; Verge et al., 2004). De plus, il existe une forme soluble, résultant du clivage de la fractalkine membranaire par une enzyme, la cathepsine S (CTSS), qui est exprimée et libérée par la microglie (Clark et al., 2007). Enfin, la microglie exprime spécifiquement le récepteur de la fractalkine soluble, le récepteur CX3CR1 (Lindia et al., 2005; Verge et al., 2004). En conditions neuropathiques, la microglie réactive sur-exprime la CTSS (Clark et al., 2007) ainsi que le récepteur CX3CR1 (Lindia et al., 2005; Verge et al., 2004) et les taux de fractalkine soluble augmentent (Clark et al., 2009). Ainsi lors d'une lésion nerveuse, la microglie libère la CTSS qui scinde la fractalkine neuronale en fractalkine soluble qui en retour agit sur la microglie via les récepteurs CX3CR1. La stimulation de ces récepteurs va, via la voie p38MAPK (Clark et al., 2007; Zhuang et al., 2007), augmenter la libération de molécules pro-inflammatoires comme IL-1, IL-6 et NO (Milligan et al., 2005) qui à leur tour vont pouvoir agir sur la microglie elle-même mais aussi sur les neurones et les astrocytes (Fig. 18).

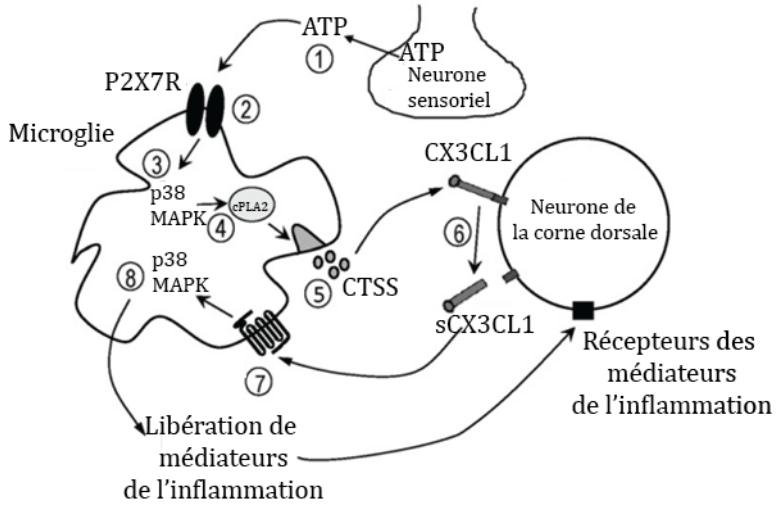


Figure 18 : Schéma du mécanisme pro-nociceptif de la CTSS proposé par A.K. Clark et M. Malcangio. Dans la corne dorsale de la moelle épinière innervée par les fibres endommagées, de hautes concentrations extracellulaires d'ATP (1) sont probablement libérées par les afférences des fibres sensorielles. Ceci induit une activation des récepteurs $P2X_7$ présents sur la microglie (2). Après l'activation de P2X7R, des mécanismes de signalisation intracellulaire incluant la p38 MAPK (3) et la phospholipase A2 (4) conduisent à la libération de CTSS (5). Cette CTSS peut libérer la partie soluble de la CX3CL1 présente sur les neurones (6). Cette CX3CL1 agit sur les récepteurs CX3CR1 microgliaux (7) pour activer encore plus la voie p38 MAPK (8). Ceci conduit à la libération de médiateurs de l'inflammation qui activent les neurones et donc conduit à la douleur chronique. Figure adaptée de Clark et Malcangio, 2012.

Il s'agit bien d'une boucle d'amplification car son blocage à n'importe quel niveau entraîne une diminution des comportements douloureux. Ainsi, dans des modèles de lésion nerveuse, si on bloque la cathepsine S ou si on injecte des anticorps anti-CX3CR1 on diminue les comportements douloureux (Clark et al., 2007; Milligan et al., 2004). Au-delà de la libération de molécules permettant une amplification de la transmission des informations nociceptives, la réactivité gliale peut aussi modifier les taux de certaines molécules ambiantes. Ainsi, dans un modèle de douleur neuropathique SNL, on observe une diminution de 72% de la recapture du glutamate au niveau de corne dorsale de la moelle épinière 4 à 6 semaines après la lésion (Binns et al., 2005) ainsi qu'une diminution de l'expression du transporteur au glutamate astrocytaire GLT-1 une à 3 semaines après la lésion (Sung et al., 2003; Wang et al., 2008). Ces phénomènes astrocytaires concourent à l'augmentation du taux de glutamate au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière observée après lésion nerveuse (Kawamata and Omote, 1996) et donc au phénomène de sensibilisation centrale.

Vu le nombre pléthorique d'activités gliales modifiées, de molécules libérées ainsi que de cibles, il serait fastidieux de présenter l'ensemble des données en faveur d'une interaction glie-neurones concourant à la sensibilisation centrale en conditions neuropathiques (pour revue voir Mika et al., 2013). Par contre, Il est maintenant bien établi que ces interactions neurones-glie jouent un rôle crucial dans la sensibilisation de la transmission de l'information nociceptive au niveau spinal suite à une lésion nerveuse.

Au-delà des modifications spinales observées en condition de douleur neuropathique, les structures supra-spinales, bien que moins étudiées, présentent aussi des phénomènes de sensibilisation centrale. Ainsi, nous l'aborderons en détails dans la partie consacrée à cette structure, le thalamus présente des modifications des propriétés de ses neurones (Guilbaud et al., 1990; Hains et al., 2005) et de sa glie (Zhao et al., 2007). D'autres structures présentent des phénomènes semblables comme par exemple le noyau central de l'amygdale, où il existe une augmentation de la fréquence des potentiels d'action et de l'excitabilité intrinsèque des neurones dans un modèle SNL (Jiang et al., 2014). Dans un modèle PSNL, il a été montré que le cortex somatosensoriel primaire présente des signes de remodelage synaptique (Kim et Nabekura, 2011) et que le cortex cingulaire présente des signes de réactivité astrocytaire (Narita et al., 2006b). Il reste donc encore de nombreuses voies à découvrir et de nombreux mécanismes à comprendre pour être capable d'agencer chacun des morceaux du puzzle correspondant à la pathologie de la douleur neuropathique.

Quels sont les outils dont la médecine dispose pour traiter ces douleurs ? Comment aider les patients à mieux vivre avec ces souffrances ? C'est ce que je vous propose d'aborder maintenant.

C- Quelles thérapies proposer?

L'arsenal thérapeutique pour lutter contre les douleurs neuropathiques est large, mais imparfait et ne parvient pas à soulager les patients. Comme nous l'avons abordé ensemble, les voies d'intégration de la nociception sont modifiées dans le cadre des douleurs neuropathiques. Ainsi,

des traitements qui permettent de soulager des douleurs plus classiques, comme les douleurs aigües, ne sont plus fonctionnels. Dans le tout début de cette partie, je vous propose un tableau modifié d'après Attal et ses collègues (Attal et al., 2010), qui présente les molécules les plus utilisées dans les différents types de douleurs neuropathiques (douleurs centrales, trigéminales, etc…). Ensuite, nous aborderons brièvement les approches chirurgicales. Et enfin, je vous propose de nous intéresser à une nouvelle approche, basée sur des techniques dites comportementales : le rôle de la méditation et du yoga dans la prise en charge des douleurs neuropathiques. J'ai choisi de vous présenter cette nouvelle approche pour deux raisons. Tout d'abord parce qu'elle est non invasive et qu'elle prend en charge l'intégralité de l'individu. Ces techniques sont là pour accompagner les patients et améliorer leur quotidien. Ensuite, et surtout, parce que nous savons maintenant que ces techniques, et leurs effets bénéfiques, reposent en grande partie sur des modifications de l'activité au sein de structures supra-spinales.

C.1- Les approches pharmacologiques

La plupart des patients douloureux chroniques ont cheminé de molécules en molécules au cours de leur parcours de santé, sans pour autant obtenir un soulagement total et efficace. Les molécules utilisées sont notamment des antidépresseurs, des anti-épileptiques comme la gabapentine ou la prégabaline, des opioïdes, comme le tramadol ou l'oxycodone, des cannabinoïdes, des agents locaux comme les patchs de lidocaïne ou l'application locale de capsaïcine ou encore d'autres molécules comme la toxine botulique, des dérivés de nitrates, ou encore de nouveaux agonistes nicotiniques. Toutes ces molécules présentent des effets secondaires importants, plus ou moins présents en fonction des patients. Ainsi, les effets secondaires sont des nausées, de la somnolence, des complications gastro-intestinales, de la prise de poids, des érythèmes cutanés locaux, des œdèmes périphériques ou encore une augmentation de la pression sanguine. Chaque patient ne réagit pas exactement de la même manière face aux médicaments administrés, en fonction notamment de l'origine de ses douleurs

neuropathiques. Il est donc nécessaire d'une part d'établir des guides de recommandation et d'autre part de trouver de nouvelles molécules, pour permettre à la fois de mieux soulager les patients et d'améliorer leur quotidien en diminuant les effets secondaires.

Le tableau 4 résume les recommandations d'utilisation des traitements médicamenteux en fonction de l'étiologie des douleurs neuropathiques. Ce tableau, modifié de l'étude d'Attal et de ses collègues, a été également repris par l'IASP comme référence.

Etiologie des douleurs	Niveau A d'efficacité	Niveau B d'efficacité
Douleurs centrales	Cannabinoïdes (sclérose en plaques) Prégabaline (lésions spinales), Gabapentine	Lamotrigine (post-AVC), TCA (lésions spinales, post-AVC), Tramadol (lésions spinales), Opioïdes
Douleurs trigéminales classiques	Carbamazépine	Oxcarbazépine
Douleurs post-traumatiques ou post-chirurgicales neuropathiques		Amitroptyline, Toxine botullique A
Neuropathies d'étiologies multiples	Bupropion, Cannabinnoïdes, Levorphanol	Méthadone, TCA

Tableau 4 : Classification des traitements médicamenteux pour différents cas de douleurs neuropathiques. Les traitements médicamenteux de niveau A sont des traitements dont l'efficacité a été démontrée à haut niveau de preuves et dans plusieurs étiologies de douleur neuropathique et avec des études contrôlées. Les traitements médicamenteux de niveau B sont des traitements dont l'efficacité a été démontrée avec un niveau de preuves intermédiaire et qui sont donc prescrits en seconde intention. TCA : antidépresseurs tricycliques. Tableau adapté d'Attal et al, 2010.

C.2- Les traitements chirurgicaux

Il existe deux types principaux de techniques chirurgicales qui peuvent être proposées aux patients : les ablations, qui sont de moins en moins utilisées, et les stimulations électriques, qui leur sont préférées de nos jours. Dans les premières approches, il existe les cordotomies antérolatérales, qui sont plutôt utilisées en soin palliatifs pour réaliser une analgésie controlatérale. Utilisée depuis 1912 par Spiller et Martin, la technique s'est perfectionnée avec le temps (Kanpolat et al., 1989; Rosomoff et al., 1965). Cette technique est très peu utilisée et de plus, elle induit le développement de douleurs miroirs dans plus de 60% des cas (Nagaro et al., 2001). Les thalamotomies quant à elles ont été plus pratiquées : notamment les lésions du thalamus médian et du thalamus ventrobasal. Pour le thalamus ventrobasal, seulement 32% des patients atteints de douleurs neuropathiques sont soulagés (Tasker, 1982) et les complications

liées à la chirurgie sont nombreuses. Les lésions du thalamus médian quant à elles aboutissent à un soulagement de 50 à 100% chez 67% des patients (Jeanmonod et al., 1994). Ces chirurgies sont utilisées en dernier recours et plus rarement que les stimulations que nous aborderons ensuite. La dernière catégorie de chirurgie, la plus invasive et la plus désastreuse à mon sens, a été la réalisation de lobotomies. Le but était de rendre les patients apathiques à la douleur. Elle consistait le plus souvent à couper les connections afférentes et efférentes du cortex préfrontal. Cette chirurgie entraînait des déficits moteur et/ou sensoriel et un soulagement maximal de 20 mois. C'est donc un traitement sévère pour des effets aussi peu bénéfiques… Cette dernière pratique est interdite en France et dans de très nombreux pays. Plus généralement, ces pratiques de lésions ne sont utilisées qu'en dernier recours, dans les cas extrêmes et si aucun traitement ne permet d'amélioration. Leur utilisation dépend également du pays et des médecins.

La seconde approche, à savoir l'utilisation de stimulations pour soulager les douleurs, est maintenant bien établie. Il existe tout d'abord les stimulations de la moelle épinière, qui correspondent à environ 16000 cas par an dans le monde. Cette technique semble être plus efficace pour soulager les douleurs neuropathiques que les autres types de douleurs chroniques (Gybels et Sweet, 1989; Linderoth et Meyerson, 2000). Il a été montré que la stimulation de la moelle épinière inhibait l'hyperexcitabilité des neurones WDR spinaux et induisait une libération de GABA au niveau spinal (pour revue, Meyerson et Linderoth, 2000). Cette technique permet un soulagement à long terme mais dépend beaucoup de l'étiologie des douleurs. Il existe également les stimulations du thalamus, des substances grises périaqueducale et périventriculaire. Elles permettent un soulagement de 19% à 79% des patients en fonction des études (sur 13 études et 1114 patients), avec un bénéfice plus grand pour les douleurs lombaires (Kumar et al., 1997). Citons pour exemple l'étude de Kupers et ses collaborateurs en 2000 qui présente un patient souffrant de douleur à la face, totalement soulagé par des stimulations du noyau VPM. Ce soulagement nécessite par contre des stimulations permanentes

(Kupers et al., 2000). Les mécanismes de ces effets bénéfiques sont méconnus et l'hypothèse d'un gate control supra-spinal a été avancé. Enfin, il existe des stimulations du cortex moteur. Elles permettraient de soulager près de 50% à 70% des patients (Katayama et al., 1998; Tsubokawa et al., 1993). C'est une technique prometteuse mais dont les mécanismes sont là encore très peu connus. L'implication des relations cortico-thalamiques, des cortex orbito-frontal et cingulaire mais aussi du tronc cérébral pourrait expliquer ces soulagements.

Ainsi, bien que certaines stimulations de régions du système nerveux central soient assez efficaces pour soulager les douleurs neuropathiques , il est nécessaire de mieux connaitre les relations entre les différents éléments du système nerveux et les mécanismes impliqués dans les douleurs neuropathiques afin de pouvoir élaborer des stratégies permettant d'améliorer les techniques existantes et de découvrir de nouvelles approches. Ces approches sont malgré tout invasives et non dénuées de risques comme toute approche chirurgicale. Ces dernières années ont vu se développer des études sur des approches un peu particulières, des approches dites comportementales, basées sur des techniques de méditation et de pratique du yoga.

C.3- Les nouvelles approches thérapeutiques

L'essor des techniques d'imagerie a permis d'avoir accès au fonctionnement *in situ* des structures cérébrales. En 2005, une étude de Kakigi et ses collègues montrait des modifications de l'activité cérébrale d'un pratiquant expérimenté de yoga lors de stimulations douloureuses au laser appliquées pendant une période de méditation ou de non méditation (Kakigi et al., 2005). En période méditative, le yogi déclarait ne ressentir aucune douleur et effectivement, en période méditative, aucune augmentation d'activité n'était détectée dans son thalamus, CCA, insula et CSS2 quand on appliquait la stimulation nociceptive (Kakigi et al., 2005). D'autres études, par la suite, ont montré que des pratiquants de la méditation étaient moins sensibles à la douleur (Grant and Rainville, 2009; Perlman et al., 2010; Zeidan et al., 2010). Les approches d'imagerie ont permis de montrer que la matrice centrale de douleur était profondément modifiée lors de la pratique de la méditation. La pratique de la méditation peut conduire notamment à l'activation

de structures comme la partie rostrale du CCA, la partie dorso-médiale du CPF (Hölzel et al., 2007) et la désactivation de l'insula et des cortex visuels (Herzog et al., 1990; Ives-Deliperi et al., 2011). Il existe plusieurs types de méditation : basée sur le yoga, la pratique Zen, la méditation de pleine conscience,… La plus utilisée dans les études est la méditation de pleine conscience, basée sur la surveillance non réactive à l'expérience présente (ou surveillance ouverte). Ces différents types de méditation conduisent à des patrons d'activités neuronales différentes (Lou et al., 1999; Manna et al., 2010; Shimomura et al., 2008; Wang et al., 2011). La pratique de ces méditations induit des modifications à long terme des structures cérébrales comme par exemple la modification de l'épaisseur de différentes aires corticales (Grant et al., 2010) ou l'augmentation de la substance grise dans l'hippocampe gauche, le cortex cingulaire postérieur et le cervelet par exemple (Hölzel et al., 2011) ou dans les centres du tronc cérébral impliqués dans le contrôle cardiorespiratoire (Vestergaard-Poulsen et al., 2009). Si la pratique de la méditation de pleine conscience est enseignée à des individus témoins, alors les méditants présentent une diminution de l'aspect désagréable de la douleur, de l'anxiété anticipatoire et de l'intensité douloureuse en elle-même. De plus, ceci est concomitant à des activations/désactivations de structures cérébrales comme le CCA, l'insula et le thalamus (Gard et al., 2012; Zeidan et al., 2011). Les pratiquants de la méditation Zen présentent eux-aussi des modifications de leur activité cérébrale lors d'une stimulation douloureuse, comme le CPF, le CCA, l'insula et le thalamus (Grant et al., 2011).

Chez les patients douloureux chroniques, l'apprentissage de la méditation de pleine conscience ou la pratique du yoga a permis une meilleure acceptation de la douleur, une diminution de l'anxiété, une amélioration de la qualité de vie physique et mentale au quotidien, une impression plus forte de contrôler la douleur, une meilleure condition physique et une participation accrue à la vie sociale (La Cour et Petersen, 2014; Cramer et al., 2013; Morone et al., 2008). Les modifications induites par la pratique de ces deux techniques sont donc des améliorations à la fois physiques, cognitives, émotionnelles, sociales et comportementales. De plus, les patients

rapportent une amélioration de leurs douleurs (La Cour et Petersen, 2014). Ainsi, ces études tendent à souligner l'intérêt de ces pratiques dans le cadre du traitement des douleurs neuropathiques, aussi bien pour améliorer la gestion de la douleur et sa perception que pour améliorer la qualité de vie des patients. Ces techniques mettent en avant le rôle important des structures supra-spinales dans la perception de la douleur et leur capacité à interagir avec celle-ci. Leur utilisation en plus des traitements pharmacologiques habituels devrait donc être encouragée.

Les structures supra-spinales jouent un rôle fondamental dans l'intégration de la nociception, notamment le thalamus. Je vous propose maintenant d'étudier plus en détails les modifications thalamiques qui existent lors des douleurs neuropathiques.

VII- Douleur neuropathique et thalamus : des rôles complexes

Historiquement, Déjerine et Roussy ont décrit en 1906 un syndrome thalamique dans lequel des patients souffrant de lésions thalamiques présentaient des douleurs sévères, persistantes, paroxystiques et parfois intolérables dans leur partie du corps paralysée et qui ne cédaient à aucun traitement antalgique (Déjerine et Roussy, 1906). Plus récemment, il a été montré que parmi des patients ayant souffert d'un accident vasculaire cérébral au niveau du thalamus seuls ceux qui présentaient des lésions au niveau de la partie ventrale et postérieure du thalamus développaient des douleurs neuropathiques centrales (Bogousslavsky et al., 1988). Parallèlement, la stimulation électrique du noyau ventro-caudal du thalamus évoque des sensations douloureuses chez l'homme (Davis et al., 1996; Lenz et al., 1993; Ohara et Lenz, 2003). Enfin, comme nous l'avons vu, les thalamotomies sont encore utilisées pour soulager des douleurs neuropathiques insensibles aux approches thérapeutiques classiques (Jeanmonod et al., 2012). Le thalamus semble donc pouvoir jouer un rôle important dans le développement des douleurs neuropathiques d'origines diverses.

Il existe une base bibliographique solide permettant d'affirmer que le thalamus subit, à l'instar de la moelle épinière, de profonds remaniements en condition de douleurs neuropathiques. Ces remaniements surviennent dès le développement de la pathologie, sont présents tout au long de celle-ci et pourraient donc contribuer au développement et au maintien des douleurs neuropathiques.

Cette littérature repose pour beaucoup sur des études d'imagerie fonctionnelle ou de neurostimulations réalisées chez des patients douloureux. Ces études permettent de mieux comprendre les structures impliquées, leurs relations et de mieux cerner le fonctionnement du système nerveux dans un contexte de douleur neuropathique. Cependant, les études chez les patients présentent un défaut majeur : leurs résultats dépendent d'un ensemble important de facteurs, souvent inextricables et impossibles à maîtriser. De fait, les patients neuropathiques inclus dans les études ont le plus souvent plusieurs années de pathologie douloureuse derrière eux. Ils prennent et ont pris de nombreux traitements thérapeutiques au cours de leur parcours de soins et possèdent une histoire médicale qui leur est propre. Dans certaines études des patients avec de nombreuses pathologies différentes sont utilisés de concert : par exemple patients souffrant de douleur post-opératoire, douleur du membre fantôme, douleur post-accident vasculaire cérébral et névralgie trigéminale comparés à des patients parkinsoniens ou présentant des tremblements ou souffrant de sclérose en plaques (Radhakrishnan et al., 1999). La présence de ces biais entraîne régulièrement l'obtention de résultats divergents voire contradictoires en fonction des études et des cohortes de patients. Malgré tout, nous verrons qu'il existe des résultats majoritairement convergents dans ces études : notamment une modification de l'activité thalamique controlatérale à la région lésée. Certaines études semblent également indiquer la présence d'une réduction du volume du thalamus et d'une réactivité de la glie thalamique.

L'autre partie de la littérature repose sur l'utilisation de modèles animaux de douleur neuropathique. Dans ces études, les animaux utilisés sont majoritairement des singes et des rats,

et, bien que parfois divergentes en fonction du modèle utilisé ou du délai post-chirurgical, elles semblent converger vers un des points cruciaux retrouvé chez les patients : la modification de l'activité des neurones thalamiques en condition de douleur neuropathique.

Je présenterai dans un premier temps les modifications de l'activité des neurones thalamiques, puis les modifications du métabolisme du thalamus. Je poursuivrai avec l'étude des modifications de volume du thalamus. Pour finir, je présenterai les données obtenues chez les patients et les animaux concernant la glie thalamique dans cette structure.

A- Douleur neuropathique: une hyperactivité neuronale thalamique

Dans les études sur les patients douloureux chroniques, les enregistrements de l'activité des neurones thalamiques impliqués dans l'intégration de la nociception, majoritairement réalisés lors de chirurgies d'implantations d'électrodes de stimulations ou lors de thalamotomies, ont mis en évidence la présence d'une hyperactivité neuronale (Noyaux thalamiques intralaminaires : Rinaldi et al., 1991; Noyaux thalamiques médians : Jeanmonod et al., 1993; Noyaux thalamiques ventraux : Hirayama et al., 1989; Lenz et al., 1987, 1989, 1994). Cette hyperactivité neuronale est caractérisée par une plus grande fréquence de décharge au niveau des activités spontanées et évoquées et par la présence d'un plus grand nombre de bouffées de potentiels d'actions par rapport aux patients non douloureux. Dans la zone thalamique correspondant à l'aire où se projettent les fibres de la partie lésée, le nombre de neurones répondant à des stimulations douloureuses augmente, caractérisant la présence d'une modification des champs récepteurs et des champs de projection des neurones nociceptifs présents (Lenz et al., 1998).

Dans les modèles animaux, cette hyperactivité des neurones thalamiques (majoritairement du VPL) est retrouvée. Que ce soit chez les singes à la suite d'une lésion chronique du faisceau spinothalamique (Weng et al., 2000) ou chez les rats à la suite d'une lésion chronique d'un nerf ou de racines dorsales rachidiennes (Guilbaud et al., 1990; Iwata et al., 2011; Yamashiro et al.,

1994; Zhao et al., 2006a) ou d'une lésion de la moelle épinière (Gerke et al., 2003; Hains et al., 2005). Cette hyperactivité des neurones thalamiques se traduit par une augmentation de leur activité spontanée, une augmentation de leurs réponses à un stimulus douloureux ou non douloureux en termes de fréquence de décharge et de post-décharges ainsi que par la présence de bouffées de potentiel d'actions. Les modifications d'activité thalamique semblent survenir très tôt dans le développement de la pathologie, puisque les études présentent des modifications dès le septième jour après la lésion (Gerke et al., 2003; Iwata et al., 2011). Certaines études ont également décelé une augmentation de l'expression de l'ARNm (10 jours après la chirurgie dans Zhao et al., 2006a) et de la protéine (28 jours après la chirurgie dans Hains et al., 2005) du canal sodique sensible au voltage 1.3 (Na_v 1.3). L'administration intrathécale d'un oligonucléotide antisens dirigé contre l'ARNm codant pour ce canal $Na_v1.3$ permet de retrouver, à la suite de stimulations évoquées, une activité neuronale similaire à celles d'animaux contrôles (Hains et al., 2005, 2006). Ceci suggère un rôle probable de ce canal dans l'hyperexcitabilité neuronale et permet de proposer l'existence d'une amplification thalamique additionnelle aux signaux ascendants. La conservation de l'augmentation de l'activité spontanée des neurones thalamiques après section totale de la moelle épinière thoracique dans des modèles de lésion de la moelle épinière (Hains et al., 2005)et de nerfs périphériques (Iwata et al., 2011) plaide aussi en faveur d'une amplification thalamique indépendante des stimuli afférents naissant en dessous de la section.

La majorité de ces études s'est focalisée sur le côté controlatéral par rapport à la lésion, puisqu'il reçoit la majorité des afférences issues de ce côté. Notons que certaines études sur des hémisections unilatérales de la moelle épinière thoracique montrent la présence de bouffées de potentiels d'action des neurones nociceptifs dans les noyaux VPL ipsi- et controlatéral à la lésion (Liang et Mendell, 2013).

Ainsi, la présence d'une hyperexcitabilité des neurones nociceptifs thalamiques est retrouvée de manière convergente à la fois chez les patients et dans les modèles animaux, ce qui en fait une première signature importante à l'étage thalamique de la douleur neuropathique.

B- Douleur neuropathique: une hypoperfusion/hypoactivité thalamique

Le développement des techniques d'imagerie fonctionnelle, a permis d'étudier l'activité neuronale dans différentes régions cérébrales à travers les modifications du flux sanguin cérébral. Ainsi, chez des sujets sains, une stimulation thermique douloureuse entraîne une augmentation du flux sanguin thalamique visualisée par tomographie par émission de positons (Casey et al., 1994, 1996; Coghill et al., 1994, 1999; Jones et al., 1991). On notera que les travaux de Casey et collaborateurs (1994 et 1996) ainsi que ceux de Coghill et collaborateurs (1999) rapportent une augmentation bilatérale du flux sanguin thalamique alors que les autres études ne la signalent que dans le thalamus controlatéral. Cette augmentation du flux sanguin reflète une augmentation de l'activité du thalamus. Par contre, en utilisant les mêmes techniques, le flux sanguin thalamique de patients atteints de douleurs neuropathiques (thalamus controlatéral à la lésion nerveuse) est significativement moins élevé que celui de sujets sains (lésions de nerfs : Hsieh et al., 1995; Iadarola et al., 1995; lésions des faisceaux spinothalamique et trigéminal : Cahana et al., 2004). Plus récemment, en utilisant des techniques d'imagerie par résonnance magnétique fonctionnelle (perfusion sans injection par marquage de spins, qASL) Gustin et collaborateurs (Gustin et al., 2014) ont retrouvé ces résultats dans un modèle de lésion de la moelle épinière mais ils ont aussi pu montrer que le flux sanguin thalamique de ces patients est significativement moins élevé que celui de sujets présentant les mêmes lésions nerveuses mais sans douleur chronique. Ainsi les symptômes douloureux semblent être corrélés avec l'hypoperfusion thalamique. Quand on supprime les symptômes douloureux par l'application d'analgésiques comme la lidocaïne, le flux sanguin thalamique retrouve des valeurs normales chez des patients atteints de douleurs neuropathiques centrales (Cahana et al., 2004). De même, les stimulations intrathalamiques (VPL/VPM ; Hosobuchi, 1986; Mazars et al., 1973, 1974, 1975)

ou du cortex moteur (gyrus précentral ; Tsubokawa et al., 1991a, 1991b; Katayama et al., 1998; Meyerson et al., 1993) connues pour soulager des douleurs neuropathiques entrainent une augmentation du flux sanguin thalamique (Duncan et al., 1998; García-Larrea et al., 1999; Peyron et al., 1995). L'hypoactivité thalamique pourrait donc aboutir au développement des symptômes douloureux neuropathiques soit en ne stimulant pas suffisamment les zones du tronc cérébral impliquées dans l'inhibition descendante des messages douloureux soit en envoyant des signaux aberrants au cortex qui seraient interprétés comme douloureux. Nous reviendrons ultérieurement sur ces points. On notera que les nouvelles techniques d'imagerie par résonance magnétique ont permis d'obtenir une résolution plus importante. Elles ont ainsi permis de montrer que l'hypoactivité thalamique concerne plus particulièrement le noyau réticulaire (Gustin et al., 2014; Henderson et al., 2013). Enfin, dans un syndrome douloureux régional complexe (reflex sympathetic dystrophy syndrome), il a été montré une hyperactivité thalamique précoce chez des patients présentant des symptômes douloureux depuis trois à sept mois, suivie d'une hypoactivité thalamique sur des patients douloureux depuis au moins deux ans (Fukumoto et al., 1999). L'activité thalamique varie donc en fonction de la durée de la pathologie. Au-delà de cette hypoperfusion thalamique, des études sur des patients présentant un syndrome thalamique ont montré qu'il existe aussi un hypométabolisme thalamique. En effet, par des approches de tomographie par émission de positons utilisant le [18F]-2-fluoro-2-désoxy-D-glucose comme traceur, une moindre utilisation du glucose a été observée dans le thalamus (Hirato et al., 1994; Laterre et al., 1988; De Salles et Bittar, 1994). Lors de neuropathies, l'hypoperfusion thalamique semble donc bien aller de pair avec une hypoactivité thalamique.

Les études sur les modèles animaux qui permettent de corroborer une hypoperfusion thalamique largement observée chez l'homme ne sont pas nombreuses. A ma connaissance, il n'existe que deux études d'imagerie de l'activité des noyaux thalamiques dans des modèles de douleur neuropathique chez le rat. La première étudie l'activité thalamique grâce à une

approche d'imagerie fonctionnelle par résonnance magnétique dans un modèle de lésion de la moelle épinière (Hofstetter et al., 2003). Le flux sanguin thalamique (et donc l'activité thalamique) en réponse à une stimulation électrique d'une patte arrière est diminuée 4 à 16 semaines après la lésion de la moelle épinière par rapport aux animaux intacts.

La seconde étude est un peu différente, puisqu'elle utilise un modèle animal de douleur neuropathique induite par la ligature partielle de nerfs périphériques (modèle SNI ; Hubbard et al., 2015). Là encore l'activité thalamique est étudiée par imagerie fonctionnelle par résonnance magnétique, mais cette fois ci, après l'application d'acétone sous la patte ligaturée. En effet, les rats SNI développent une hypersensibilité au froid. Cette étude montre que quatre semaines après la chirurgie, à la suite de l'application d'acétone, les rats SNI présentent une activité du noyau VPL controlatéral plus importante que celle obtenue chez les rats qui n'ont subi que la chirurgie et pas la ligature (rats sham) et une activité des noyaux VPL ipsilatéral et DM plus faible comparée à celle des rats sham. En revanche, vingt semaines après la chirurgie, seules subsistent les hypoactivités des noyaux VPL ipsilatéral et DM. Ainsi, à l'instar de l'étude de Fukumoto en 1999 sur les patients, il semble qu'il existe dans ce modèle de douleur neuropathique une séquence : hyperactivité thalamique précoce suivie d'une hypoactivité tardive. Enfin on notera que la substance grise périaqueducale présente aussi une hypoactivité chez les rats SNI comparés aux rats sham suggérant un déficit dans l'activation de cette zone connue pour exercer une action anti-nociceptive.

Dans ces deux modèles animaux différents les auteurs ont donc pu trouver des signes d'hypoactivité thalamique ou au moins de certains noyaux thalamiques spécifiques. Ces études mettent également en évidence l'importance du délai post-chirurgical pour l'étude du thalamus dans les modèles animaux de douleur neuropathique.

Ainsi, l'hypoperfusion / hypoactivité thalamique semble être la seconde signature caractérisant les événements thalamiques développés dans le cadre des douleurs neuropathiques.

Comment réconcilier la présence des deux signatures paradoxales de prime abord : une hyperexcitabilité des neurones thalamiques et une hypoactivité thalamique ?

C- Douleur neuropathique: une hyperexcitabilité neuronale et une hypoactivité thalamique

La signification fonctionnelle de ces deux signatures reste encore matière à discussion. Je vais donc proposer quelques pistes explicatives sans prétendre apporter une réponse définitive. Une vision globale peut partir du fait que la lésion nerveuse à l'origine de la douleur neuropathique va entraîner une déafférentation thalamique et donc une diminution des informations excitatrices afférentes au thalamus. Cette déafférentation conduit donc à une hyperpolarisation des neurones thalamiques. Or, les neurones thalamiques expriment des canaux calciques de type T qui sont dé-inactivés par une hyperpolarisation (Llinás et Jahnsen, 1982). Cette dé-inactivation conduit à la genèse de potentiels calciques à bas seuil associés à des bouffées de potentiels d'action à haute fréquence sur les neurones thalamiques (Llinás et Jahnsen, 1982). Les bouffées de potentiels d'actions retrouvées chez les patients neuropathiques semblent bien être générées sur des potentiels calciques à bas seuil (Jeanmonod et al., 1996; Lenz et al., 1989). Les bouffées de potentiel d'action thalamiques observées dans les neuropathies reflètent donc un état d'inhibition thalamique par hyperpolarisation. On peut donc obtenir une signature d'hypoperfusion/hypoactivité thalamique (état d'inhibition) en imagerie cérébrale fonctionnelle et une signature d'hyperexcitabilité thalamique (bouffées de potentiels d'action) par des techniques électrophysiologiques (Hirato et al., 1994). Ce premier phénomène permet d'initier l'hypoactivité thalamique. Comment est-elle alors maintenue ? Nous avons vu que les aires thalamiques et corticales sont richement interconnectées. Ainsi les bouffées thalamiques de potentiels d'action générées sur des potentiels calciques à bas seuil vont exercer une influence rythmique sur les boucles thalamocorticales dans une gamme de fréquence basse appelée fréquence θ (4-9Hz) (Llinás et al., 1999; Sarnthein, 2005; Sarnthein et Jeanmonod, 2008; Stern et al., 2006). Le couplage thalamocortical est alors entretenu par des boucles

thalamocorticothalamiques, corticoréticulothalamiques et thalamoréticulothalamiques. L'hyperpolarisation thalamique va donc être renforcée et va perdurer dans le temps. L'hypoactivité thalamique peut alors se maintenir de manière autonome ce qui pourrait signer le basculement vers l'état pathologique dans le cas de neuropathies. On voit donc que la douleur neuropathique est clairement associée à une altération du rythme thalamocortical.

Il reste cependant encore de nombreuses études à effectuer afin de mieux comprendre ce phénomène et surtout afin de savoir si l'hypoactivité thalamique ainsi que l'altération du rythme thalamocortical pourraient être des marqueurs prédictifs du développement d'une douleur chronique après une lésion nerveuse.

D- Douleur neuropathique : une atrophie thalamique

L'imagerie par résonnance magnétique morphologique avec analyse voxel à voxel a permis de mettre en évidence une diminution du volume du thalamus chez des patients atteints de dorsalgies suite à une lésion du nerf sciatique (Apkarian et al., 2004b) ou souffrant de neuropathies trigéminales (Gustin et al., 2011; Henderson et al., 2013) par rapport à des sujets sains. A l'heure actuelle il est difficile d'affirmer que cette atrophie thalamique soit spécifique des douleurs neuropathiques. En effet, dans le cas de névralgies trigéminées où le nerf trijumeau est comprimé par une artère (ou une veine) on peut selon les études retrouver une atrophie thalamique (Obermann et al., 2013), n'observer aucune modification du volume thalamique (Gustin et al., 2011) ou au contraire mesurer une augmentation du volume thalamique (Desouza et al., 2013) par rapport à des sujets sains.

En ce qui concerne les modèles animaux, il a été montré chez le singe par des approches histochimiques et stéréologiques que le volume du thalamus est diminué après section des racines C2-T4 (Jones and Pons, 1998; Woods et al., 2000). A ma connaissance, Il n'existe pas d'étude explorant le volume du thalamus ou de ses différents noyaux dans un modèle de douleur neuropathique chez le rat.

Parallèlement à cette diminution de volume thalamique, des études réalisées chez des patients ont montré la présence d'indices de moindre densité neuronale dans le thalamus de patients neuropathiques. En effet, la spectrométrie par résonance magnétique (spectrométrie IRM ; imagerie par résonance magnétique, IRM) permet de mesurer la concentration thalamique de N-acétylaspartate (NAA) et/ou le ratio NAA/créatine qui sont considérés comme des marqueurs de densité neuronale (Ebisu et al., 1994). Ainsi, toute diminution de NAA ou du ratio NAA/créatine dans une structure cérébrale sera interprétée comme le signe d'une perte neuronale. Ainsi, ce ratio diminue dans le thalamus ventro-postérieur de patients atteints de neuropathie trigéminale (Gustin et al., 2011). Par contre, il ne diminue pas dans le thalamus de patients qui présentent des troubles temporo-mandibulaires non neuropathiques (Gustin et al., 2011). Ainsi, la perte neuronale thalamique semble spécifique des douleurs neuropathiques. Ces résultats ont été retrouvés dans le cas de patients dont la moelle épinière a été lésée et qui ont développé des douleurs neuropathiques (Gustin et al., 2014; Pattany et al., 2002). L'augmentation de la résolution des techniques d'imagerie a par contre permis dans l'étude de Gustin et collaborateurs (2014) de montrer que chez les patients neuropathiques cette perte neuronale affecte le noyau thalamique réticulaire. De plus, comme le noyau réticulaire présente de nombreux neurones GABAergiques, ces résultats ont été confirmés par le fait qu'ils ont observé une diminution de la concentration de GABA dans le noyau réticulaire thalamique de patients neuropathiques par rapport à des patients non neuropathiques (Gustin et al., 2014). Cette diminution de la concentration de GABA dans le noyau réticulaire thalamique est aussi observée chez des patients souffrant de douleurs neuropathiques d'origine trigéminale (Henderson et al., 2013). La plupart des neurones du thalamus somatosensoriel présentent des collatérales vers les neurones GABAergiques du noyau réticulaire (pour revue voir Pinault, 2004). Ces neurones GABAergiques inhibent en retour les neurones thalamiques qui projettent sur le cortex. On parle de boucle thalamoréticulothalamique. Ainsi, une moindre inhibition de la part des neurones thalamiques réticulaires pourrait participer à l'altération du rythme thalamocortical qui est clairement associée à la douleur neuropathique, comme nous l'avons vu dans la partie

précédente. L'ensemble de ces études a questionné les variations d'activité et de viabilité des neurones thalamiques en conditions neuropathiques. Qu'en est-il de la glie thalamique ?

E- Douleur neuropathique : une réactivité gliale thalamique ?

Quelques études ont testé l'hypothèse d'une activation gliale cérébrale chez des patients souffrant de douleur chronique. Pour cela, la technologie de la tomographie par émission de positons a été combinée à celle de l'imagerie par résonnance magnétique et un ligand du récepteur périphérique aux benzodiazépines a été utilisé. Dans un premier temps, le ligand utilisé a été le [^{11}C]-(R)-PK11195 (Banati et al., 1997). Plus récemment, le [^{11}C]-PBR28 a été développé (Brown et al, 2007). Le [^{11}C]-(R)-PK11195 et le [^{11}C]-PBR28 se lient à une protéine appelée TSPO (« translocator protein of 18 kD» anciennement nommée récepteur périphérique aux benzodiazépines) qui, avec une autre protéine, permet notamment le transport du cholestérol du cytoplasme vers l'intérieur de la mitochondrie (Papadopoulos, 2004). Dans un modèle animal de SNL, la TSPO ou récepteur périphérique aux benzodiazépines est sur-exprimée dans les astrocytes et la microglie (Wei et al., 2013). Ainsi, dans les études par imagerie, toute augmentation de fixation d'un ligand de la protéine TSPO sera interprétée comme un signe d'une activation gliale. Dans une étude, les patients qui présentent des amputations, des lésions du plexus brachial ou des lésions vasculaire cérébrales depuis un à vingt ans présentent une augmentation de la liaison du PK11195 dans le thalamus controlatéral au membre lésé (ou bilatéralement si la lésion concerne les deux côtés ; Banati et al., 2001). Bien que l'activation gliale survienne majoritairement dans le thalamus controlatéral, les auteurs précisent qu'ils ont décelé une augmentation de la liaison du PK11195 dans le thalamus ipsilatéral chez deux patients de l'étude. Dans une seconde étude, les patients qui ont des douleurs lombaires chroniques depuis au moins deux ans présentent une augmentation bilatérale de la liaison du PBR28 dans le thalamus (Loggia et al., 2015). Dans cette étude, des mesures des taux sanguins de molécules pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-1β et le TNF-α ont été réalisées. L'étude montre qu'il existe une corrélation négative entre les taux thalamiques

de liaison du PBR28 et les taux d'IL-6 et d'IL-1β circulants. De plus, les patients ont répondu à des questionnaires sur leur douleur et les auteurs montrent là encore une corrélation négative entre les taux de thalamiques de liaison du PBR28 et l'intensité de la douleur. Ils proposent que la protéine TSPO thalamique ait un effet anti-nociceptif et anti-inflammatoire. L'ensemble de ces études suggèrent donc que les patients neuropathiques présentent une activation gliale thalamique, cette activation aurait des effets bénéfiques puisqu'elle serait anti-inflammatoire et anti-nociceptive.

Dans les modèles animaux de douleur neuropathique, les études de la glie thalamique peuvent être beaucoup plus fines. On peut directement étudier la morphologie gliale, l'expression de marqueurs gliaux et la libération de molécules notamment pro- et anti-inflammatoires par ces cellules gliales. Jusqu'à présent, assez peu d'études se sont intéressées à la glie thalamique dans des modèles animaux de douleur neuropathique. Dans un modèle de lésion de la moelle épinière (SCI), il a été montré que la surface occupée par le marquage microglial CD11b/c est augmentée spécifiquement dans le noyau VPL controlatéral quatorze jours et jusqu'à 28 jours après la lésion (Zhao et al., 2007). Cette étude présente de plus l'existence d'une corrélation positive entre la surface occupée par le marquage CD11b/c et l'intensité de la douleur chez les animaux lésés. Les auteurs illustrent aussi des modifications morphologiques de la microglie, passant de ramifiée à amiboïde chez les animaux lésés. Enfin, l'administration bilatérale de minocycline dans les noyaux VPL permet de reverser la réactivité microgliale au 28ème jour et d'obtenir transitoirement des seuils nociceptifs proches des valeurs contrôles. Les auteurs ont même pu déterminer le signal qui entraîne la réactivité microgliale thalamique après lésion de la moelle épinière. En effet, ils ont montré par diverses approches que, suite à la lésion spinale, les taux de la chémokine CCL21 augmentent dans le thalamus ce qui entraîne la réactivité microgliale et les comportements douloureux. La mise en évidence d'une réactivité microgliale chez des animaux SCI a été retrouvée en utilisant Iba-1 comme marqueur microglial et a été étendue à d'autres noyaux thalamiques. Ainsi, le nombre de cellules Iba-1 positives et l'intensité du marquage Iba-1

sont augmentés dans le VPL et Po d'animaux ayant subi une lésion de la moelle épinière 7 jours ou 8 semaines auparavant (Wu et al., 2013). On notera que dans cette étude une augmentation de l'intensité du marquage Iba-1 est aussi observée dans le VPM au bout de 8 semaines et qu'aucune modification n'est observée dans le CL. Enfin, Saghaei et collaborateurs ont montré une augmentation de l'expression de la protéine Iba-1 par western blot dans le thalamus ipsilatéral et controlatéral ainsi qu'une augmentation de l'intensité du marquage Iba-1 dans le VPL ipsilatéral et controlatéral 28 jours après une lésion de la moelle épinière (Saghaei et al., 2013). L'ensemble de ces études s'accorde donc pour dire qu'il existe une réactivité microgliale mais aucun signe de réactivité astrocytaire dans le VPL après lésion de la moelle épinière.

Ces résultats ont été retrouvés dans des modèles de lésion de nerfs périphériques. Dans un modèle de transsection du nerf sciatique, une augmentation de l'intensité du marquage Iba-1 a été observée dans le VPL ipsilatéral et controlatéral deux semaines après la lésion (Mòdol et al., 2014). Dans un modèle CCI, l'intensité du marquage CD11b/c dans le VPL controlatéral est plus importante que dans le VPL ipsilatéral sept jours après la lésion (LeBlanc et al., 2011). L'injection de minocycline dans le VPL d'animaux CCI supprime la réactivité microgliale et abolit de manière transitoire l'hyperalgésie thermique. Enfin, la microglie semble bien activée puisque le nombre de cellules Iba-1 et P-p38 positives est augmentée dans le VPL des animaux CCI. En effet, la voie des p38 MAP kinases est une voie intracellulaire mise en jeu lors de l'activation de la microglie (voir Fig. 18). On notera que dans cette étude aucun signe d'astrogliose n'a été détecté. Enfin, dans un modèle SNI, aucune variation de surface occupée par le marquage Iba-1 ainsi que GFAP n'a été trouvée dans le thalamus central (Marcello et al., 2013). Par contre l'intensité du marquage GLT-1 et GLAST est augmentée dans le thalamus central des animaux SNI. Les auteurs concluent alors que le thalamus central présente un phénotype partiel de réactivité gliale suite à une lésion d'un nerf périphérique.

En conclusion, que la lésion concerne la moelle épinière ou un nerf périphérique chez le rat, elle entraîne toujours une réactivité microgliale dans le VPL sans aucun signe de réactivité

astrocytaire. Cette réactivité microgliale serait pro-nociceptive puisque, quand on l'empêche, les seuils douloureux reviennent à des valeurs contrôle même si cet effet n'est que transitoire. On notera qu'aucune étude n'a exploré le phénotype glial dans le thalamus d'animaux SNL.

Il semble donc que des preuves de réactivité gliale thalamique existent à la fois chez des patients neuropathiques et ce même plus de vingt ans après la lésion, et dans les modèles animaux de douleurs neuropathiques où il semble que la microglie soit la cellule gliale la plus impliquée…

Ainsi, à l'instar de la moelle épinière, le thalamus présente de profonds remaniements en condition de douleurs neuropathiques. Les études semblent toutes convenir de la présence d'une hyperexcitabilité des neurones thalamiques, d'une hypoactivité et d'une diminution du volume thalamique. Une réactivité gliale/microgliale semble également survenir dans ces conditions. Le nombre d'études réalisées chez le rat est assez faible et le délai post-chirurgical et le type de lésion semblent modifier les résultats obtenus. Il parait donc nécessaire de mieux caractériser la glie thalamique en condition de douleurs neuropathiques.

VIII- Hypothèse de travail et objectifs du travail de thèse

A- Hypothèse de travail

Comme il n'existe actuellement aucun traitement permettant d'abolir définitivement les douleurs neuropathiques chez les patients qui en souffrent, il est nécessaire de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques cellulaires et/ou moléculaires. Ces dernières années, de nombreuses études ont suggéré que les cellules gliales spinales, astrocytes et microglie, pourraient contribuer au développement et au maintien de la douleur neuropathique au niveau de la première zone de traitement de l'information douloureuse, la moelle épinière. Ces cellules gliales spinales présentent une réactivité importante et si on empêche cette réactivité les symptômes douloureux sont diminués. Ces cellules gliales ainsi que les nombreuses molécules qu'elles libèrent constituent donc des cibles cellulaires et moléculaires thérapeutiques potentielles. Nous l'avons vu, le thalamus est une structure clef dans l'intégration de l'information nociceptive aussi bien pour sa composante sensori-discriminative qu'émotionnelle. De manière surprenante, très peu d'études ont questionné le rôle possible des cellules gliales thalamiques dans le développement et le maintien des douleurs neuropathiques. En pré-requis à ces futures études de causalité, il m'a paru très important de caractériser le plus précisément possible le phénotype des astrocytes et des cellules microgliales dans différents noyaux thalamiques impliqués dans l'intégration de l'information nociceptive et de suivre l'évolution de ce phénotype au cours du développement des symptômes douloureux dans un modèle de douleur neuropathique.

B- Objectifs du travail de thèse

Le modèle choisi pour cette étude est le modèle SNL de ligature des nerfs spinaux L5/L6 chez le rat, modèle animal où la glie thalamique n'a encore jamais été étudiée.

Comme je souhaitais suivre l'évolution du phénotype glial en conditions neuropathiques, j'ai étudié ce phénotype à deux temps après la chirurgie : 14 jours après la chirurgie (J14) et 28 jours après la chirurgie (J28). Enfin, comme je souhaitais tester l'hypothèse d'une relation entre des variations de phénotype glial thalamique et les symptômes douloureux, j'ai quantifié les comportements douloureux. Cela a été réalisé via des tests de douleur évoquée (stimulation mécanique statique) et via un test de distribution pondérale dynamique. Ceci m'a permis de rechercher de possibles corrélations entre symptômes douloureux et variations du phénotype glial. La caractérisation phénotypique des astrocytes et des cellules microgliales a été réalisée par des approches moléculaires et immunohistochimiques.

Dans un premier temps, j'ai étudié l'expression de l'ARNm de marqueurs structuraux et fonctionnels gliaux par une approche de PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR). Tout d'abord, cette approche de qRT-PCR a été réalisée sur des prélèvements de tissus thalamiques contenant à la fois les noyaux thalamiques d'intérêt mais inévitablement d'autres structures adjacentes. Cette première approche permet d'étudier les modifications globales de l'expression de l'ARNm d'un grand nombre de marqueurs gliaux et notamment des marqueurs de réactivité gliale (voir partie I de l'introduction). Il s'agit de marqueurs structuraux, de récepteurs membranaires, de transporteurs membranaires, de molécules activatrices des cellules gliales, d'éléments de cascades intracellulaires mise en jeu lors de l'activation gliale, d'enzymes clés du métabolisme glial, de molécules de signalisation libérées par les cellules gliales activées etc. Cette étude a été réalisée sur des tissus thalamiques latéraux et centraux. Par la suite, l'étude de qRT-PCR a été réalisée sur des tissus de noyaux thalamiques spécifiques obtenus par microdissection laser. Cette seconde approche permet de confirmer ou d'infirmer au niveau d'un noyau thalamique précis (donc sans contamination tissulaire) les variations d'expression

trouvées au niveau d'une zone thalamique plus large. Le nombre de marqueurs que l'on peut tester dans cette approche spécifique est bien moindre. Des choix ont donc dû être faits.

Dans un second temps, j'ai réalisé une approche d'immunohistofluorescence en utilisant les marqueurs astrocytaires GFAP et S100β et microgliaux CD11b/c, Iba-1 et CTSS. J'ai ainsi quantifié la surface occupée par les différents immunomarquages ainsi que le nombre de cellules immunomarquées dans les différents noyaux thalamiques impliqués dans l'intégration de la nociception. Après la présentation des matériels et méthodes utilisés dans cette étude, les résultats de mon travail de thèse seront présentés puis discutés. A la fin de ce manuscrit, vous trouverez les articles auxquels j'ai contribués.

MATERIEL ET METHODES

I- Animaux et conditions d'hébergement

Tous les protocoles de ce travail de thèse ont été acceptés par le comité d'éthique de Bordeaux sous le numéro de saisine 5012039-A. Toutes les expériences ont été élaborées de manière à minimiser le nombre d'animaux utilisés lors de cette étude. J'ai ainsi utilisé 167 animaux pour les expériences d'immunofluorescence et de qRT-PCR présentées dans ce manuscrit, 30 animaux pour la mise au point des techniques et les expériences pilotes et enfin 48 animaux pour les expériences de quantification du volume du noyau VPL que je n'ai pas eu le temps de terminer et qui ne sont donc pas présentées dans le manuscrit.

Les animaux utilisés sont des rats mâles de souche Wistar, souche non consanguine, provenant de l'élevage français Janvier. Leur poids à la livraison est compris entre 150g et 175g, les rats sont alors âgés de 5 à 6 semaines. Les animaux sont hébergés depuis leur arrivée jusqu'à leur euthanasie au sein d'une animalerie agréée. L'état de santé des animaux est contrôlé rigoureusement et régulièrement via le suivi de leur prise de poids, leur aspect général et les manipulations de l'expérimentateur. Leurs conditions d'hébergement répondent à plusieurs critères stricts : un cycle nycthéméral de 24h réparti en 12h de jour et 12h de nuit, une température maintenue constante à 22°C ainsi que la présence d'eau et de nourriture *ad libitum*. Des contrôles réguliers sont réalisés au sein de l'animalerie afin de s'assurer du maintien des conditions sanitaires adéquates. Pendant la majeure partie de l'expérimentation, les rats sont hébergés en cages collectives (L34xl21xH19 cm) deux par deux. Il est à noter qu'au début de mon travail de thèse l'hébergement réglementaire était de trois individus par cage. Tous les animaux sans exception sont placés en cage individuelle pendant les 48 heures qui suivent la chirurgie puis retournent en cage collective avec leur même partenaire de cage.

A leur arrivée, les animaux sont laissés à l'animalerie pendant 4 jours sans expérimentation afin de favoriser leur acclimatation. A partir de là et pendant 3 jours, les animaux sont pesés puis

placés tour à tour dans la cage de von Frey (voir figure 21, A) pendant 10 minutes afin de les habituer à l'environnement expérimental du test comportemental des filaments de von Frey ainsi qu'à la présence et aux manipulations de l'expérimentateur. Toutes les expérimentations ont été réalisées en phase diurne, entre 7h et 19h : les habituations l'après-midi et les tests comportementaux le matin.

II- Etablissement du modèle de douleur neuropathique: ligature des nerfs spinaux L5 et L6 (SNL)

Le modèle animal utilisé dans ce travail est le modèle de ligature des nerfs spinaux L5-L6, le modèle SNL initialement mis au point par Kim et Chung en 1992. Il existe trois groupes expérimentaux : les animaux SNL qui subissent la chirurgie de ligatures, des animaux sham qui subissent la chirurgie sans les ligatures et les animaux naïfs qui ne sont pas opérés. L'attribution d'un groupe expérimental à un animal donné est faite au hasard et définie juste avant la cession de chirurgie et après les tests comportementaux contrôles (J0). Le jour de la chirurgie est appelé J0, puis les jours postopératoires sont nommés comme suit : J1, J2, […], J14, […], J21, […], J28.

A- La chirurgie de ligature des branches spinales L5-L6 du nerf sciatique

La salle de chirurgie est préparée à l'avance pour que l'opération se déroule dans les meilleures conditions : la table est désinfectée, les outils sont nettoyés, tout le matériel nécessaire est placé à disposition pour limiter au mieux la durée de la chirurgie et de l'anesthésie pour le rat. Une cage de réveil est préparée. L'animal est placé dans la chambre d'induction de l'anesthésie, où un mélange gazeux d'air et d'oxygène (ratio 1:1, 1L/minute) contenant 5% d'isoflurane (IsoFlo®, Axience, Pantin, France) est alors diffusé. Lorsque l'animal est endormi, il est placé sur la table de chirurgie dotée d'une couverture chauffante et un masque d'anesthésie lui distille un mélange gazeux d'air et d'oxygène (ratio 1:1, 0,5L/minute) contenant 2% d'isoflurane. Un gel protecteur est déposé sur les yeux de l'animal (Lacrigel, Laboratoires Europhta, Monaco). Après avoir vérifié la profondeur de l'anesthésie (fort pincement d'une patte), la peau du dos est rasée, une compresse d'alcool puis une de bétadine sont passées sur la zone à opérer. 100µL de lidocaïne

(Lurocaïne® à 20mg/mL, Vétoquinol N.-A. Incorporation, Lavaltrie, Canada) sont injectés en sous cutané pour réaliser une anesthésie locale de la zone qui va être incisée. L'incision est réalisée au niveau de la colonne vertébrale au scalpel puis les plans musculaires sont incisés de part et d'autre à l'aide de ciseaux fins. Un écarteur est positionné pour laisser le champ opératoire ouvert et accessible durant toute la durée de la chirurgie. Le processus latéral droit de la vertèbre L6 est sectionné et retiré après avoir écarté les fibres musculaires (Fig. 19). Les nerfs spinaux lombaires droits L5 et L6 sont isolés puis ligaturés tour à tour à l'aide d'un fil 6.0 en polyamide (Ethicon). Un crochet en verre est utilisé pour amener délicatement le nerf L6 dans une position où il pourra être ligaturé puisqu'il chemine sous le sacrum (Fig. 19). Après avoir rincé la zone opérée et vérifié que l'hémostase est totale, l'incision est refermée d'abord sur le plan musculaire avec des fils 4.0 en nylon (Ethicon) puis sur le plan cutané avec des agrafes métalliques (AMS, Bordeaux, France). De nouveau, 100µL de lidocaïne sont injectés en sous cutané dans la zone opérée et 100µL d'une solution de Borgal® à 7,5% est également injectée en intramusculaire à l'arrière de la cuisse gauche de l'animal (Borgal® solution injectable à 24%, Virbac, Carros, France). L'anesthésie est arrêtée, l'animal placé dans sa cage de réveil jusqu'à récupération totale du comportement vigile.

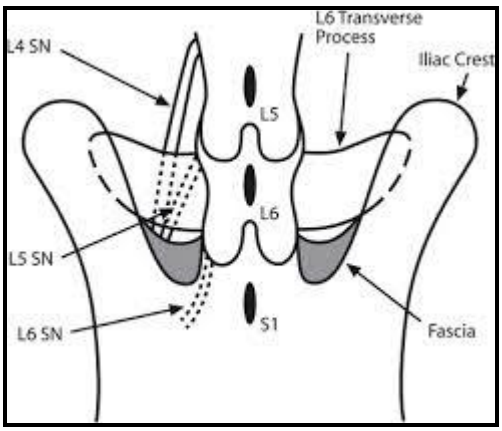


Figure 19: Schéma anatomique de la zone opérée chez le rat. Le processus transverse de la vertèbre L6 (L6 transverse process) est sectionné et retiré puis les nerfs spinaux droits L5 et L6 (L5 SN et L6 SN) sont isolés puis ligaturés. Iliac crest = crête iliaque.

La chirurgie est réalisée du côté droit de l'animal, et dans ce manuscrit toutes les structures situées de ce côté seront nommées ipsilatérales et les structures situées du côté opposé nommées controlatérales.

B- Suivi post-chirurgical

Pour permettre au mieux une diminution des douleurs post-chirurgicales, une analgésie est réalisée par l'injection sous cutanée (au niveau de la nuque) de kétofen 1%® (125µL par animal ; Merial, Lyon, France) à J1 et J2 après la chirurgie. Afin d'assurer les meilleures conditions expérimentales possibles, une fiche de suivi post-chirurgical pour J1 et J2 a été mise en place pour les animaux opérés (Fig. 20). Cette fiche permet d'évaluer s'il existe une altération de l'état général, une complication de la chirurgie (par exemple trouble moteur majeur, complication infectieuse) ou encore des douleurs excessives (signes généraux, vocalisations spontanées ou lors de la manipulation, perte totale de l'appui de la patte atteinte). Si le score obtenu sur la fiche est supérieur à 9, ou si l'animal présente soit une perte de poids supérieure à 20%, une automutilation, des vocalisations spontanées ou la perte totale de l'appui de la patte arrière, l'animal doit être immédiatement euthanasié. Aucun des animaux utilisés pendant la totalité de ma thèse n'a dû être euthanasié pour de telles raisons liées à la chirurgie. A J2, les rats sont remis en cage collective. Les agrafes sont retirées à J7 sous une brève anesthésie à l'isoflurane.

Indice		Variable	Note
Indice comportemental		**Apparence Physique**	
	0	Normale	
	1	Aspect mal entretenu	
	2	Poils ternes, écoulement nasal/oculaire	
	3	Poils ébouriffés, posture anormale, pupilles dilatées	
		Marche sur un plan horizontal	
	0	Normal	
	1	Déporte légèrement le poids de son corps sur la patte arrière non lésée	
	2	Boite de manière importante	
	3	N'utilise plus sa patte arrière lésée	
		Comportement non provoqué	
	0	Normal	
	1	Locomotion prudente	
	2	Vivacité réduite, inactif	
	3	Vocalisations non sollicitées, automutilations, très agité ou immobile	
		Réponses comportementales aux stimuli	
	0	Normales	
	1	Réaction de défense exagérée à la préhension	
	2	Douleur à la palpation (pression entre pouce et index de la voute plantaire de la patte lésée)	
	3	Réactions violentes ou absence de réactions	
Indice physiologique		**Changements de poids corporel**	
	0	Normal	
	1	perte de poids <10%	
	2	10% ≤ perte de poids < 20%	
	3	perte de poids ≥ 20%	
		Signes cliniques objectifs	
	0	Respiration normale	
	1	Ecoulement oculo-nasal et respiration normale	
	2	Respiration anormale par intermittence lors de l'observation	
	3	Respiration anormale en permanence lors de l'observation	
		SCORE TOTAL	

Figure 20: Fiche de suivi post-chirurgical utilisé à J1 et J2.

III- Etude du comportement douloureux

J'ai réalisé l'ensemble des études comportementales. Il y a donc eu un seul et même expérimentateur féminin. Les tests ont tous été réalisés dans une salle de comportement isolée acoustiquement du reste du laboratoire, avec une température maintenue à 22°C et une ventilation permanente. L'ordre de passage des animaux a été conservé d'un jour de test comportemental à l'autre. Les animaux de cette étude ont été sacrifiés à deux temps différents post-chirurgie : J14 et J28. Ainsi, tous les animaux ont été testés à J0 et J14 et seuls ceux des groupes J28 ont été testés à J21 et J28. Les sacrifices ont lieu après les tests comportementaux.

A- Test des filaments de von Frey

Le test des filaments de von Frey permet de tester la sensibilité mécanique par l'application de 18 filaments de force croissante dont l'application développe une force allant de 0,008g à 100g (Bioseb, France; Fig. 21, B). L'évolution du comportement douloureux et notamment le développement et le maintien d'une allodynie et d'une hyperalgésie mécanique statique peut alors être suivie.

A.1- Approche expérimentale

L'animal est placé dans une enceinte en acrylique surélevée au sol grillagé (L32xl22xH34 cm ; Fig. 21, A). Après 10 minutes d'habituation, l'expérience débute. Le test consiste en l'application des filaments sur la face plantaire des pattes arrière de l'animal (Fig. 21, C), lorsque celui-ci est calme et immobile. Chaque filament est appliqué 5 fois avec au moins 5 secondes d'intervalle. La réponse de l'animal à chaque stimulation est quantifiée selon la règle suivante, basée sur celle de l'étude de Vos et ses collaborateurs en 1994 : 0, absence de réponse à l'application du filament; 1, détection de l'animal signalée par la contraction légère de la patte sans mouvement réel ; 2, contraction des muscles avec retrait de la patte stimulée ; 3, fuite ou attaque du filament ; 4, toilettage asymétrique dirigé vers la région stimulée. Seuls les scores 2, 3 et 4 correspondent à une réponse comportementale douloureuse.

Les filaments sont appliqués de manière croissante et chaque score rapporté manuellement sur une grille portant le numéro de l'animal et la date. Les conditions expérimentales de chaque animal ne sont écrites ni sur les étiquettes des cages, ni sur les grilles de score. A l'exception des naïfs où l'absence de cicatrice est visible, les tests comportementaux sont donc effectués en aveugle entre les animaux SNL et sham.

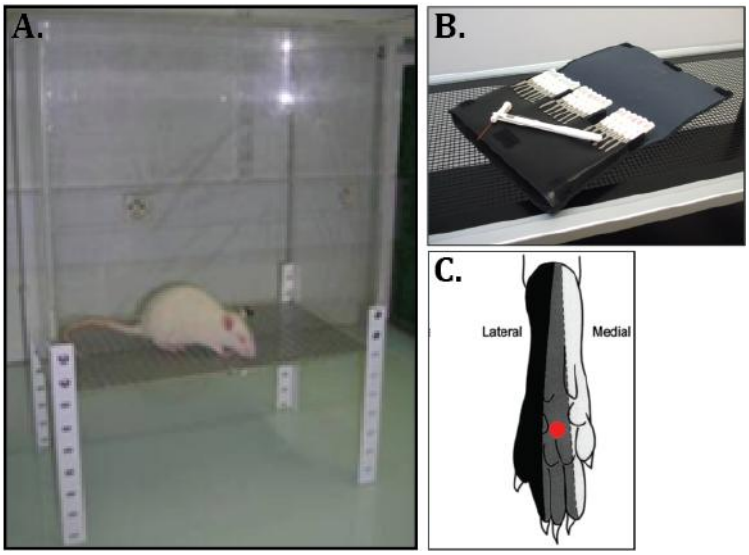


Figure 21: Test comportemental des filaments de von Frey. Le rat est placé dans une enceinte en acrylique surélevée au sol grillagé (A). Après 10 minutes d'acclimatation, les filaments de von Frey (B) sont appliqués cinq fois chacun sur la face plantaire (rond rouge en C) des deux pattes arrière de l'animal lorsque l'animal est calme et immobile. Les filaments sont appliqués de manière croissante avec au minimum 5 secondes d'intervalle entre chaque application.

A.2- Méthode de quantification des scores douloureux

J'ai développé au cours de ma thèse, avec l'aide de mon mari, un outil informatique permettant de quantifier rapidement les réponses obtenues au test des filaments de von Frey en extrayant deux données importantes. En effet, usuellement, le test des filaments de von Frey sert à objectiver le symptôme d'allodynie mécanique. Cette nouvelle méthode permet de quantifier l'allodynie mécanique de manière plus précise mais aussi l'hyperalgésie mécanique. Ainsi, les données obtenues permettent d'objectiver les symptômes d'allodynie et d'hyperalgésie mécaniques de manière simultanée et plus précise. J'ai appliqué l'outil informatique développé à l'ensemble des données comportementales d'un doctorant de mon équipe de recherche. Les résultats ont été publiés dans Pain en 2014 (voir l'article fourni dans l'annexe présentant mes publications), validant ainsi cette nouvelle méthode.

Les animaux sont testés à J0 avant la chirurgie, puis à J14, et également à J21 et J28 en fonction des lots. Chaque filament est appliqué 5 fois et on calcule la moyenne des 5 scores obtenus pour chaque filament. Donc, pour obtenir une réponse douloureuse à plus de 50% des applications, il faut obtenir au minimum un patron de réponse aux 5 stimulations {2, 2, 2, 0, 0} puisque cela

n'est qu'à partir du score 2 que l'on a une réponse comportementale douloureuse. La moyenne de ces 5 applications conduit à un score moyen de 1,2. Comme vous pouvez le voir sur la figure 22, 1,2 est donc défini comme le score nociceptif minimal. En deçà de ce score, le comportement n'est pas considéré comme douloureux. A l'inverse, au-delà de ce score, le comportement est considéré comme douloureux. Les scores obtenus sont rentrés dans des tableaux sous le logiciel Excel, et une macro calcule plusieurs paramètres. Tout d'abord il calcule le seuil nociceptif pour chacun des jours de test : J0, J14, J21 et J28 (en fonction des lots). Le seuil nociceptif correspond à la valeur en gramme nécessaire pour induire le score nociceptif minimal. Il est déterminé par simple approximation linéaire. Sur la figure 22 la valeur du seuil nociceptif se lit à l'extrémité de la flèche bleue pour J0 et rouge pour J14. On peut donc déterminer un seuil nociceptif pour la patte arrière ipsilatérale et controlatérale pour chaque animal et chaque jour. Les autres valeurs extraites ne seront calculées que pour J14, J21 et J28 car elles prennent pour référence J0. Ainsi, l'aire sous la courbe s'étendant du seuil nociceptif au jour étudié (sur la Fig. 22, J14) jusqu'au seuil nociceptif à J0 et bien sûr au-dessus du score nociceptif minimal donnera le score d'allodynie (zone hachurée sur la fig. 22). Pour chaque jour étudié, ce score d'allodynie permet de quantifier les réponses douloureuses obtenues pour des stimulations qui n'étaient pas douloureuses à J0 pour le même animal. La différence entre l'aire sous la courbe obtenue à J0 et celle obtenue au jour étudié, les aires n'étant mesurées qu'à partir du seuil nociceptif à J0 et au-dessus du score nociceptif minimal, donnera le score d'hyperalgésie (zone en rose sur la Fig. 22). Pour chaque jour étudié, ce score d'hyperalgésie permet de quantifier les réponses douloureuses plus importantes obtenues pour des stimulations déjà douloureuses à J0 pour le même animal. Ces deux scores sont calculés mathématiquement par la macro sous le logiciel Excel. J'ai donc déterminé un score d'allodynie et un score d'hyperalgésie pour la patte arrière ipsilatérale et controlatérale de chaque animal à J14, J21 et J28 selon les lots.

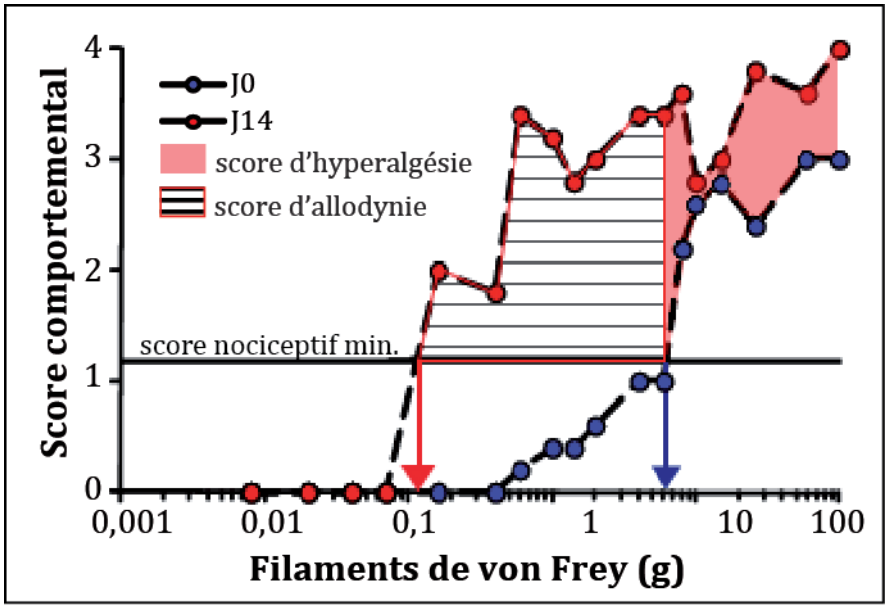


Figure 22: Illustration de la méthode de quantification des scores d'allodynie et d'hyperalgésie sur un exemple de réponses comportementales obtenues pour la patte arrière ipsilatérale d'un animal SNL à J0 et J14. Le graphique représente les réponses comportementales moyennes obtenues pour chaque filament de von Frey. Le score nociceptif minimal (score nociceptif min.) est un élément défini au préalable et fixe, il correspond à un score comportemental moyen de 1,2 et définit la frontière entre un comportement non douloureux et un comportement douloureux. La courbe bleue présente les résultats obtenus à J0 avant la chirurgie et en rouge à J14 après la chirurgie. Les flèches bleu et rouge indiquent les seuils nociceptifs à J0 et J14 respectivement. L'aire hachurée représente le score d'allodynie et l'aire rose celle d'hyperalgésie.

B- Test de distribution pondérale dynamique

Le test de distribution pondérale dynamique permet d'objectiver les douleurs ambulatoires ou le niveau d'inconfort des animaux.

B.1- Approche expérimentale

Ce test est développé par l'entreprise française Bioseb sous le nom de Dynamic Weight Bearing (DWB). Le test consiste à placer le rat dans une cage en plexiglas transparent (L24xl24xH32 cm) avec un sol surmonté d'un tapis doté de 1936 capteurs piezzo électriques et relié à un ordinateur contenant le logiciel DWB de Bioseb (version 1.4.2.98) (Fig. 23). Le seuil de détection d'une patte a été défini au préalable (et est resté inchangé ensuite) et correspond à au moins 4g de charge. Il faut également qu'au moins trois capteurs adjacents détectent un poids d'au moins 1g. De plus, il faut que le poids enregistré soit stable pendant au moins 0,8 seconde. Le logiciel

enregistre ainsi des séquences (analysables ou non). Pendant les 5 minutes qui constituent le test, l'animal peut se déplacer librement dans cette cage qu'il ne connait pas pendant qu'une caméra enregistre ses déplacements. L'absence d'habituation à cette cage permet au rat d'adopter un comportement d'exploration plus intense. Tout au long des 5 minutes, les données détectées par les capteurs sont envoyées au logiciel DWB. A la fin de l'expérience, le rat est replacé dans sa cage.

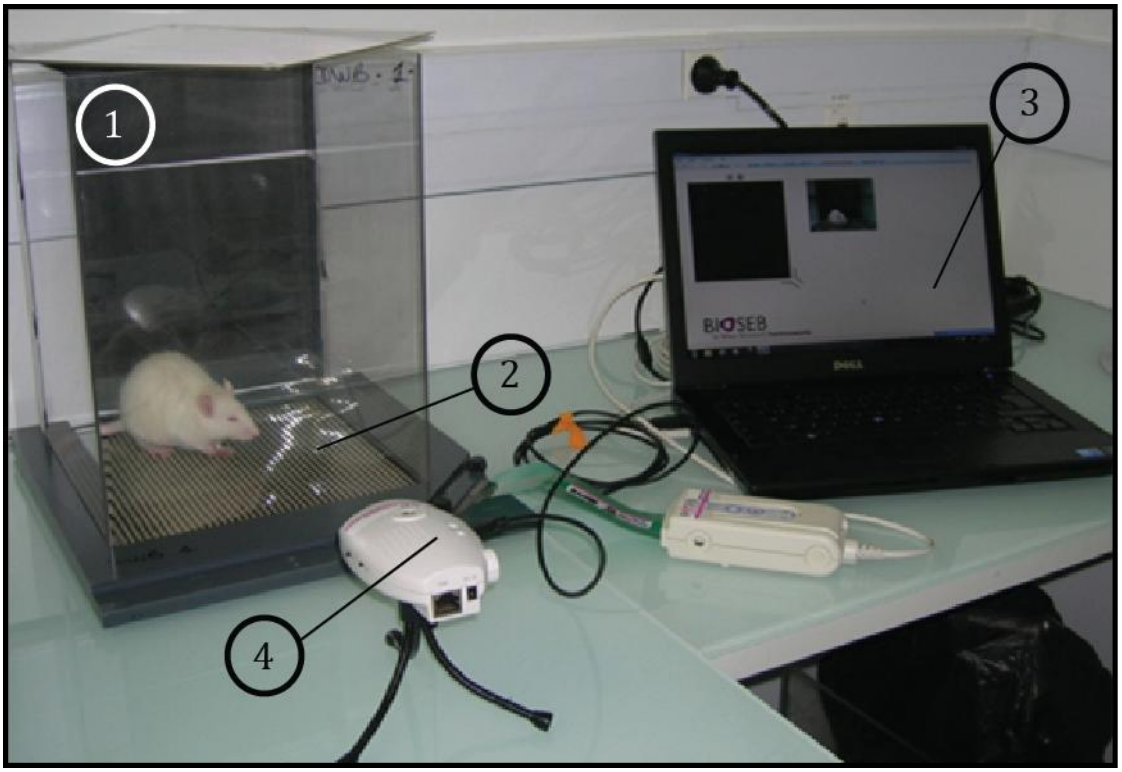


Figure 23: Test comportemental de distribution pondérale dynamique, le Dynamic Weight Bearing. L'animal est placé dans une cage en plexiglas (1) où il est libre de ses mouvements. Le sol de la cage est constitué d'un tapis doté de capteurs piezzo électriques (2) et relié à un ordinateur contenant le logiciel DWB de Bioseb (3). Lors des 5 minutes qui constituent le test, le système tapis/ordinateur enregistre le poids porté par toutes les pattes de l'animal pendant qu'une caméra filme ses déplacements (4).

B.2- Méthode de quantification

L'expérimentateur peut ensuite analyser *a posteriori* les séquences enregistrées (Fig. 24). Il identifie chacune des quatre pattes de l'animal tout au long de la séquence en s'aidant de la vidéo enregistrée par la caméra. Il peut aussi valider l'identification automatique réalisée par le logiciel si celle-ci est correcte. La validation terminée, le logiciel calcule la valeur moyenne du

poids porté par chacune des pattes de l'animal ainsi que la surface d'appui sur chacune des pattes. Les résultats du poids porté sont exprimés en pourcentage du poids de l'animal pour pouvoir comparer les données entre les animaux et les conditions.

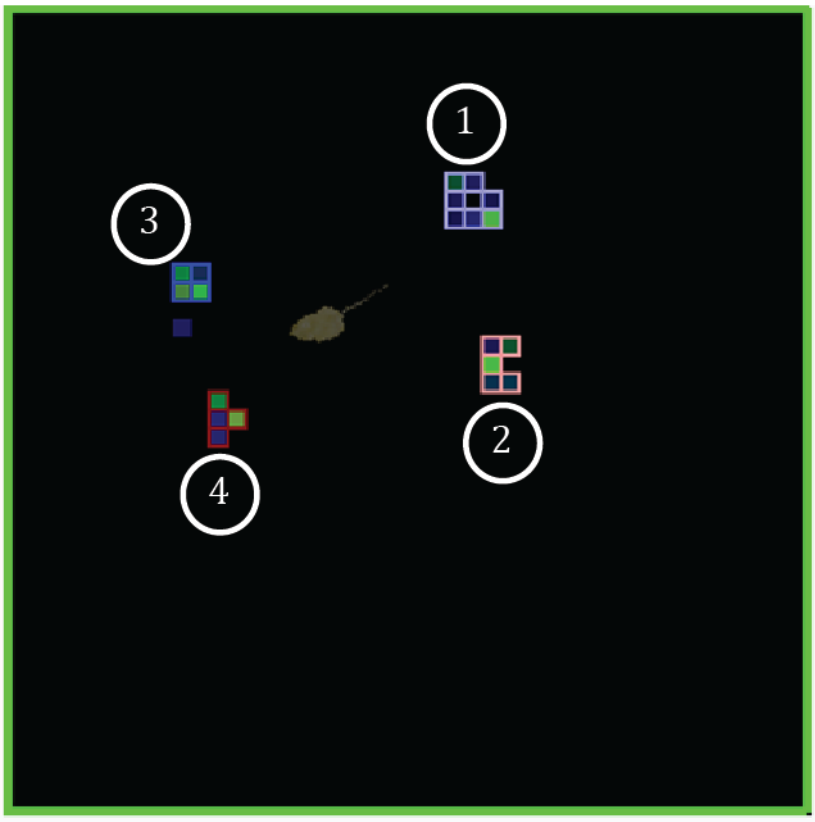


Figure 24: Exemple de l'interface utilisateur permettant d'analyser les résultats du test de DWB. Cette fenêtre du logiciel DWB présente l'animal au centre avec ses quatre pattes : arrière droite (1) et gauche (2), avant droite (3) et gauche (4). L'utilisateur positionne l'animal de la même manière que sur la fenêtre vidéo filmée par la caméra lors du test pour que chaque patte soit à sa place sur chaque séquence. Le test comportemental du DWB est ainsi analysé séquence par séquence. Et le logiciel peut ensuite calculer la valeur moyenne de la masse portée par chacune des pattes de l'animal ainsi que la surface d'appui sur chacune des pattes.

IV- Euthanasie des animaux et prélèvement des tissus cérébraux

Deux méthodes d'euthanasie ont été utilisées dans cette étude : soit par décapitation pour permettre un prélèvement rapide et une étude des ARNm par qRT-PCR, soit par surdosage de pentobarbital suivi d'une perfusion intracardiaque de fixateur pour un prélèvement de tissus en vue de leur utilisation en histochimie et immunohistofluorescence.

A- Euthanasie par décapitation

Pour permettre une qualité optimale des tissus prélevés, l'ensemble des instruments nécessaires ainsi que la paillasse ont été minutieusement nettoyés, passés au spray RNAase free et agencés de manière optimale afin d'éviter au maximum la dégradation des ARN par contamination d'ARNases et/ou une perte de temps lors du prélèvement. Le protocole est bien sûr réalisé avec des gants. Cette opération de nettoyage et spray RNAase free a été réalisée entre chaque animal afin là encore d'éviter toute dégradation De même, les tubes permettant de recueillir les tissus ont été préalablement autoclavés et annotés. Les tubes sont tous placés juste avant le début des prélèvements dans de la carboglace.

Le rat est placé dans la chambre d'induction de l'anesthésie, où un mélange gazeux d'air et d'oxygène (ratio 1 :1, 1L/minute) contenant 5% d'isoflurane est diffusé. Une fois le rat endormi profondément, il est décapité à l'aide d'une guillotine à rat. Là, deux modes de prélèvements différents sont utilisés : un prélèvement de tissus thalamiques ou la congélation du cerveau entier pour effectuer ensuite l'approche de microdissection laser.

A.1- Prélèvement de tissus thalamiques

Le cerveau est prélevé rapidement de la boîte crânienne et placé dans un support adapté au cerveau de rat. Là, une tranche coronale de cerveau d'environ 3 mm d'épaisseur est réalisée à l'aide d'une lame de rasoir : la délimitation rostrale est l'arrière du chiasma optique et la délimitation caudale est la partie médiane des corps mamillaires ce qui correspond à peu près à 1,5 mm et à 4,7 mm en arrière du Bregma respectivement. Cette tranche est alors scindée dans

l'épaisseur en 2 tranches égales. Sur chaque tranche coronale les zones thalamiques d'intérêt (thalamus ipsilatéral, controlatéral et central Figure 25) sont prélevées à l'aide de pinces et de spatules fines puis congelées dans les tubes annotés correspondant à l'animal sacrifié. Chaque tube contient donc 2 prélèvements provenant de chacune des deux coupes. L'ensemble des tubes d'une série de prélèvements est ensuite rangé dans un congélateur -80°C jusqu'à leur utilisation ultérieure.

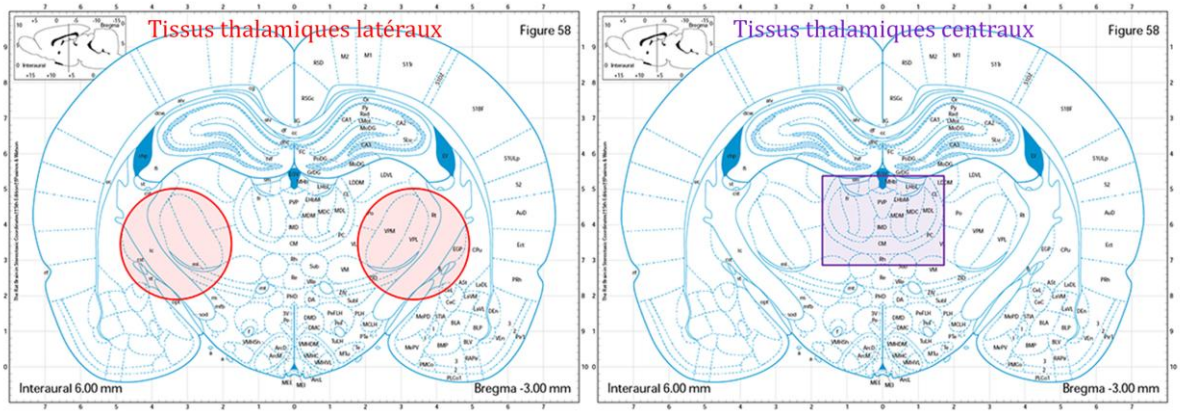


Figure 25: Illustration schématique des zones thalamiques prélevées. A gauche, la représentation schématique de la zone thalamique prélevée correspondant aux tissus thalamiques latéraux en rouge et en violet à droite, la représentation schématique de la zone thalamique correspondant au prélèvement de tissus thalamiques centraux. Cette vue correspond à la partie antérieure de la 2° coupe réalisée (voir texte).

A.2- Prélèvement des cerveaux entiers

Le cerveau est prélevé rapidement de la boîte crânienne et plongé rapidement et avec précaution dans de l'isopentane préalablement refroidi à -45°C en présence de carboglace. Une fois sa congélation complète (arrêt de la libération de bulles et dureté du cerveau), le cerveau est sorti du bain d'isopentane refroidi puis placé dans un tube préalablement annoté et conservé dans la carboglace. L'ensemble des tubes d'une série de prélèvements est ensuite rangé dans un congélateur -80°C jusqu'à leur utilisation ultérieure.

B- Euthanasie et perfusion intracardiaque

Afin de réaliser une anesthésie profonde, l'animal reçoit une injection intra-péritonéale de pentobarbital (100mg/Kg). Après avoir vérifié la profondeur de l'anesthésie, la perfusion

intracardiaque est installée. Tout le protocole se déroule à température ambiante, dans une salle dotée d'une hotte aspirante et d'une table de perfusion adaptée. Une solution salée isotonique héparinée (sérum physiologique + 25UI héparine/mL) est administrée pendant 2 à 3 minutes. Une solution de tampon phosphate (0,1M) contenant 2% ou 4% de paraformaldéhyde et 0,2% ou 0,8% d'acide picrique (en fonction des anticorps utilisés) est ensuite administrée lentement pendant 30 minutes. Le cerveau seul ou l'ensemble cerveau/moelle épinière est ensuite prélevé et transféré dans une solution saline adaptée : une solution de TBS (pour *tampon buffer saline* ; TRIS et NaCl) 0,05M, pH 7,6, additionnée de 30% de saccharose et de 0,05% d'azide de sodium. Le saccharose permet de garantir une cryoprotection et l'azoture de sodium est un biocide qui permet notamment d'éviter la croissance de bactéries GRAM négatives pendant la conservation. Les tubes contenant les prélèvements sont stockés en chambre froide à 4°C jusqu'à leur utilisation.

V- Etude de PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR)

En fonction des approches spécifiques utilisées, prélèvements de tissus thalamiques ou microdissection laser, les étapes de préparation des échantillons et d'extraction des ARN totaux sont différentes. Elles vous seront donc présentées séparément. Les étapes communes et les séquences des amorces utilisées vous seront présentées à la suite.

A- Etapes préliminaires spécifiques aux prélèvements de tissus thalamiques

L'extraction des ARN totaux est réalisée à l'aide d'un kit commercial (Tri.reagent Fermentas) selon la méthode dérivée du protocole de Chomczynski et Sacchi qui utilise une solution dénaturante contenant de l'isothiocyanate de guanidinium et du phénol (trizol ; Chomczynski and Sacchi, 1987). Cette solution permet de dénaturer les acides nucléiques, dissocier les protéines et permet d'inhiber les ribonucléases endogènes. Dans cette solution additionnée de chloroforme, les échantillons prélevés sont lysés à l'aide d'un broyeur de tissus (Tissuelyser Qiagen) puis incubés 10 minutes à 4°C et centrifugés à 10000g pendant 10 minutes toujours à 4°C. Les ARN étant insolubles dans le phénol, cette étape permet de séparer les acides

nucléiques des protéines par solubilisation différentielle. La phase aqueuse contenant les ARN est prélevée puis transférée dans un nouveau tube annoté. Les ARN sont de nouveau purifiés par l'ajout d'un même volume de trizol et d'un volume de chloroforme correspondant, incubés 10 minutes à 4°C puis centrifugés à 10000g pendant 10 minutes à 4°C. Une fois la phase aqueuse prélevée, un même volume de chloroforme est ajouté. Les échantillons sont incubés 10 minutes à 4°c puis centrifugés à 10000 g pendant 10 minutes à 4°C. La précipitation des ARN est effectuée par l'ajout d'un volume identique d'isopropanol. Les échantillons sont ensuite incubés 10 minutes à température ambiante puis une nuit à -20°C. Le lendemain, le précipité est récupéré par centrifugation à 12000g pendant 30 minutes à une température de 4°C. Après élimination du surnageant, le culot d'ARN est rincé avec 500 µl d'éthanol à 75 % et séché à l'air libre puis remis en suspension dans de l'eau. Chaque échantillon est alors digéré à la DNAse (Turbo DNA-free DNase AMBION) pour éliminer les éventuelles présences d'ADN génomique contaminant. La quantité d'ARN est ensuite quantifiée à l'aide du NanoDrop 1000 Thermo Scientific. La mesure de la qualité des ARN totaux de chaque échantillon est réalisée à l'aide du kit Agilent RNA 6000 du Bioanalyzer 2100 Agilent. Il s'agit d'une technique d'électrophorèse microcapillaire. Les ARN totaux marqués par un agent fluorescent sont excités par un laser. Au cours de la migration, l'intensité de la fluorescence est enregistrée et rapportée à celle d'une solution de différents marqueurs de taille de concentration définie à 150µg/µL. Le logiciel d'analyse couplé au lecteur (Agilent 2100 Bioanalyzer Software) permet d'obtenir un électrophorégramme pour chaque échantillon. Un facteur d'intégrité (RIN pour *RNA integrity number*) correspondant à un calcul automatique d'un critère de qualité et intégrant l'ensemble du profil (pics ribosomaux, régions pré, post pics et inter-régions) est généré par le logiciel du Bioanalyzer. Sa valeur comprise entre 1 et 10 renseigne sur la qualité des ARN, la valeur 10 correspondant à la meilleure qualité possible (Bustin et al., 2009; Favereaux et al., 2011).

B- Etapes préliminaires spécifiques à l'approche de microdissection laser

Les échantillons de cerveaux entiers sont utilisés dans cette technique. Le cerveau est disposé à l'aide de Tissue-Tek® OCT sur le support adapté du cryostat Leica CM3050S (Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne). Après 20 minutes d'attente, pour équilibrer les températures entre celle du cerveau conservé jusqu'à lors à -80°C et celle de la chambre du cryostat à −20°C, des coupes de 60 µm d'épaisseur sont réalisées au sein de la zone d'intérêt et placées sur des lames dotées d'une membrane de polyéthylène naphthalate (PEN; Carl Zeiss, Munich, Allemagne) en conditions exemptes de RNAse. Les lames sont immédiatement placées dans de la carboglace et marquées au crésyl violet selon le protocole suivant. Les coupes sont hydratées par des bains successifs d'éthanol refroidis à -20°C et conservé dans de la glace. On réalise successivement un bain d'éthanol à 95% (40 secondes), puis d'éthanol à 75% (30 secondes) et enfin un bain d'éthanol à 50% (30 secondes). Les coupes sont alors incubées dans une solution de crésyl violet à 1%, très brièvement. Les coupes sont ensuite déshydratées, de nouveau par des bains successifs d'éthanol à 50% (30 secondes), 75% (30 secondes), 95% (30 secondes), suivis par deux bain de 40 secondes dans de l'éthanol à 100%, anhydre. Les lames sont ensuite laissées sécher 5 minutes à température ambiante. Immédiatement après la déshydratation, la technique de microdissection laser est effectuée. Cette technique est réalisée à l'aide d'un système de microdissection PALM MicroBeam, version 4.8 équipé d'un bras robotisé P.A.L.M. RoboSoftware (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried, Allemagne, Fig. 26, A). Le contour de la zone à découper est réalisé par ordinateur sur l'image de la coupe à un grossissement de 5X (Fig. 26, C). Le bras robotisé effectue alors la découpe. Les échantillons sont collectés dans des capsules adhésives (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried, Allemagne, Fig. 26, B). Pour limiter la dégradation des ARN, les échantillons sont collectés jusqu'à 30 minutes maximum après la réalisation des coupes au cryostat. Les capsules contenant les échantillons sont ensuite placées dans des tubes de microcentrifugation stériles contenant 350µL d'une solution tampon de lyse puis conservés à une température de -80°C jusqu'à leur extraction.

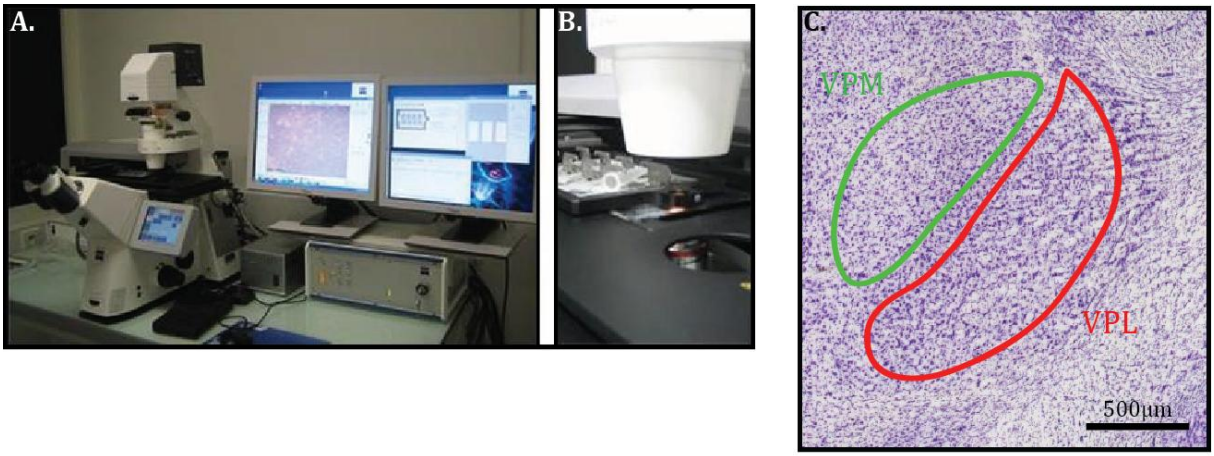


Figure 26: Approche de microdissection laser, plateforme et délimitation des noyaux sur coupes colorées au crésyl violet. En A, le système de microdissection PALM MicroBeam, version 4.8 équipé d'un bras robotisé P.A.L.M. RoboSoftware piloté par ordinateur. En B, la lame contenant les tissus ainsi que les capsules adhésives prêtes à récolter les échantillons. En C, coupe au crésyl violet sur laquelle sont délimités les noyaux VPL et VPM.

Les ARN totaux sont extraits des tissus microdisséqués avec le kit RNeasy® micro Kit (Qiagen, Hilden, Allemagne) en suivant le protocole fourni par le fabriquant et en éluant dans 14µL d'eau exempte de RNAse. La concentration d'ARN est déterminée sur le NanoDrop 1000 Thermo Scientific. La mesure de la qualité des ARN totaux de chaque échantillon, est réalisée à l'aide du kit Pico RNA 6000 du Bioanalyzer 2100 Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, U.S.A.).

C- Etapes communes du protocole de qRT-PCR

La quantité d'ARN totaux extraits est très différente entre des échantillons obtenus par prélèvements de tissus thalamiques et des échantillons obtenus par microdissection laser. La quantité finale d'ADN complémentaire (ADNc) disponible pour réaliser l'expérience de qRT-PCR est beaucoup plus faible dans le cas des échantillons obtenus par microdissection laser. Ainsi, le nombre de couples d'amorces qu'il est possible de tester *in fine* n'excède pas douze (incluant les gènes de référence) dans le cas des échantillons obtenus par microdissection laser. Les quantités et concentrations de produits utilisées dans le cadre des expériences de qRT-PCR sur les échantillons de microdissection laser sont calculées au cas par cas puisque l'on ne peut pas prélever une quantité fixe d'ARN totaux extraits sur les différents échantillons. De fait, dans cette

partie, je vous présente la technique de qRT-PCR et les quantités de produits sont celles qui ont été utilisées pour les échantillons issus de prélèvement de tissus thalamiques.

Les ARN totaux extraits (2µg) sont ajoutés à un mélange composé de 300ng d'amorces Random Hexamer Primer (Fermentas) et 200ng d'oligonucléotides (dT) (Fermentas) puis dénaturés 5 minutes à 65°C. La synthèse des ADNc est basée sur un kit commercial (RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas). La réaction de transcription inverse est réalisée à 50°C pendant une heure, puis une étape d'inactivation est réalisée pendant 15 minutes à 70°C. La solution d'ADNc de chacun des échantillons est conservée à -80°C.

Pour pouvoir amplifier un ARNm donné, il est nécessaire d'utiliser des amorces spécifiques de de ce gène d'intérêt. En plus de ces amorces, il est nécessaire de quantifier au moins deux gènes dont l'expression ne varie pas entre nos conditions, qui serviront de gènes de référence. Avant de se lancer dans l'expérience de qRT-PCR en elle-même il est donc nécessaire de valider les amorces et de définir des gènes de références.

Le choix des amorces est réalisé par le logiciel Primer Express 2.0 (Applied Biosystems). Les couples d'amorces sélectionnés sont validés d'après deux critères : leur spécificité et leur efficacité. La spécificité est vérifiée à l'aide de la courbe de fusion représentant l'émission de fluorescence en fonction de la température. Cette étape est réalisée à la fin de la PCR quantitative par une étape (incrémentation de la température de 0,3°C toutes les 3 secondes entre 65°C et 95°C) qui dissocie le produit d'amplification. L'efficacité est mesurée en réalisant une gamme étalon basée sur les concentrations d'ADNc (20; 10; 4; 0,8; 0,16ng par puits). Une courbe étalon représentant le nombre de cycles en fonction du logarithme décimal de la quantité d'ADNc est tracée grâce à l'utilisation de cette gamme de concentrations d'ADNc. La pente de la courbe nous renseigne sur l'efficacité de la réaction ($E=10^{-1/pente}-1$) et permet de déterminer quel couple d'amorces sélectionner. L'expression de 12 gènes, potentiellement gènes de référence, a été analysée par PCR quantitative sur l'ensemble des échantillons afin de déterminer quels gènes

présentent l'expression la plus conservée. L'analyse des résultats s'effectue à l'aide du logiciel Genorm (Biogazelle, Gant, Belgique) qui classe l'ensemble des gènes testés en fonction des différentes expressions entre tous les échantillons. Dans chacune des structures étudiées, deux gènes ont été choisis pour les valeurs Genorm les plus faibles suggérant que leur expression est indépendante des conditions expérimentales (Vandesompele et al, 2002 ; Bustin et al, 2009). Les gènes de référence pour les échantillons de microdissection laser à J14 sont Ppia (peptidylpropyl isomerase A) et Sdha (succinate dehydrogenase complexe subunit A) et pour J28 Vcp (valosin containing protein) et Actb (β actin). Les gènes de référence pour les échantillons de prélèvement de tissus thalamiques à J14 et J28 sont Gapdh (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) et Sdha.

Les ADNc de chacun des échantillons sont déposés, en simplicats ou duplicats en fonction de l'expérience, sur des plaques dans un ordre précis suivant un plan prédéterminé. Ce plan permet de disposer les différentes conditions de manière équitable au sein d'une même plaque et ainsi de limiter les biais expérimentaux. Les ADNc sont donc disposés minutieusement sur ces plaques où chaque puits contient un mélange réactionnel d'un volume total de 10µL composé de 3µL d'amorces à 2µM, 2µl d'ADNc à 2ng/µL précédemment synthétisés et 5µL d'un mélange contenant les réactifs nécessaires à l'amplification (mix 2X, LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Roche).

Une fois les échantillons déposés et les plaques placées dans le Twister II Caliper associé au bras robotisé du LightCycler® 480 (Roche), la réaction de PCR quantitative peut débuter. Elle commence par une étape à 95°C pendant 5 minutes permettant d'activer l'ADN polymérase présente dans les puits, puis 45 cycles successifs sont réalisés. Chaque cycle est constitué d'une étape de 15 secondes de dénaturation à 95°C puis d'une étape de 30 secondes à 61°C associant l'hybridation des amorces placées dans chaque puits et l'élongation par l'ADN polymérase. La mesure de la fluorescence du rapporteur fluorescent SYBR® Green placé dans les puits et s'intercalant dans l'ADN double brin est réalisée à la fin de l'élongation de chaque cycle.

L'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. Ceci permet la quantification du produit de la PCR quantitative à partir d'une courbe d'amplification qui présente la fluorescence en fonction du nombre de cycles. L'analyse de l'expression des gènes est basée sur une quantification relative. Elle se traduit par le calcul du facteur de variation (*Fold Change*, FC) entre les différentes conditions. Il est basé sur la formule proposée par Livak et Schmittgen en 2001: $FC= 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Pour cela il faut d'abord calculer le ΔCt. Le ΔCt est la différence d'expression entre le gène d'intérêt et la moyenne de l'expression des gènes de référence choisis : $\Delta Ct = Ct_{(\text{gène intérêt})} - Ct_{(\text{gène de référence})}$. Ct (*threshold cycle*) est le cycle seuil, il correspond au nombre de cycles nécessaire pour que le signal de fluorescence soit détectable. Le ΔΔCt correspond quant à lui à la différence d'expression entre la condition d'intérêt et la condition de référence : $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{condition d'intérêt})} - \Delta Ct_{(\text{condition de référence})}$. Toutes les données issues des analyses qPCR sont transmises, traitées et calculées par un logiciel accessible sur la plateforme transcriptome du Neurocentre Magendie, Gease, développé par Alexandre Brochard. Les données peuvent ensuite être téléchargées gène par gène afin de pouvoir réaliser les graphiques et les statistiques.

D- Séquences des amorces utilisées dans ces études de qRT-PCR

Tableau 5: Liste des séquences sens et anti-sens de tous les couples d'amorces utilisés dans cette étude.

Abréviations	Nomenclature	Séquence de l'amorce sens	Séquence de l'amorce anti-sens
Aif-1/Iba-1	allograft inflammatory factor 1 / ionized binding adaptator molecule 1	CAACAAGCACTTCCTCGATGATC	TGAAGGCCTCCAGTTTGGACT
Aldh1L1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1	GCCAATGCCACAGAATTTGG	CTGACATACAGGGCCTTGTTGA
Aqp-4	aquaporin-4	CCTGGCTACAACCCTGGACA	TTTGAAAGCCACCATGATGCT
Bdnf	brain-derived neurotrophic factor	GGCCCAACGAAGAAAACCATA	AGGAGGCTCCAAAGGCACTT
Cacna1B/Ca_v 2.2	calcium channel, voltage-dependent, N type, alpha 1B subunit	GCTGGCTTTTCTTCCAAGCA	CAAACCCAAAGTCAGGAAGCA
Cacna1I/Ca_v3.2	calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1I subunit	CTGGAACCCTGCCCAAGAT	GGTGCAGTTGACACTCGGTG
Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	AAAACTGGACCAGAACCAAGTGA	AAGTCCTTAGGGTTGATGCAATTT
Ccl21	chemokine (C-C motif) ligand 21	GCAGGACTGTCCCCTCTAGGA	AAGGAAGGGTGCCATGGAG
Cd44	cluster of differentiation 44	CATTCGCGGTCCTGTTTCAT	CAGAAGTCCCCTCCACACTGTT
Cd86	cluster of differentiation 86	GCCCCAGTTTGATCGAAAGA	GCAGAAAGAGACAGCACAGAAGTG
Csf1	colony stimulating factor 1	TGGCTACTGGGTCGCTAATCTT	CAGGGCTGGTGGAGCCTATAG
Csf1R	colony stimulating factor 1 receptor	TTAGTGCCCTGCATTCTAGGCT	CAGTATTTGCTTGGCGTTGTCA
Ctss	cathepsin S	GTGGTTGGCTATGGGACTCTTG	CCAAAGTGAAGGCCCCAACT
Cx3cl1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 / fractalkine	CAGCCAGTGACTCACTCCTTGA	CTGGCTTCCTCACTCTGGGA
Cx3cr1	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1 / fractalkine receptor	GAACCGGAAGAAGGCCAGAG	GCGTCCAGAAGAGGAAGAAGAC
Cxcl12/Sdf-1	chemokine (C-X-C motif) 12 / stromal cell derived factor 1	ACTCCAAACTGTGCCCTTCAGAT	TTCGGGTCAATGCACACTTG
Daao	D-amino-acid oxidase	GTGGCAGGGTCTGTGTTCAGT	TGAACCGTTCATCAGAGTTCTAAGC
Fgf2	fibroblast growth factor 2	TTGAACGCCTGGAGTCCAATA	CAGTGCCACATACCAACTGGAGTA
Fgfr3	fibroblast growth factor receptor 3	CAAGCTCCGTTGATAAAGAAAGTCA	GCATTCCGCTTTGTTTTCTTATTTT
Gad1	glutamate decarboxylase 1	CTGTCCCCACCTGAATGGAT	CAGGGAGGGTGTGACATTTGT
Gap43	neuromoduline	TGCAGTCATCTTGGGAAATTCTT	GACTCCCACAGGGCCACA
Gdnf	glial cell derived neurotrophic factor	GGCTACGAAACCAAGGAGGAA	GTACATTGTCTCGGCCGCTT
Gfap	glial fibrillary acidic protein	GGTGTGGAGTGCCTTCGTATTAG	GGGACACTTTCAGCTCCATTTCT
Gja1/Cx43	gap junction aplha 1 protein / connexin 43	CCCCGACGACAACCAGAAT	TTGGTCCACGATGGCTAATG
Gjb6/Cx30	gap junction protein, beta 6 /connexin 30	GGACGGTTTGGTGAGCTAGTG	GCAAACGGCGATGTATGTTGT
Gs	glutamate ammonia ligase / glutamine synthetase	ATTCCACGAAACCTCCAACATC	TCTCCTGGCCGACAATCC
Htr3a	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A, ionotropic	CCTGTTTCCAACACCAATTCATC	CCGGGTCTTCAGTGCTAAGTTTA
Il-10	interleukin 10	AGCCTTGTCAGAAATGATCAAGTTT	TTTCTGGGCCATGGTTCTCT
Il-1β	interleukin 1 beta	AAGCCAACAAGTGGTATTCTC	GGACAGGTATAGATTCTTCCC
Il-34	interleukin 34	GCCCTGAGCAATCTGTGTGTT	TCAGACCCAGGCTGGTTTCT
Il-6	interleukin 6	CACTATGAGGTCTACTCGGCAAAC	CAGTGAGGAATGTCCACAAACTG
Itgam/Cd11b	integrin alpha M /cluster of differentiation 11b	TGAAGGCTCAGACAGAGACCAAA	GCTGCCCACAATGAGTGGTAC
Itgβ2	integrin beta 2	CCAGGGTTTCCACAGACTCATC	GGACTCCGGAACAATCTGCA

Abréviations	Nomenclature	Séquence de l'amorce sens	Séquence de l'amorce anti-sens
Kcna2/K_v1.2	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 2	GGCAGTCGTCTCCATGACAAC	CCACTATCTTTCCCCCAATGGTA
Lpar6/P2ry5	lysophoshatidic acid receptor 6 / purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 5	TTCAGACACGATCCAGAACTCAAT	CAGAGAACCTGGAGTCACTCCTTC
Mapk8	mitogen-activated protein kinase 8	TTTGGAGGAGCGAACTAAGAATG	CATTGATCACTGCTGCACCTAAAG
Mmp2	matrix metallopeptidase 2	ACATCTGGTGTCTCCCTTACGG	CAAAGGGCAAACAAAGCAAAC
Nestine	nestine	CACAAGGTCTGGTCTGGTGTATG	CAGGCTGAGATGAAGGGTCAG
Nfkbia	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	GAGGAGAGCTATGACACGGAGTC	CCTCCAAACACACAGTCATCGT
Ngf	nerve growth factor (beta polypeptide)	TTGACTCCAAGCACTGGAACTC	GTCGTCTGTTGTCAACGCCTT
Ntf3	neurotrophine 3	GGGTGACCGACAAGTCCTCA	CGGTTTTGATCTCTCCCAACA
Ntf4	neurotrophine 4	ACAGTCCTGGGCTCTATCCTGAG	AACTGGCACTGCAGATGAGTACC
P2rx1	purinergic receptor P2X, ligand gated ion channel, 1	GATGGCAAGGCTGGGAAGT	CCAAAGATGCCAATCCCAGA
P2rx4	purinergic receptor P2X, ligand gated ion channel, 4	ATTTCTAAGGAAGGAGGCTCTCTCA	TGATTATAGGGAAGAGGAATGGTGT
P2rx7	purinergic receptor P2X, ligand gated ion channel, 7	GAACTGGAATTGCAGGTGGATAT	CTGCTCCAGAGGGCTCAAGT
P2ry1	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 1	CCCTAGATTTGAATTTGCATGCT	TCTAACAGCCAAATCATATCTGGGT
P2ry6	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6	TGAAGCACTGGCTGCAATGT	TGGTTTCCGATTGGGAGAAAG
P2ry12	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 12	GACTGCAATGCCGAGAACACT	CAGGCGTTCAAGGACGTCA
P2ry13	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 13	GTCTGCTTTGCCCCGTTTC	CAGTCAGTCTTGTTGGTGGTTTG
Prkcg	pkc gamma	CCAGATCAGCTCTCTGCATCCT	AGCCTCCCACTTAATTCTACAACTG
Ptgs2	prostaglandin endoperoxide synthase 2	CCCACCAACTTACAATGTGCACT	TGGTGTAGTAGGAGAGGTTGGAGAA
Ptprc/Cd45	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C /cluster of differentiation 45	TGTGTCTGTTTGTGTGCCATTTAA	GACAAAAAAGCACTGTTTCTCCAA
S100β	s100 calcium binding protein β	GAGGAATGAAGGGCCACTGA	CCCTAGGCACCAGCAGGTC
Scn10a/Na_v1.8	sodium channel, voltage-gated, type X, alpha subunit	GACCAGAGACGTGATTCACCAA	CCCGACACCAGCAGAAAAGT
Scn3a/Na_v1.3	sodium channel, voltage-gated, type III, alpha subunit	AAGGTCAGTGCCTATACCAGACAGT	GGAAGCAGCAACCTCTTGTCA
Slc12a5/Kcc2	solute carrier family 12, member 5 / potassium-chloride transporter	TGTTTCAGCCGACCTATGTGC	GGCTTGCAACCTCTCCTATTTACA
Slc16a3/Mct-4	solute carrier family 16, member 3 / monocarboxylic acid transporter 4	GAACCGCGTCATTCCAAAGT	GGTTATAGGCGGCTGGTAACTGT
Slc1a2/Glt-1/Eaat-2	solute carrier family 1, member 2 / glutamate transporter 1/ excitatory amino acid transporter 2	GAATCATGTCACCCAAGCTTCTT	GCTGATGTCCCACCATGCT
Slc1a3/Glast/Eaat-1	solute carrier family 1, member 3 / glial high-affinity glutamate transporter / excitatory amino acid transporter 1	TGGTCCTCTAGGGTGATCCTTTAG	CCAGTCCACAGTGGGTACACAC
Srr	serine racemase	TTACCCAGCGGCTCTTTGAT	CTGTGGTTTAAGCCTGTGGAACT
Tlr3	toll-like receptor 3	AGGGTCTGTCTCACCTCCACA	GAACACCTTGACCGGGATTTC
Tlr4	toll-like receptor 4	AGCAATGTGATGAAACCCCATAC	GATTCTTTGCCTGAGTTGCTTAATT
Tnf-α	tumor necrosis factor alpha	CAACTCCGGGCTCAGAATTTC	CCAGGCCACTACTTCAGCATCT
Trpv1	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1	TGGAAGAACTTTGCCCTGGTT	TCCTGCTGGGTGGCATGT
Vimentine	vimentine	GGATTTCTCTGCCTCTTCCAAA	CAGAGGAAGTGACTCCAGGTTAGTT

Abréviations	Gènes de référence - Nomenclature	Séquence de l'amorce sens	Séquence de l'amorce anti-sens
Actb	β actin	CGGCAATGAGCGGTTCC	TGCCACAGGATTCCATACCC
Gapdh	glyceraldhehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAATGGGAAGCTGGTCATCAAC	CCATTTGATGTTAGCGGGATCT
Ppia	peptidylprolylisomerase A	ACCCCATCTGCTCGCAATAC	GGAATGAGGAAAATATGGAACCC
Sdha	succinate dehydrogenase complex, subunit A	TGCGGAAGCACGGAAGGAGT	CTTCTGCTGGCCCTCGATGG

VI- Etudes neurochimiques: histochimie et immunohistofluorescence

Les animaux utilisés dans ces approches neurochimiques ont été euthanasiés et perfusés intracardiaquement. Avant de procéder aux coupes, le cortex latéral droit (donc ipsilatéral) est incisé pour permettre de différencier le thalamus ipsilatéral et controlatéral sur les futures coupes. Des coupes coronales de 30µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un microtome à congélation (MICROM HM450, Microm, Allemagne) autour et au sein de la zone thalamique contenant les noyaux d'intérêts (dans des plans situés entre 1,80mm et 4,70mm en arrière du Bregma). Les coupes ont été déposées dans des puits de plaques de culture cellulaire contenant une solution de TBS 0,05M pH 7,6, additionnée de sucrose (30%) et d'azide de sodium (0,05%). Les plaques sont ensuite sellées par du parafilm, cela permet la conservation en chambre froide à 4°C des coupes réalisées et leur utilisation ultérieure. Les coupes sont soit déposées puits par puits pour permettre un suivi anatomique en vue d'une étude histochimique, soit de manière sériée afin que chaque puits soit le reflet de l'ensemble de la structure pour les approches d'immunofluorescence. On dépose environ 10 coupes par puits, chaque plaque contenant 6 puits. Pour un animal, on remplit 8 puits.

A- Histochimie : présence de l'acétylcholine estérase

Afin de visualiser l'anatomie des noyaux thalamiques et permettre notamment de se familiariser avec l'anatomie des noyaux VPL, VPM, DM et IL, le marquage de l'acétylcholine estérase (AChE) a été réalisé (Fig. 27).

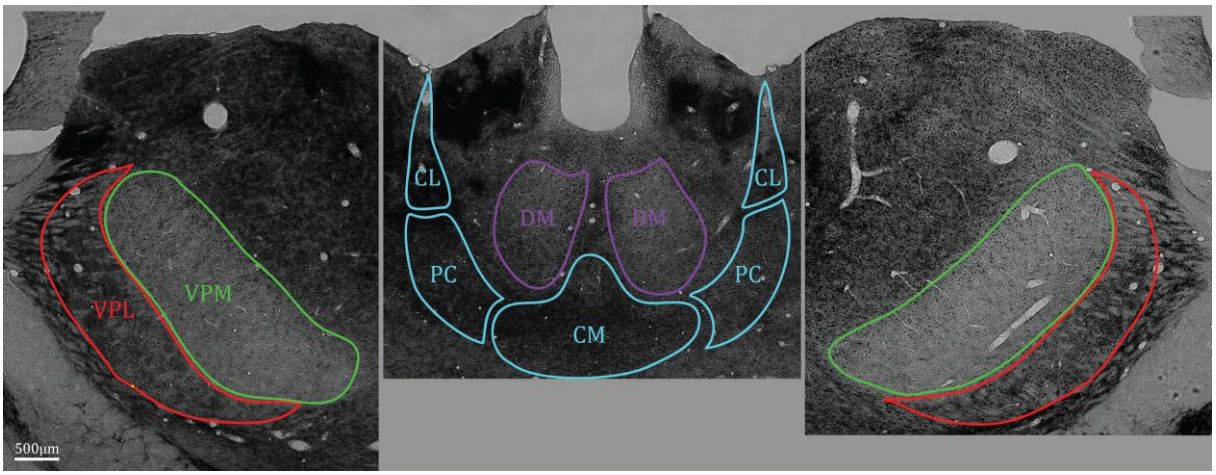


Figure 27: Exemple de marquage AChE sur une coupe de cerveau de rat et délimitation des différents noyaux thalamiques d'intérêt. Les photos de gauche et de droite présentent le thalamus latéral et la photo centrale le thalamus central d'un même individu. Le noyau VPL est délimité en rouge et le noyau VPM en vert, les noyaux DM délimités en violet et les noyaux intralaminaires composés des noyaux CM, PC et CL en bleu clair.

Toutes les étapes de cette expérience ont été réalisées à température ambiante et chaque expérience d'AChE a été réalisée sur un même nombre d'animaux de chacune des conditions.

Les coupes sont rincées dans une solution stock contenant 27,2g/L d'acétate de sodium, deux fois 5 minutes, puis incubées 15 minutes sous agitation lente avec une solution de pré-incubation contenant 900mL/L de solution stock et 100mL/L de solution A (37,5g/L de glycine et 25g/L de sulfate de cuivre pentahydraté). Les coupes sont ensuite incubées 4 heures sous agitation lente dans une solution d'incubation contenant 1g/L d'acétylthiocholine iodide dissout dans la solution de pré-incubation. Après un rinçage des coupes dans la solution stock pendant 5 minutes, les coupes sont incubées sous une hotte aspirante avec une solution de sulfate d'ammonium à 1% (dissout dans la solution stock) pendant 2 minutes. Les coupes sont alors rincées trois fois 5 minutes dans la solution stock, puis disposées sur des lames gélatinées et

montées entre lame et lamelle avec du liquide de montage Vectashield (Vector Laboratories Incorporation, Burlingame, U.S.A.). Les lames sont stockées à 4°C en attendant leur acquisition puis conservées de nouveau à 4°C.

L'AChE est une enzyme qui catalyse la réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine en choline et acide acétique. Le marquage utilisé consiste en l'hydrolyse par l'enzyme AChE de l'acétylcholine iodide en thiocholine, en présence de glycine (catalyseur). Le sulfate de cuivre conduit à la formation d'un précipité blanc de thiocholine sulfate. L'ajout de sulfate d'ammonium produit du sulfure de cuivre qui précipite en des dépôts marron. Ce sont ces dépôts marron qui permettent de pouvoir observer l'anatomie du thalamus et délimiter les noyaux d'intérêt.

B- Immunohistofluorescence: étude de marqueurs gliaux

Chacune des séries d'immunohistofluorescence a été réalisée sur un puits d'une dizaine de coupes, représentatif de l'intégralité de la structure étudiée puisque les coupes sont déposées de manière sériée dans 8 puits. Toutes les étapes ont été réalisées à température ambiante et sous agitation lente. Une série d'immunofluorescence comprend toujours des animaux de toutes les conditions expérimentales. Les coupes des cerveaux fixés avec 4% de paraformaldéhyde et 0,8% d'acide picrique ont été utilisées pour la détection par immunofluorescence des marqueurs astrocytaires, celles des cerveaux fixés avec 2% de paraformaldéhyde et 0,2% d'acide picrique pour la détection par immunofluorescence des marqueurs microgliaux.

Les coupes sont rincées trois fois dans une solution de TBS 0,05M (pH 7,6) pendant 10 minutes, puis sont ensuite placées dans une solution d'anticorps primaires pour une incubation sur toute la nuit. Le lendemain, les coupes sont rincées de nouveau trois fois 10 minutes dans une solution de TBS 0,05M (pH 7,6), puis mises à incuber deux heures à l'obscurité dans une solution d'anticorps secondaires. Après trois rinçages de 10 minutes dans une solution de TBS 0,05M (pH 7,6), les coupes sont montées sur des lames gélatinées, laissées sécher et montées entre lame et lamelle avec le liquide de montage Vectashield (Vector Laboratories Incorporation, Burlingame,

U.S.A.). Les lames sont rangées et conservées à 4°C en attendant leurs acquisitions puis conservées de nouveau à 4°C.

Toutes les solutions d'anticorps primaires et secondaires sont composées d'une solution de TBS 0,05M additionnée de 0,25% de Triton X-100, permettant de perméabiliser les membranes plasmiques. Toutes les solutions d'anticorps secondaires contiennent du 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) dilué au 1/10000ème (n° catalogue D1306, Molecular Probes, Life Technologies, Carlsbad, Californie, U.S.A.) pour visualiser les noyaux des cellules.

Pour l'immunodétection des marqueurs astrocytaires, la solution d'anticorps primaires est composée d'une solution d'anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la protéine GFAP diluée au 1/1000ème (n° catalogue Z0334, Dako, Trappes, France), d'une solution d'anticorps monoclonaux de souris dirigés contre la sous-unité β de la protéine S100, diluée au 1/10000ème (clone SH-B1, n° catalogue S2532, Sigma-Aldrich, St-Louis, U.S.A.) et de 10% de sérum normal de chèvre (n° catalogue S-1000 ; Vector Laboratories Incorporation, Burlingame, U.S.A.). La solution d'anticorps secondaires correspondante est composée d'une solution d'immunoglobulines G (IgGs) de chèvre dirigées contre la partie constante des anticorps de lapin et couplées au fluorochrome cyanine 3 (Cy3), diluée au 1/300ème (Jackson Immunoresearch Laboratories, Baltimore Pike, West Grove, U.S.A.) ainsi que d'une solution d'IgGs de chèvre dirigées contre la partie constante des anticorps de souris et couplées au fluorochrome Alexa 488 (A488), diluée au 1/2000ème (Jackson Immunoresearch Laboratories, Baltimore Pike, West Grove, U.S.A.). Concernant les marqueurs microgliaux, deux séries d'immunodétection ont été réalisées. La première série a utilisé une solution d'anticorps primaires composée d'une solution d'anticorps monoclonaux de souris dirigés contre la protéine CD11b/c, diluée au 1/2000ème (clone MRC OX-42 ; n° catalogue CL042AP1 ; Cedarlane, Ontario, Canada), d'une solution d'anticorps de lapin dirigés contre le peptide synthétique correspondant à la partie C-terminale de la protéine Iba-1, diluée au 1/2000ème (n° catalogue 019-19741, Wako, Osaka, Japon) et d'1% de sérum normal de chèvre. La seconde série d'immunohistofluorescence dirigée contre la microglie est également

constituée d'une solution d'anticorps de lapin dirigés contre le peptide synthétique correspondant à la partie C-terminale de la protéine Iba-1, diluée au 1/2000ème, mais avec une solution d'anticorps de chèvre dirigés contre le peptide synthétique correspondant à la partie C-terminale de la protéine CTSS, diluée au 1/500ème (n° catalogue M-19 ; Santa Cruz Biotechnology Incorporation, Dallas, Texas, U.S.A.) et d'1% de sérum d'âne (n° catalogue D9663 ; Sigma-Aldrich, Life Science, Saint Louis, U.S.A.). La solution d'anticorps secondaires correspondant est composée pour la première série des IgGs de chèvre dirigées contre la partie constante des anticorps de souris et couplées au fluorochrome Cy3, diluées au 1/300ème (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, U.S.A.) ainsi que des IgGs de chèvres dirigées contre la partie constante des anticorps de lapin et couplées au fluorochrome A488, diluées au 1/2000ème (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, U.S.A.). Pour la seconde série, la solution d'anticorps secondaires contient des IgGs d'âne dirigées contre la partie constante des anticorps de lapin et couplées au fluorochrome A488, diluées au 1/2000ème (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, U.S.A.) et des IgGs d'âne dirigées contre la partie constante des anticorps de chèvre et couplées au fluorochrome Alexa 568 (A568), diluées au 1/300ème (Life Technologues, Carlsbad, Santa Cruz Biotechnology Incorporation, Dallas, Texas, US.A.).

Les contrôles de spécificité des réactions immunohistochimiques ont consisté à substituer l'anticorps primaire ou l'anticorps secondaire par une solution de TBS 0,05M additionnée de 0,25% de Triton X-100 mais aussi à incuber les coupes dans l'anticorps primaire suivi d'un anticorps secondaire inapproprié. Dans tous ces cas, aucun marquage n'a été visible.

Dans un premier temps, les coupes traitées pour l'immunodétection des marqueurs gliaux ont été aussi traitées pour la visualisation de l'AChE. Ceci permet de délimiter les noyaux thalamiques avec précision. Bien que cette première approche m'ait permis de me familiariser avec l'anatomie des noyaux, elle a révélé une altération du marquage immunofluorescent (Fig. 28). Cette méthode n'a donc pas été retenue pour la suite des expériences.

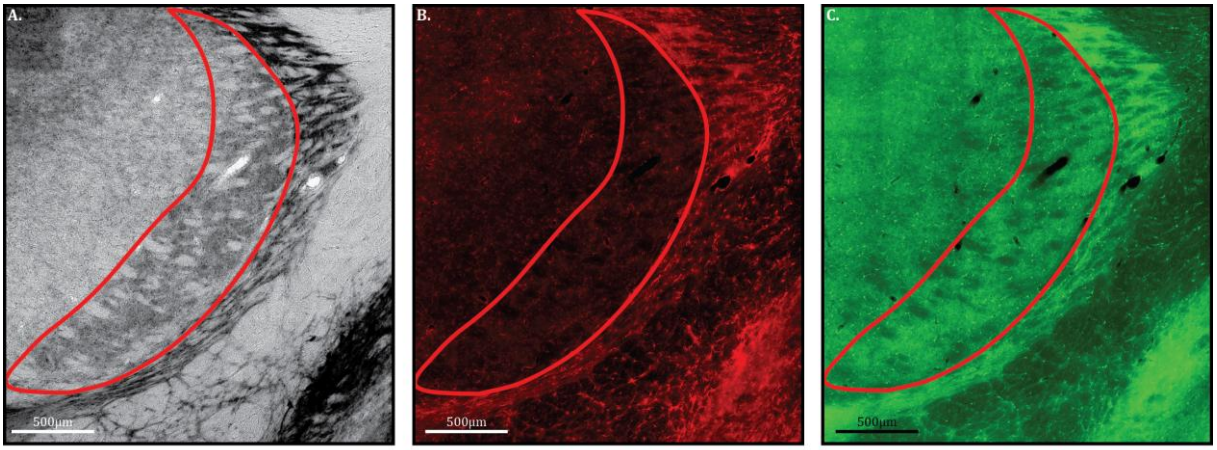


Figure 28: Exemple de marquage AChE sur une coupe immunomarquée contre les protéines GFAP et S100B. En A, le marquage AChE caractéristique, permet de délimiter l'anatomie des noyaux comme le VPL (en rouge). En B, marqueur GFAP visualisé en rouge grâce au fluorochrome Cy3 et en C marqueur S100β visualisé en vert grâce au fluorochrome A488. Les marquages en B et C sont altérés par l'histochimie AChE. Comparer par exemple avec les Fig. 61 et 66.

Dans un second temps, toujours pour me permettre de me familiariser avec les noyaux thalamiques et de délimiter leur anatomie précisément, les coupes du puits adjacent à celui utilisé pour la technique d'immunofluorescence ont été marquées à l'AChE. Comme les coupes sont déposées de manière sériée, chaque coupe du puits A possède sa coupe adjacente dans le puits B. Des appariements sont alors possibles et sont notamment basés sur le positionnement des vaisseaux au sein des coupes. Ces appariements permettent de délimiter le noyau sur la coupe AChE et d'appliquer ce contour sur la coupe avec le marquage fluorescent lors des analyses (Fig. 29). Par la suite, l'habitude de l'étude des noyaux thalamiques m'a permis de me passer du marquage AChE pour délimiter les noyaux et seul le marquage immunofluorescent a été effectué dans le cadre des analyses de marqueurs gliaux.

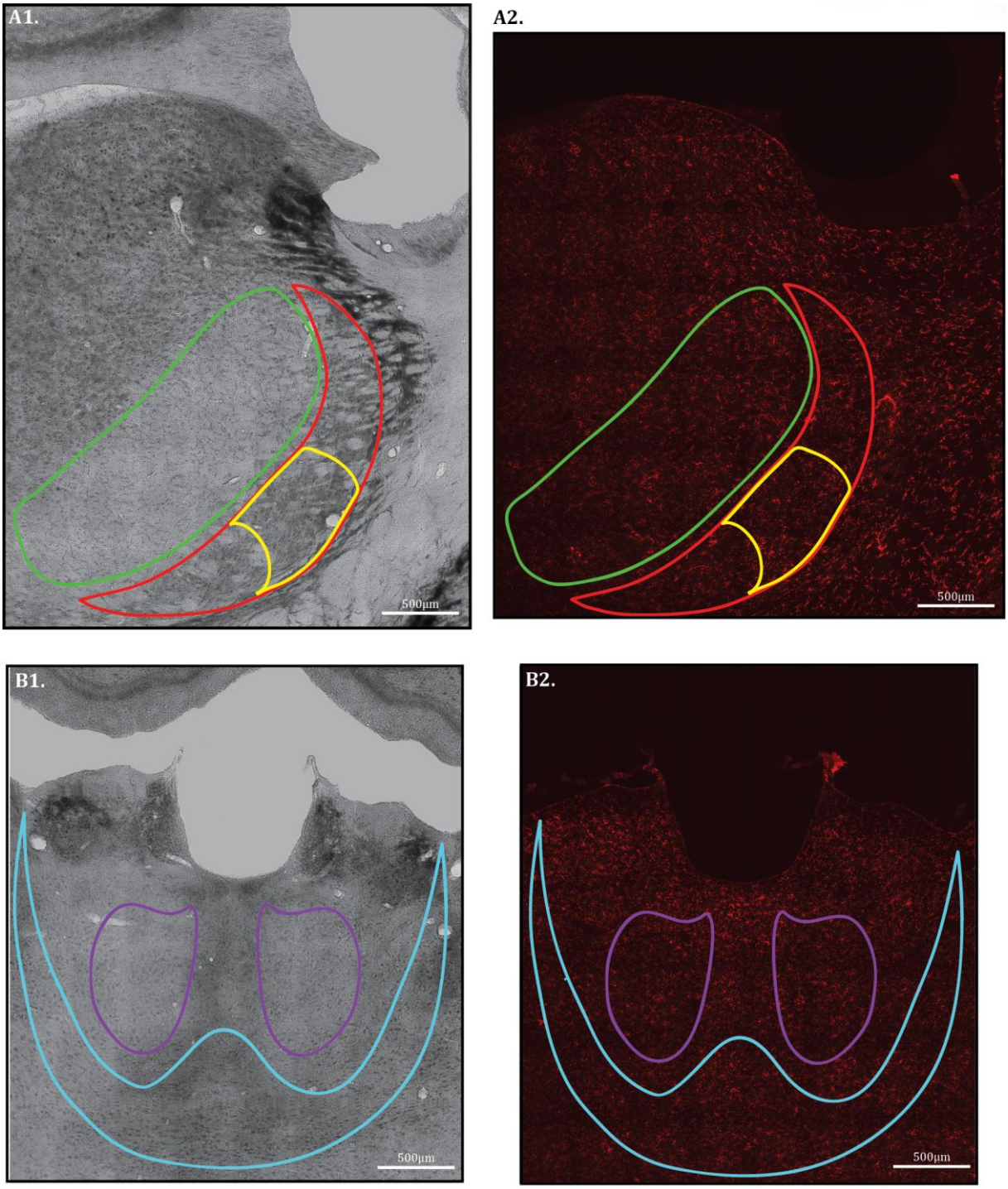


Figure 29: Exemple de marquage AChE sur une coupe adjacente à la coupe immunomarquée contre la protéine CD11b/c. Illustration de la délimitation des noyaux du thalamus latéral (A) et central (B). Les coupes AChE en A1 et B1 permettent de délimiter l'anatomie des noyaux et de délimiter ces noyaux sur les coupes immunomarquées contre la protéine CD11b/c visualisée en rouge par le fluorochrome Cy3 en A2 et B2. Le noyau VPL est délimité en rouge, sa sous-région en jaune et le noyau VPM en vert, les noyaux DM délimités en violet et les noyaux intralaminaires en bleu clair. On précise que la sous-région du VPL reçoit les afférences somesthésiques en provenance des pattes arrière.

VII- Acquisitions et quantifications des marquages de l'étude neurochimique

Une fois les marquages réalisés, les lames sont acquises sur différents systèmes de microscopie, puis analysées et quantifiées par différentes méthodes en fonction de l'expérience.

A- Acquisitions des images

A.1- Spinning disk

Tous les immunomarquages réalisés (GFAP + S100β; CD11b/c + Iba-1 et Iba-1 + CTSS) ont donné lieu à des acquisitions sur un microscope spinning disk en vue de la quantification du nombre de cellules immunomarquées et de la surface occupée par le marquage. Les acquisitions ont été réalisées rapidement après chaque immunomarquage. Le microscope spinning disk utilisé pour réaliser ces acquisitions est un microscope Leica DMI6000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne ; Fig. 30, 1) disponible à la réservation sur la plateforme du Bordeaux Imaging Center (BIC). Les acquisitions sur ce microscope ont été réalisées avec un objectif 20X à sec, plan apochromatique, d'ouverture numérique 0,7 (Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne) et avec une caméra HQ2 CCD (Photometrics, Tucson, U.S.A. ; Fig. 30, 2). Les diodes laser utilisées lors de ces acquisitions sont celles de 408nm (pour le DAPI), 491nm (pour l'A488) et 561nm (pour le Cy3 et l'A568). Afin de reconstruire l'ensemble des zones d'intérêt avec un large champ de vision, des mosaïques d'images ont été réalisées à l'aide d'une platine motorisée Scann IM (Märzhäuser, Wetzlar, Allemagne, Fig. 30, 3). Tout ce système est contrôlé par le logiciel MetaMorph (Molecular Devices, Sunnyvale, U.S.A. Fig. 30, 4) qui permet également d'enregistrer les images pendant l'acquisition et de régler les paramètres d'acquisitions (puissance des lasers, temps d'exposition, gain, etc.). Ces paramètres sont réglés au début d'une série donnée d'acquisitions et ne varient pas au sein de cette même série d'acquisitions. Pour chaque animal, trois coupes ont été acquises et elles se situaient dans un plan entre 2,76 et 3,6 mm (majoritairement autour de 3 mm) en arrière du Bregma. Pour chaque coupe, trois images ont

été acquises : thalamus ipsilatéral (contenant VPL et VPM), thalamus controlatéral (contenant VPL et VPM) et thalamus central (contenant DM et IL).

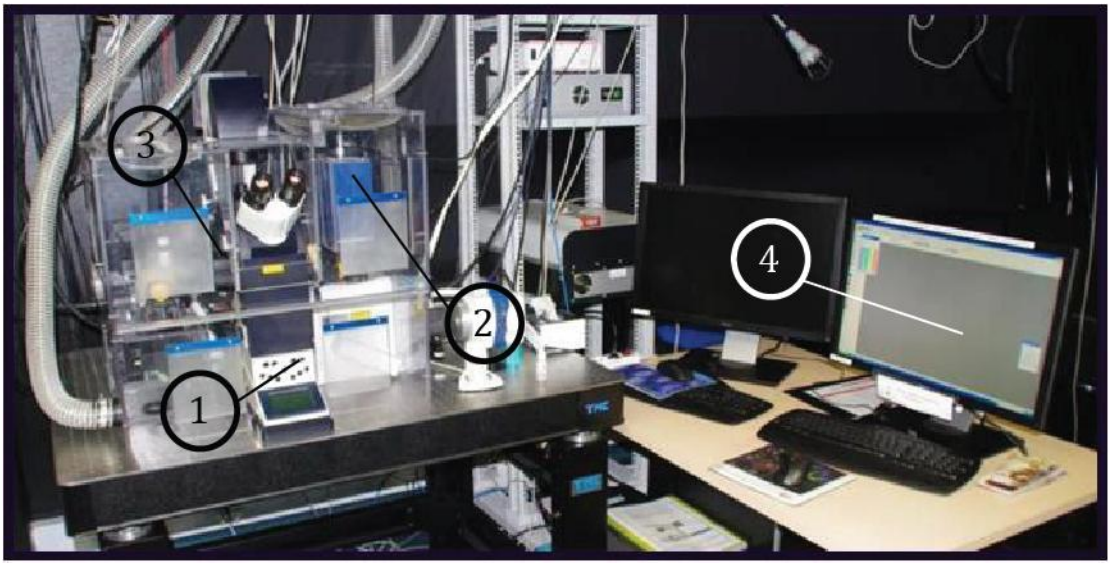


Figure 30: Système de travail du microscope spinning disk. Les acquisitions ont été réalisées sur le microscope spinning disk Leica DMI6000 (1) du BIC avec un objectif 20X à sec avec la caméra HQ2 CCD (2). Afin de reconstruire les zones d'intérêts avec un large champ de vision, des mosaïques d'images ont été réalisées à l'aide d'une platine motorisée Scann IM (3). Tout ce système est contrôlé par le logiciel MetaMorph (4).

A.2- Scanner de lames

Le scanner de lame utilisé est le Nanozoomer 2.0HT (Hamamatsu Photonics, France) disponible à la réservation sur la plateforme du BIC (Fig. 31, 1). Il possède un objectif 20X UPS apochromatique, d'ouverture numérique 0,75 combiné à une lentille additionnelle 1,75X pour permettre un grossissement final d'environ 40X. Les coupes virtuelles sont acquises avec une caméra TDI-3CCD. Les acquisitions en fluorescence sont réalisées grâce à une lampe à mercure LX2000 (200W, Hamamatsu Photonics, Massy, France) et un jeu de filtres adaptés pour la fluorescence GFP. En effet j'ai acquis le marquage Iba-1 révélé avec un anticorps secondaire couplé à l'A488.

L'intérêt du scanner de lames est de pouvoir acquérir une série de lames automatiquement après avoir défini les zones d'intérêts et les paramètres d'acquisition sous le logiciel de commande du scanner de lame NDP scan 2.5 (Fig. 31, 2). Ce mode d'acquisition a été utilisé pour quantifier le nombre de cellules Iba-1 immunopositives de manière stéréologique dans

l'épaisseur de la coupe (Z stack). Toutes les lames ont été codées lors des acquisitions de manière à réaliser des analyses en aveugle.

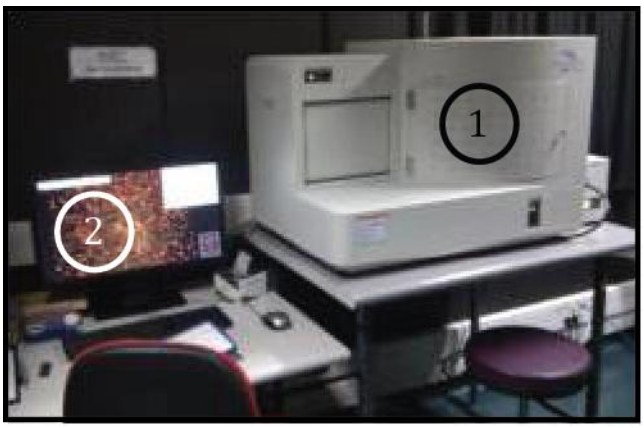


Figure 31: Système de travail du Nanozoomer 2.0HT. Les acquisitions ont été réalisées au sein de la plateforme Nanozoomer du BIC. Les lames sont disposées dans des racks puis placées dans le Nanozoomer 2.0HT (1). Là, les coupes virtuelles sont acquises avec une caméra TDI-3CCD. L'utilisateur délimite les zones d'acquisitions et définit les paramètres sous le logiciel de commande du scanner de lame NDP scan 2.5 (2).

Les lames sont placées dans le Nanozoomer en suivant l'ordre indiqué sur le fichier de codage. Les modes «batchs of slides» (en modalité semi-automatique pour définir les zones d'intérêts) et fluorescence/transmission (fluo/brightfield) sont choisis. Ce mode fluorescence/transmission permet de faire un focus en transmission et l'acquisition en fluorescence. Pour chaque lame, les zones d'intérêts sont délimitées. Elles correspondent à un rectangle entourant l'ensemble du thalamus (donc contenant les noyaux VPL ipsi- et controlatéral) sur chaque coupe sélectionnée. Les coupes sélectionnées se trouvaient dans un plan aux alentours de 3 mm en arrière du Bregma. Chaque acquisition de série d'images a été réalisée en Z avec un pas de 3µm. Comme les 3 à 5 coupes sélectionnées par animal ne sont pas forcément sur la même lame et comme au sein d'une lame les coupes sélectionnées ne sont pas forcément situées exactement dans le même plan, j'ai opté pour la réalisation de 15 images ce qui laisse une marge de manœuvre permettant de prendre en compte ces différences par rapport aux 30µm d'épaisseur des coupes. Ceci m'a permis dans tous les cas d'obtenir un minimum de 4 images parfaitement nettes pour chaque coupe. En effet, je rappelle que le focus est réalisé en transmission et donc parfois l'image acquise en fluorescence peut ne pas être parfaitement nette sur la totalité de la zone acquise. Il

s'agit, je le rappelle, d'acquisitions automatisées pour des portoirs entiers de lames. Ces acquisitions sont longues et les groupes expérimentaux ont donc été répartis de manière homogène sur deux acquisitions de 48 heures par temps post-chirurgical (J14 et J28).

B- Quantifications

B.1- Détermination du pourcentage de la surface occupée par les marqueurs gliaux et du nombre de cellules immunomarquées sous MetaMorph

Une fois acquises sur le microscope spinning disk, les images sont analysées quantitativement sous le logiciel MetaMorph (version 64bit, 7.8.1.0) où une macro assiste l'expérimentateur. L'analyse se compose de plusieurs étapes. Tout d'abord on procède à l'extraction du bruit de fond de l'image et à la délimitation des zones d'intérêts (ROI pour *region of interest*; les noyaux VPL, VPM et la sous-région du VPL ou les noyaux DM et IL selon l'image analysée ; voir figure 29 pour la délimitation des noyaux). La sous-région du VPL correspond à la zone de projection des afférences en provenance des pattes arrière (voir Fig. 11). Ensuite, un seuillage est appliqué à l'image pour permettre de définir au sein de l'échelle de gris de 0 à 65535 quels sont les pixels positivement marqués (représentant le marquage d'intérêt pour un anticorps donné ; Fig. 32, A1 et A2) comparés à ceux non marqués ou considérés comme du bruit de fond. Ce seuillage peut aboutir à la non prise en compte des prolongements gliaux les moins marqués comme on peut le voir sur la figure 32 mais le même seuillage est appliqué à l'ensemble des images. Le logiciel quantifie alors l'aire de chaque ROI ainsi que la surface totale occupée par le marquage (défini grâce au seuillage) au sein de chaque ROI. Les résultats sont transmis au logiciel Excel en même temps que d'autres mesures comme l'intensité de fluorescence. La quantification de la surface occupée par l'immunomarquage est exprimée en pourcentage de la surface de ROI occupée. Le logiciel permet ensuite à l'expérimentateur, s'il le souhaite, de compter le nombre de cellules immunopositives. Pour cela, l'expérimentateur choisit la ROI dans laquelle il souhaite compter et entoure d'un cercle chaque cellule immunopositive : S100β/DAPI, GFAP/DAPI, Iba-1/DAPI, CD11b/c/DAPI ou encore GFAP/S100β/DAPI et Iba-1/CD11b/c/DAPI (Fig. 32, B1 et B2). Le

logiciel connait l'aire de la ROI et détermine le nombre d'objets présents sur l'image. En enlevant l'objet ROI du compte final, l'expérimentateur a ainsi accès au nombre de cellules immunopositives et donc au nombre de cellule immunopositives par unité de surface.

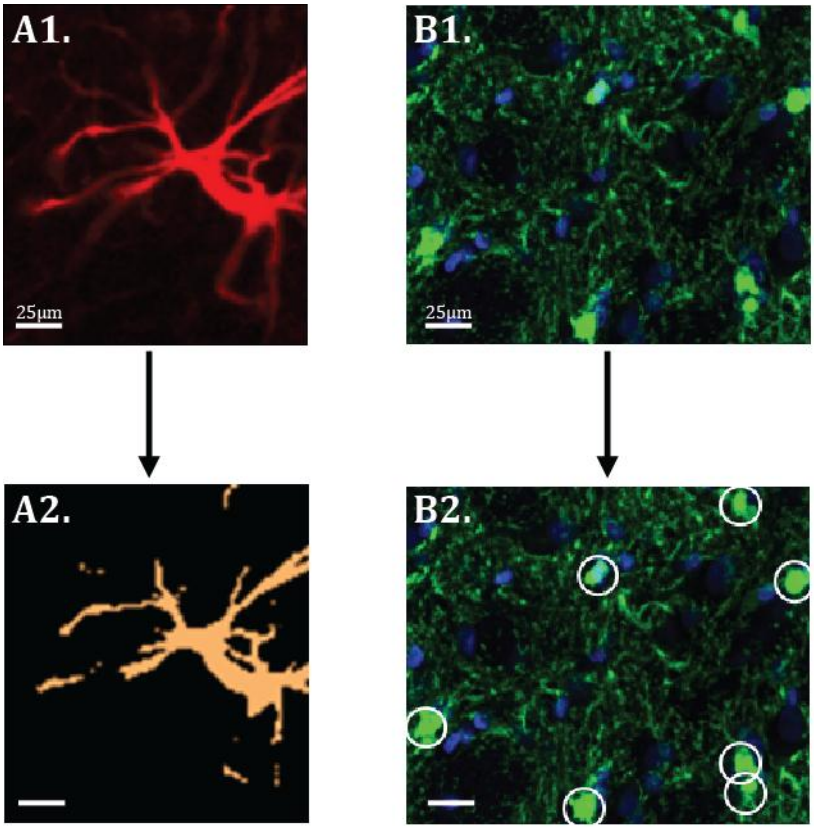


Figure 32: Illustration de la méthode de quantification des images d'immunofluorescence. Le seuillage permet de sélectionner au sein de l'échelle de gris de 0 à 65535 quels sont les pixels positivement marqués ici pour la GFAP (A1 avant le seuillage, A2 après le seuillage). Le logiciel MetaMorph peut ainsi déterminer le pourcentage de surface immunomarquée dans la zone d'intérêt délimitée auparavant. Ensuite, le nombre de cellules immunopositives pour un marqueur glial donné, ici S100β (B1), est déterminé par l'utilisateur en entourant chaque cellule doublement marquée pour le marqueur étudié (ici S100β) et le marqueur nucléaire DAPI (B2). Le logiciel comptabilise ensuite le nombre de zones délimitées et l'aire de la zone d'intérêt délimité auparavant. Ainsi, le nombre de cellules par unité de surface peut ensuite être calculé.

Pour chaque animal, la moyenne des valeurs obtenues sur 3 coupes différentes est calculée pour chacun des paramètres analysés. Les pourcentages de la surface occupée par les immunomarquages GFAP, S100β, CD11b/c et Iba-1 ont été analysés dans les noyaux VPL, VPM, la sous-région du VPL, les noyaux DM et IL. La surface occupée par l'immunomarquage CTSS a été seulement quantifiée dans les noyaux VPL, VPM et la sous-région du VPL. Le nombre de

cellules immunopositives pour les marqueurs GFAP, S100β, CD11b/c, Iba-1 et CTSS a été quantifié dans la sous-région du VPL uniquement.

Puisque chaque série d'immunofluorescence a été réalisé et acquise séparément, les données analysées ont été normalisées en fonction de la moyenne des animaux naïfs pour chacun des noyaux, des marqueurs et des temps (J14 et J28) étudiés.

B.2- Comptage stéréologique des cellules Iba-1 positives sous MERCATOR

Les images en Z acquises avec le Nanozoomer sont ouvertes tour à tour sous le logiciel Mercator (Explora Nova, La Rochelle, France). L'expérimentateur définit les bornes en Z entre lesquelles il va compter les cellules. J'ai ainsi analysé entre 4 à 6 images pour chaque coupe, c'est-à-dire l'ensemble des images parfaitement nettes. Sur chaque image, le noyau VPL est délimité par l'expérimentateur. Le logiciel génère alors automatiquement des sondes ou carrés de 50x50µm espacés en X et Y de 30 µm en suivant une méthode stéréologique (Fig. 33). La méthode de stéréologie appliquée est celle du dissecteur optique. Le comptage est manuel et respecte la règle suivante : les corps cellulaires coupant les bords verts des sondes sont inclus dans le compte et ceux sur les bords rouges sont exclus (Fig. 33). Sur chaque image, la totalité des cellules présentes dans les sondes est comptée. Pour un animal, j'ai réalisé les comptes sur 3 à 5 coupes. Comme les coupes étaient sériées, elles étaient distantes de 210µm. Pour chaque animal et chaque hémi-cerveau, le nombre de cellules par volume de structure étudiée (N_v ; ici le VPL ipsilatéral ou le VPL controlatéral) est calculé par le logiciel.

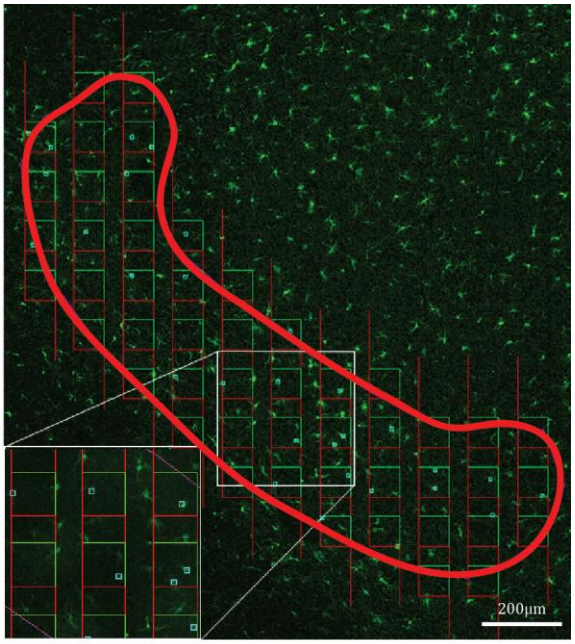


Figure 33: Exemple de grille de stéréologie réalisée sous le logiciel Mercator. Sur cette coupe d'hémi-thalamus immunomarqué pour la protéine Iba-1 visualisable en vert, le VPL est délimité en rouge. Chaque petit carré bleu turquoise correspond à un corps cellulaire compté par l'expérimentateur.

VIII- Analyses statistiques

L'ensemble des statistiques a été fait sous le logiciel Prism. Toutes les données sont exprimées en moyenne ± l'erreur type de la moyenne (*standard error of the mean* ; SEM). Pour tester l'hypothèse H_0 selon laquelle il existe des différences entre les trois groupes expérimentaux, une analyse de la variance (ANOVA ; One Way ANOVA) a été réalisée, suivi d'un test post hoc de Tukey. Les différences sont considérées comme significatives à $p<0,05$. Afin de tester l'existence d'une corrélation entre les paramètres étudiés, un test de corrélation linéaire de Pearson (two-tailed) a été utilisé.

RESULTATS

I- Quatorze jours après la ligature des nerfs spinaux : développement des symptômes douloureux et diminution concomitante du nombre de cellules thalamiques exprimant des marqueurs gliaux

A- Développement des symptômes douloureux chez les animaux SNL entre J0 et J14

Le but de mon étude est de caractériser les cellules gliales thalamiques en condition de douleur neuropathique. Pour cela, je dois suivre au préalable le développement des symptômes douloureux dans mon modèle d'étude, le modèle SNL. J'ai choisi de caractériser les symptômes d'allodynie et d'hyperalgésie mécaniques ainsi que les douleurs ambulatoires grâce aux tests des filaments de von Frey et de distribution pondérale dynamique respectivement à J0 avant la chirurgie et à J14 avant le sacrifice des animaux.

A.1- Allodynie et hyperalgésie mécaniques

Afin d'évaluer le développement des symptômes d'allodynie et d'hyperalgésie mécaniques des animaux SNL j'ai utilisé une méthode me permettant de quantifier les deux paramètres simultanément. Pour cela, j'ai appliqué une gamme ascendante de rigidité de filaments de von Frey (allant de 0,008g à 100g) sur les pattes arrière et mesuré les réponses en utilisant un score comportemental (voir Matériel et Méthodes et Fig. 22). Cette approche est adaptée d'une méthode développée par Vos et collaborateurs en 1994. On observe qu'il y a pour la patte arrière ipsilatérale (droite) des animaux SNL, un déplacement vers la gauche (flèche verte horizontale) et vers le haut (flèche verte verticale) des courbes donnant le score comportemental moyen en fonction du filament de von Frey appliqué entre J0 et J14 (Fig. 34, A). Un décalage vers la gauche signifie que certains stimuli précédemment non douloureux sont perçus comme douloureux (allodynie) et un décalage vers le haut signifie que les stimuli précédemment douloureux sont perçus comme encore plus douloureux par l'animal (hyperalgésie). Ce décalage est beaucoup

moins important au niveau de la patte arrière ipsilatérale des animaux sham et est totalement absent chez les animaux naïfs (Fig. 34, A).

Afin de quantifier l'allodynie et l'hyperalgésie lors d'une stimulation mécanique statique, j'ai mis en œuvre une nouvelle analyse graphique sur les courbes de score comportemental moyen (Ducourneau et al, 2014) et je remercie vivement William Gérand qui a écrit la macro Excel.

Premièrement, j'ai déterminé le seuil de réponse nociceptif, en le définissant comme étant la valeur en gramme nécessaire pour induire au moins trois retraits de la patte au cours des 5 applications (plus de 50% des réponses provoquant un comportement nociceptif). Par conséquent, ce seuil correspond à un score comportemental moyen de 1,2 (que j'ai appelé score nociceptif minimal, ligne noire horizontale en Fig. 34, A) puisque le score 2 est attribué à un retrait de la patte stimulée. J'ai donc pu déterminer graphiquement les seuils nociceptifs par une simple approximation linéaire (Fig. 22 flèches rouge et bleue) pour chaque jour étudié, chaque patte arrière et chaque condition expérimentale. Les résultats obtenus pour le seuil nociceptif de la patte arrière ipsilatérale montrent qu'il n'existe pas de différence entre les différents groupes expérimentaux à J0 (environ 5g ; Fig. 34, B, D0). En revanche, le seuil nociceptif de la patte arrière ipsilatérale des animaux SNL à J14 (1,18 ± 0,33 g) est significativement réduit par rapport à celui des animaux naïfs (4, 17 ± 0,33 g) et des animaux sham (2, 63 ± 0,26 g) (Fig. 34, B, D14). Les animaux SNL développent donc bien une allodynie mécanique statique. De manière intéressante, on note que le seuil nociceptif de la patte arrière ipsilatérale des animaux sham à J14 est intermédiaire entre celui des animaux naïfs et celui des animaux SNL : il est significativement plus bas que celui des animaux naïfs et significativement plus élevé que celui des animaux SNL. Avec cette mesure du seuil nociceptif, il semble que la chirurgie seule ne soit pas sans effet à J14 sur les réponses douloureuses.

Deuxièmement, au-delà de la détermination du seuil nociceptif dont l'abaissement objective une allodynie, j'ai voulu obtenir une autre mesure de l'allodynie. J'ai déterminé l'aire sous la courbe

s'étendant du seuil nociceptif à J14 jusqu'au seuil nociceptif à J0 et bien sûr au-dessus du score nociceptif minimal (Fig. 22, zone hachurée). Cela me donne un indice de la douleur induite par des stimuli qui étaient précédemment non douloureux à J0. Je l'ai appelé score d'allodynie. On voit qu'il existe une augmentation significative du score d'allodynie pour la patte arrière ipsilatérale des animaux SNL à J14 (4,85 ± 0,53) par rapport à celui des animaux naïfs (0,85 ± 0,53) et des animaux sham (1,54 ± 0,34) (Fig. 34, C). Ainsi, avec cette mesure de l'allodynie mécanique, seuls les animaux SNL développent une forte allodynie mécanique au niveau de leur patte arrière ipsilatérale à J14. Enfin, pour évaluer l'hyperalgésie mécanique, j'ai calculé la différence entre l'aire sous la courbe obtenue à J0 et J14, les aires étant mesurées à partir du seuil nociceptif déterminé à J0 et au-dessus du score nociceptif minimal (Fig. 22, zone rose). J'ai appelé cette valeur, score d'hyperalgésie. Ce score d'hyperalgésie quantifie ici la douleur additionnelle obtenue à J14 pour des filaments de von Frey induisant déjà de la douleur à J0. On observe que le score d'hyperalgésie pour la patte arrière ipsilatérale des animaux SNL à J14 (58,77 ± 5,59) est significativement augmenté par rapport à celui des animaux naïfs (-12 ± 5,71) et des animaux sham (18,1 ± 5,05 ; Fig. 34, D). Là encore de manière intéressante on note que le score d'hyperalgésie de la patte arrière ipsilatérale des animaux sham est intermédiaire entre celui des animaux naïfs et celui des animaux SNL : il est significativement plus élevé que celui des naïfs et significativement plus bas que celui des animaux SNL. Les animaux SNL développent donc une forte hyperalgésie mécanique à J14 au niveau de leur patte arrière ipsilatérale. De plus, la chirurgie seule semble induire, quatorze jours après, une hyperalgésie plus légère sur la patte arrière ipsilatérale.

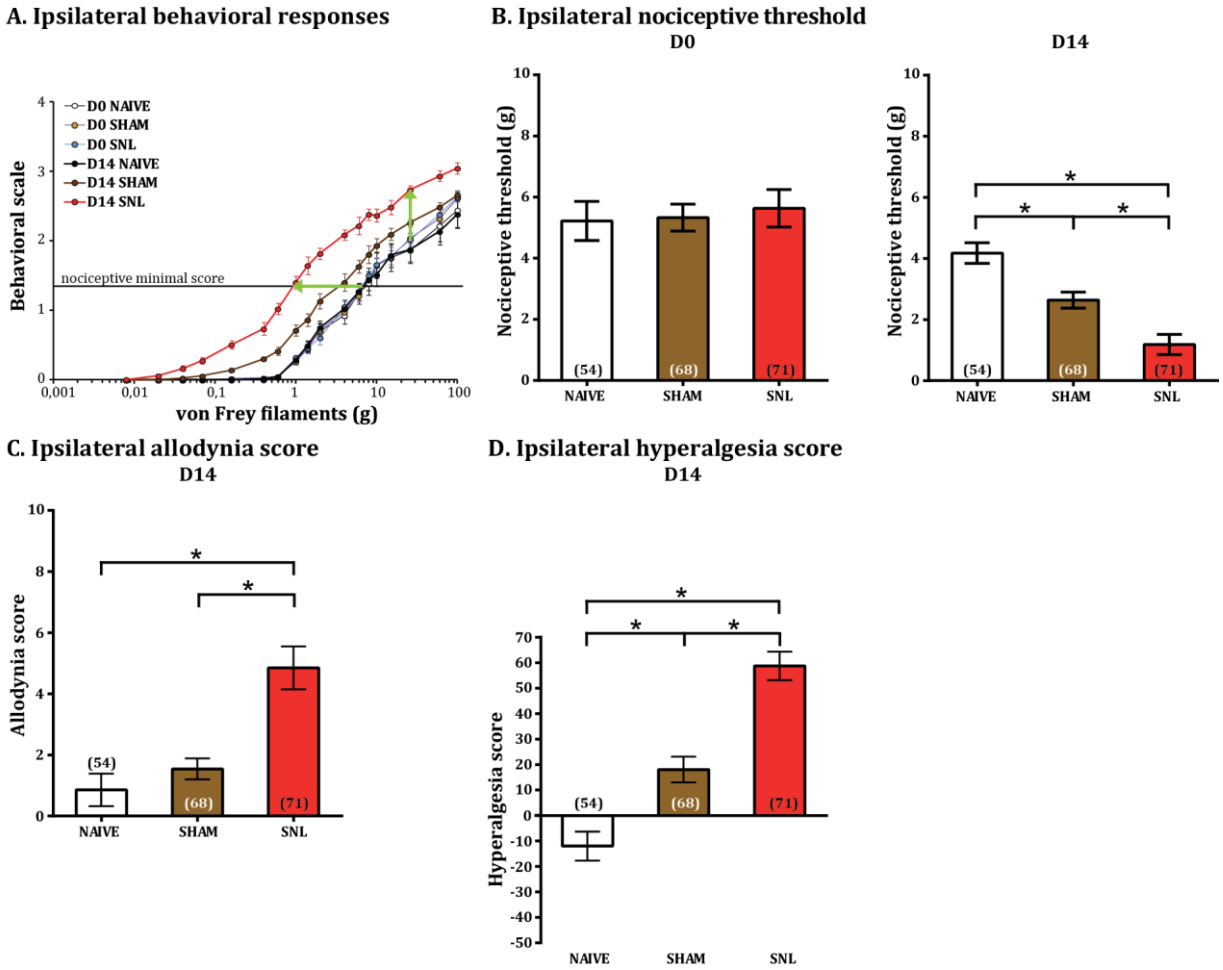


Figure 34 : Développement des symptômes douloureux d'allodynie et d'hyperalgésie mécaniques au niveau de la patte arrière ipsilatérale des animaux SNL. En A est représenté le graphique des réponses moyennes obtenues à l'application de chaque filament de von Frey pour la patte arrière ipsilatérale (côté ligaturé ; patte droite) de chaque condition à J0 et J14 (n=54 pour les naïfs, n=68 pour les sham, n=71 pour les SNL). Les scores sont définis comme suit : 0, absence de réponse à l'application du filament; 1, détection de l'animal signalée par la contraction légère de la patte sans mouvement réel ; 2, contraction des muscles avec retrait de la patte stimulée ; 3, fuite ou attaque du filament ; 4, toilettage asymétrique dirigé vers la région stimulée. La ligne noire horizontale à 1,2 correspond au score nociceptif minimal (plus de 50% des 5 applications d'un filament provoquent une réponse douloureuse). Au-dessus de cette ligne les réponses sont considérées comme douloureuses, en deçà, elles ne sont pas douloureuses. On remarque qu'entre J0 et J14 pour les animaux SNL il y a un déplacement de la courbe vers la gauche (flèche verte horizontale) et vers le haut (flèche verte verticale). En B sont présentés les seuils nociceptifs obtenus pour la patte arrière ipsilatérale dans chaque condition expérimentale à J0 et J14. A J0 il n'existe pas de différence entre les trois conditions : naïfs, sham et SNL. En revanche, à J14 le seuil nociceptif des animaux SNL est significativement diminué par rapport à celui des animaux naïfs et sham. De plus, le seuil nociceptif des animaux sham est significativement plus bas que celui des animaux naïfs. En C sont présentés les scores d'allodynie de la patte arrière ipsilatérale à J14 dans chaque condition expérimentale. Les animaux SNL présentent un score d'allodynie significativement plus élevé que celui des animaux naïfs et sham. Ils développent donc une allodynie mécanique à J14 au niveau de leur patte arrière ipsilatérale. En D sont présentés les scores d'hyperalgésie de la patte arrière ipsilatérale à J14 dans chaque condition expérimentale. Les animaux SNL présentent un score d'hyperalgésie significativement plus élevé que celui des animaux naïfs et sham. Les animaux sham présentent également un score d'hyperalgésie significativement plus élevé que celui des animaux naïfs. Les animaux SNL développent une forte

hyperalgésie mécanique et les animaux sham une hyperalgésie modérée à J14 au niveau de leur patte arrière ipsilatérale. On se reportera au texte des résultats ainsi qu'à la partie III.A2 des matériels et méthodes pour la méthode d'analyse graphique permettant l'obtention du seuil nociceptif et des scores d'allodynie et d'hyperalgésie. (*, $p<0,05$)

En ce qui concerne la patte arrière controlatérale (gauche) on ne constate aucun déplacement vers la gauche ni vers le haut des courbes donnant le score comportemental moyen en fonction du filament de von Frey appliqué entre J0 et J14 (Fig. 35, A). Au contraire et de manière surprenante, pour les animaux SNL, on note un léger décalage vers la droite (flèche verte horizontale) et vers le bas (flèche verte verticale) entre les courbes obtenues à J0 et J14 (Fig. 35, A). Un décalage vers la droite signifie que certains stimuli précédemment douloureux sont perçus comme non douloureux et un décalage vers le bas signifie que les stimuli précédemment douloureux sont perçus comme moins douloureux par l'animal. De manière attendue, il n'existe pas de différence au niveau du seuil nociceptif entre les différents groupes expérimentaux à J0 (Fig. 35, B, D0). En revanche, le seuil nociceptif de la patte arrière controlatérale des animaux SNL est significativement plus élevé comparé à celui des animaux naïfs à J14 (Fig. 35, B, D14). Ainsi, à J14, les animaux SNL expriment un comportement non douloureux pour des stimuli qui étaient perçus comme douloureux à J0 au niveau de leur patte arrière controlatérale.

L'étude du score d'allodynie à J14 (Fig. 35, C) ne montre pas de différence entre les groupes expérimentaux. Les animaux SNL ne modifient donc pas significativement leurs réponses à l'ensemble des filaments évoquant des réponses non douloureuses à J0. En revanche, on observe une diminution significative du score d'hyperalgésie au niveau de la patte arrière controlatérale des animaux SNL par rapport à celui des animaux naïfs (Fig. 35, D). Les animaux SNL semblent donc développer un phénomène de compensation à l'hypersensibilité douloureuse de leur patte arrière ipsilatérale. La sensibilité douloureuse de leur patte arrière controlatérale est diminuée.

Ainsi, le test des filaments de von Frey a permis de mettre en évidence à J14 le développement d'importants symptômes d'allodynie et d'hyperalgésie mécaniques au niveau de la patte arrière ipsilatérale des animaux SNL et de déceler des signes de compensation qui se traduisent par une

diminution de la sensibilité douloureuse de leur patte arrière controlatérale. De plus, ce test a également mis en évidence le développement d'une légère hyperalgésie mécanique au niveau de la patte arrière ipsilatérale des animaux sham à J14.

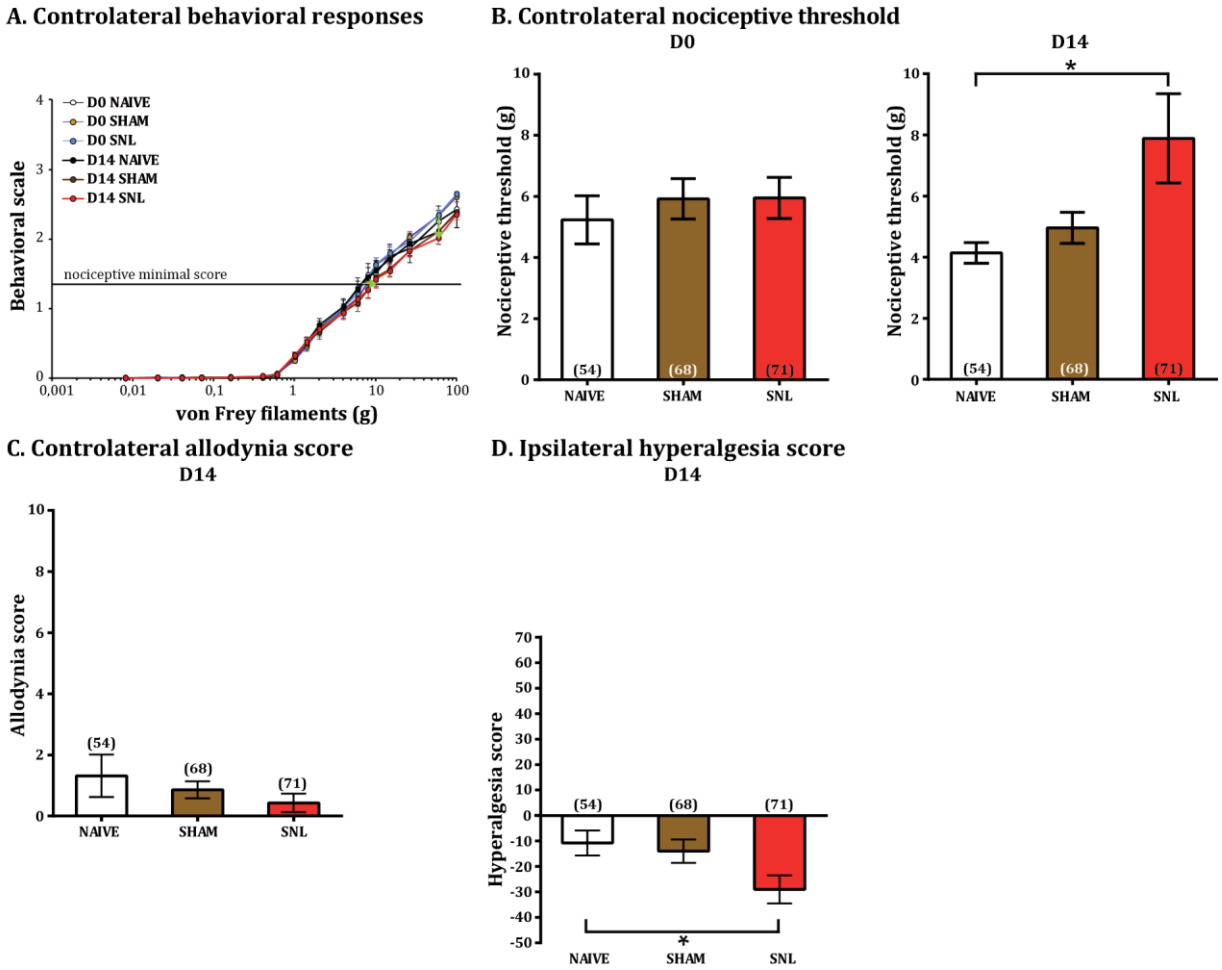


Figure 35: Suivi du seuil nociceptif et des scores d'allodynie et d'hyperalgésie au niveau de la patte arrière controlatérale des animaux. En A est présenté le graphique des réponses moyennes obtenues à l'application de chaque filament de von Frey pour la patte arrière controlatérale (côté non ligaturé ; patte gauche) de chaque condition à J0 et J14. La ligne noire horizontale correspond au score minimal nociceptif à 1,2.On note que la courbe à J14 pour les animaux SNL est légèrement décalée vers la droite (petite flèche verte horizontale) et vers le bas (flèche verte verticale) par rapport à celle de J0. En B sont présentés les seuils nociceptifs de la patte arrière controlatérale. Il n'existe pas de différence entre les trois conditions à J0. En revanche, à J14, le seuil nociceptif obtenu chez les animaux SNL est significativement plus élevé que celui obtenu chez les animaux naïfs. Le calcul du score d'allodynie, en C, ne montre pas de modification entre les conditions à J14. En revanche, en D, les animaux SNL présentent un score d'hyperalgésie pour la patte arrière controlatérale significativement inférieur à celui des animaux naïfs. Les animaux SNL diminuent leurs réponses douloureuses à J14 pour des filaments déjà douloureux à J0. (*, p<0,05)

A.2- Douleurs ambulatoires

Le second test comportemental utilisé dans l'étude est le test de distribution pondérale dynamique. Ce test permet d'étudier le comportement des animaux lorsque ceux-ci sont libres de leurs mouvements. Grâce aux capteurs présents dans le sol de la cage, à la caméra et au logiciel, il permet de connaître le poids porté par les différentes pattes de l'animal. Ce test nous permet ainsi de déceler le développement de douleurs ambulatoires. Le test de distribution pondérale dynamique est effectué à J0 avant la chirurgie et à J14 avant le sacrifice.

Quelle que soit la patte étudiée, il n'existe pas de différence dans la répartition du poids entre les différentes conditions expérimentales à J0 avant la chirurgie (Fig. 36, A patte arrière ipsilatérale D0, B patte arrière controlatérale D0, C patte avant ipsilatérale D0, D patte avant controlatérale D0). Par contre le poids porté par la patte arrière ipsilatérale des animaux SNL à J14 (27,7% ± 1,0) est significativement moindre que celui porté par la même patte chez les animaux naïfs (38,4% ± 1,5) et les animaux Sham (35,5% ± 1,0) (Fig. 36, A, D14). Les animaux SNL reportent le poids non porté par la patte arrière ipsilatérale sur la patte arrière controlatérale ainsi que sur la patte avant ipsilatérale (Fig. 36, B, D14 et C, D14). De plus, les animaux sham augmentent légèrement leur poids porté sur la patte arrière controlatérale sans pour autant modifier significativement la répartition de leur poids sur les autres pattes.

Ainsi, le test de distribution pondérale dynamique a permis de montrer le développement de douleurs ambulatoires dans le modèle SNL de douleurs neuropathiques à J14.

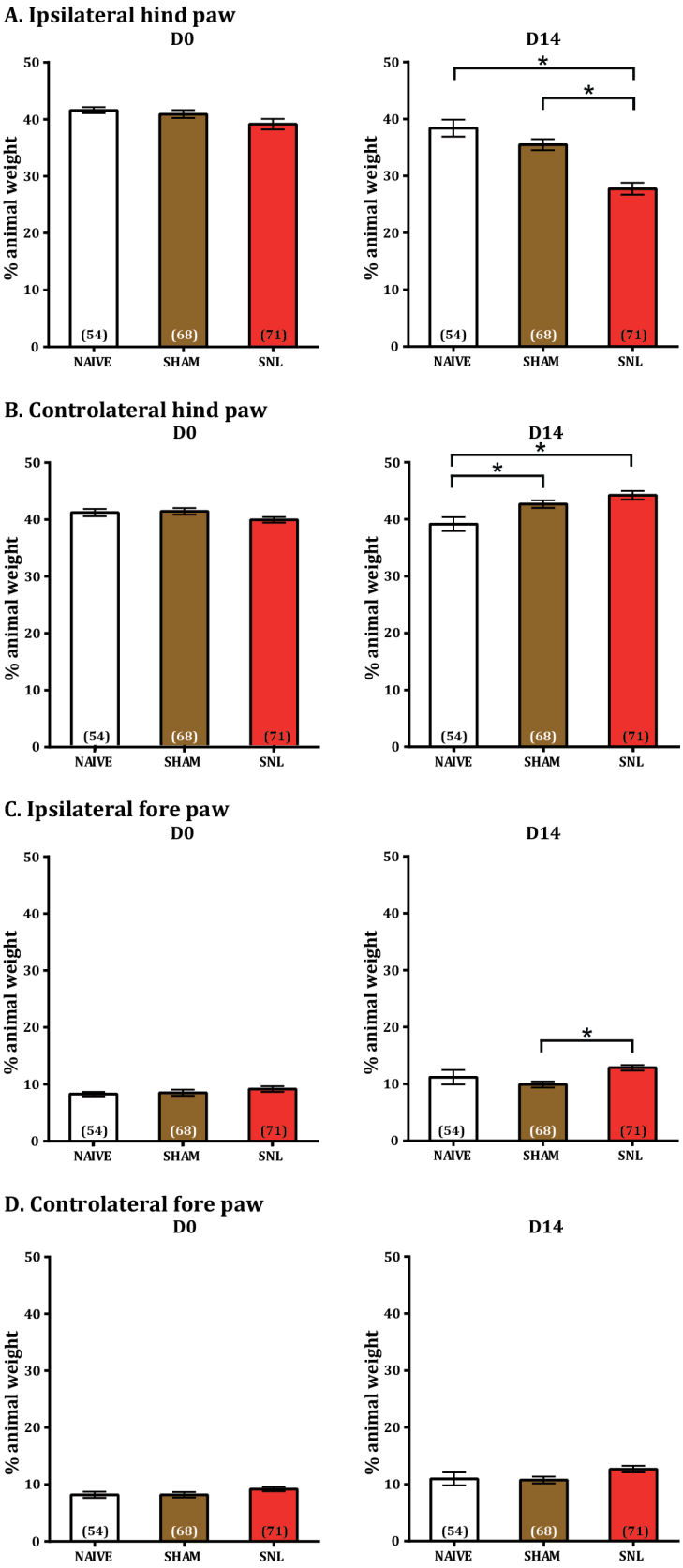


Figure 36 : Développement de douleurs ambulatoires chez les animaux SNL.

En A, le poids porté par la patte arrière ipsilatérale (droite) des animaux des trois groupes expérimentaux ne présente pas de différence significative à J0. En revanche, à J14, le poids porté par la patte arrière ispilatérale des animaux SNL est significativement diminué comparé à celui mesuré chez les naïfs et les sham. En B, on note qu'il n'existe toujours pas de différence entre les groupes expérimentaux à J0 mais on remarque que le poids porté par la patte arrière controlatérale (gauche) des animaux SNL et sham est plus élevé que celui des animaux naïfs à J14. Ainsi, les animaux SNL reportent leur poids sur la patte arrière opposée. Les animaux sham quant à eux s'appuient plus sur leur patte arrière controlatérale. En C, le poids porté par la patte avant ipsilatérale des animaux des trois groupes expérimentaux ne présente pas de différence significative à J0. En revanche, on note une augmentation significative du poids porté par la patte ipsilatérale des animaux SNL comparé aux animaux sham. Ainsi, les animaux SNL reportent également leur poids sur leur patte ipsilatérale avant. En D, le poids porté par la patte avant controlatérale des animaux des trois groupes expérimentaux ne présente pas de différence significative à J0 ni à J14.

(*, $p<0,05$)

Dans cette première partie, notre étude a mis évidence le développement des symptômes d'allodynie et d'hyperalgésie mécaniques ainsi que de douleurs ambulatoires pour les animaux SNL quatorze jours après la chirurgie de ligature. Les animaux SNL développent des symptômes caractéristiques des douleurs neuropathiques. Cette première partie a également mis en évidence la présence d'une légère hyperalgésie chez les animaux sham quatorze jours après leur opération sans ligature. Les animaux sham présentent donc un comportement douloureux différent des animaux naïfs mais également différents des animaux SNL.

B- Des signes de réactivité microgliale thalamique par approche de qRT-PCR

Le but de ce travail de thèse consiste à étudier les cellules astrocytaires et microgliales thalamiques en condition de douleurs neuropathiques dans le modèle animal SNL. En ce qui concerne les noyaux thalamiques j'ai décidé de m'intéresser à des noyaux appartenant aux trois groupes de noyaux thalamiques impliqués dans l'intégration de l'information nociceptive : le groupe latéral, le groupe médian et le groupe des noyaux intralaminaires. Je me suis ainsi focalisée d'une part sur le noyau VPL, principal centre d'intégration de la composante sensori-discriminative de la nociception (groupe latéral) et d'autre part sur le noyau DM (groupe médian) et sur les noyaux intralaminaires pris dans leur ensemble (IL), principaux centres d'intégration de la composante affective et émotionnelle de la nociception. Le noyau VPM a été choisi comme structure contrôle puisqu'il ne reçoit des informations somesthésiques qu'en provenance de la tête et du crâne, zones *a priori* non affectées par la ligature des nerfs spinaux L5 et L6. Pour caractériser les cellules gliales dans ces noyaux thalamiques, j'ai tout d'abord étudié l'expression des ARNm de plusieurs gènes connus pour être des gènes astrocytaires, microgliaux ou encore des gènes considérés comme des marqueurs de réactivité gliale. Cette étude a été réalisée en deux temps. Dans un premier temps, j'ai analysé l'expression des ARNm de 54 gènes différents sur des prélèvements de tissus thalamiques latéraux (controlatéral et ipsilatéral) mais également centraux. Les prélèvements de tissus thalamiques latéraux ne sont

bien sûr pas strictement constitués des noyaux VPL/VPM et ceux des tissus thalamiques centraux ne sont pas strictement constitués des noyaux DM et IL. De fait, cette première approche permet d'obtenir une vision générale des modifications qui pourraient exister en condition de douleurs neuropathiques dans la « zone thalamique » latérale ou centrale. Afin d'accéder à l'expression plus localisée et précise des ARNm, j'ai dans un second temps utilisé une technique de microdissection laser. Elle me permet d'étudier l'expression de l'ARNm de 9 gènes différents au sein d'une part des noyaux VPL controlatéral et ipsilatéral et d'autre part des noyaux VPM controlatéral et ipsilatéral. Cette approche permet d'étudier l'expression de l'ARNm au sein d'un seul noyau, mais la quantité de matériel génomique ne permet de tester qu'un nombre limité de gènes (Matériels et Méthodes partie IV pour plus de détails méthodologiques).

B.1- qRT-PCR sur prélèvements de tissus thalamiques

Dans cette première partie, j'ai étudié l'expression différentielle de 54 gènes. Ces gènes peuvent être regroupés en différentes catégories. Tout d'abord il y a les gènes astrocytaires codant pour les protéines GFAP, S100β, GS, AQP-4, Aldh1L1, vimentine (VIM), nestine (NES), Cx43, Cx30, GLT-1, GLAST, SRR, DAAO, MCT-4, P2Y1R, P2Y6R et CXCL12. Ensuite il y a les gènes microgliaux codant pour les protéines CD11b, Iba-1, TLR4, CTSS, CX3CL1, CX3CR1, CD44, CD86, CSF1, CSF1R, Itgβ2, P2X1R, P2X4R, P2X7R, P2Y5R, P2Y12R, P2Y13R, CCL2 et CCL21. On notera que j'ai assigné CX3CL1 à la liste des marqueurs microgliaux alors que CX3CL1 est présente à la membrane des neurones. En effet cette molécule est impliquée dans la communication microglie-neurone parce qu'elle est clivée par la CTSS microgliale en fractalkine soluble qui peut alors agir sur la microglie qui exprime des récepteurs CX3CR1 spécifiques. Ces faits expliquent mon choix de classification. Ensuite il y a les gènes qui sont à la fois astrocytaires et microgliaux et qui codent pour les protéines TLR3 et FGFR3. Et enfin il y a des gènes qui codent pour des protéines connues pour subir des modifications de leur expression en condition de réactivité gliale : IL1β, IL6, IL10, IL34, MAPK8, MMP2, NFκBIA, NGF, BDNF, GDNF, COX-2, PTPRC, TNFα, NTF-3, NTF-4 et FGF2. On se réfèrera au tableau n°6 pour savoir à quoi correspondent ces différentes molécules et au tableau n°5 des matériels et méthodes qui explicite les abréviations. Dans cette

première partie, les résultats obtenus pour 2 des 54 gènes testés n'ont pas pu être exploités soit à cause d'une erreur de manipulation pour le gène DAAO soit en raison de sa trop faible expression dans les échantillons prélevés pour le gène CCl21. Cette partie présente donc l'expression de l'ARNm de 52 gènes différents.

L'expression de l'ARNm de chacun de ces gènes a été quantifiée dans des prélèvements thalamiques latéraux (controlatéraux et ipsilatéraux) et centraux. Dans un premier temps, j'ai réalisé, pour chacun des types de prélèvement, une représentation mosaïque de l'ensemble des ΔCt obtenus pour chacun des ARNm testés afin de visualiser l'intégralité des résultats obtenus et pour pouvoir en extraire des tendances générales. Le code couleur (jaune pour une forte expression de l'ARNm et violet pour une faible expression de l'ARNm) permet d'avoir une vue globale. Dans un second temps, des différences significatives entre les conditions expérimentales ont été recherchées via une analyse de variance. Enfin, j'ai recherché l'existence d'une corrélation entre l'expression de l'ARNm d'un gène donné et l'intensité des symptômes douloureux (seuil nociceptif ou score d'allodynie ou score d'hyperalgésie ou poids porté par la patte arrière ipsilatérale).

GFAP	protéine des filaments intermédiaires GFAP
S100β	protéine chélatrice de calcium
GS	glutamine synthase, enzyme qui transforme le glutamate en glutamine
AQP-4	aquaporine-4, canal hydrique
ADH1L1	enzyme qui transforme le 10-formyltétrahydrofolate en tétrahydrofolate
VIM	vimentine, protéine des filaments intermédiaires
NES	nestine, protéine des filaments intermédiaires
CX43	connexine 43
CX30	connexine 30
GLT-1	transporteur du glutamate
GLAST	transporteur du glutamate
SRR	sérine racémase, enzyme de sythèse de la D-sérine
DAAO	D-amino acide oxydase , enzyme de dégradation de la D-sérine
MCT-4	transporteur monocarboxylique de type 4 (transporteur de lactate)
P2Y1R	récepteur métabotropique 1 de l'ATP
P2Y6R	récepteur métabotropique 6 de l'ATP
CXCL12	chémokine (C-X-C motif) 12
TLR3	récepteur toll like 3
FGFR3	récepteur du facteur de croissance fibroblastique 3
CD11b	récepteur du complément ou intégrine α M
Iba-1	protéine chélatrice de calcium
TLR4	récepteur toll like 4
CTSS	cathepsine S
CX3CL1	fractalkine
CX3CR1	récepteur de la fractalkine
CD44	cluster de différenciation 44 (intéraction cellulaire)
CD86	cluster de différenciation 86 (régulation de l'activation des lymphocytes T)
CSF1	facteur 1 de stimulation de colonies (cytokine)
CSF1R	récepteur du facteur 1 de stimulation de colonies
Itgβ2	intégrine G β 2
P2X1R	récepteur ionotropique 1 de l'ATP
P2X4R	récepteur ionotropique 4 de l'ATP
P2X7R	récepteur ionotropique 7 de l'ATP
P2Y5R	récepteur métabotropique 5 de l'ATP
P2Y12R	récepteur métabotropique 12 de l'ATP
P2Y13R	récepteur métabotropique 13 de l'ATP
CCL2	chémokine (C-C motif) ligand 2
IL1β	interleukine 1β
IL6	interleukine 6
IL10	interleukine 10
IL34	interleukine 34
MAPK8	kinase phosphorylant c-Jun (voie de signalisation intracellulaire)
MMP2	métalloprotéase 2
NFκBIA	inhibiteur du facteur nucléaire κB
NGF	facteur de croissance des nerfs
BDNF	facteur neurotrophique dérivé du cerveau
GDNF	facteur neurotrophique dérivé de la glie
COX-2	prostaglandine-endoperoxyde synthase 2
PTPRC	cluster de différenciation 45 (régulation de nombreux processus cellulaires)
TNFα	facteur de nécrose tumorale α
NTF-3	neurotrophine 3
NTF-4	neurotrophine 4
FGF2	facteur de croissance fibroblastique 2

Tableau 6 : Liste des marqueurs utilisés pour les expériences de qRT-PCR. En bleu clair les marqueurs astrocytaires, en bleu-violet les marqueurs astrocytaire et microgliaux, en violet les marqueurs microgliaux et en raisin les autres marqueurs de réactivité.

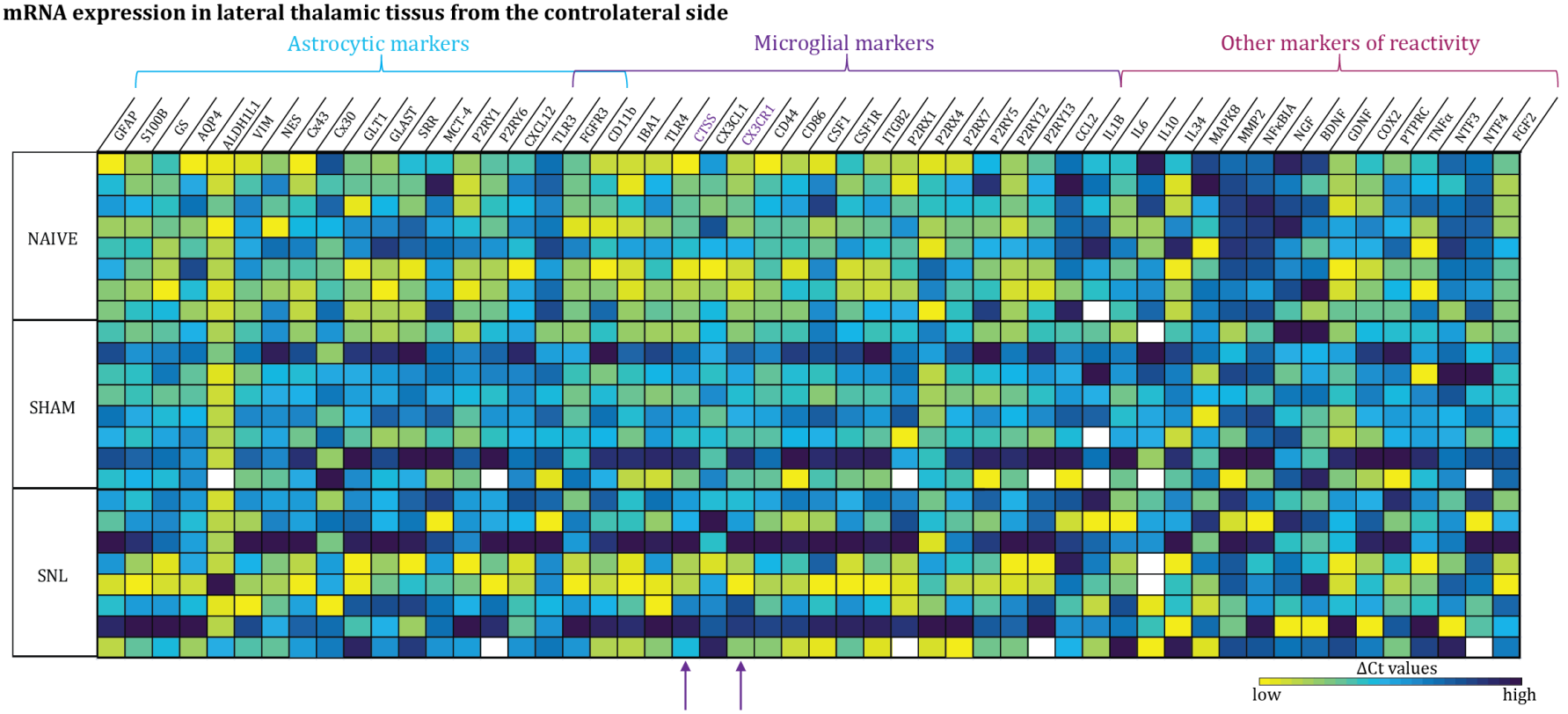
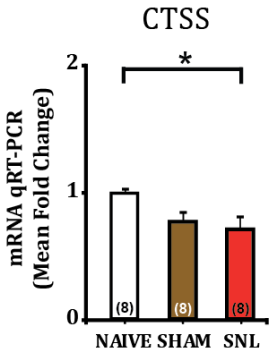


Figure 37 : Représentation mosaïque de l'expression des ARNm des 52 gènes testés sur des prélèvements de tissus thalamiques latéraux du côté controlatéral à J14. Le tableau représente le ΔCt= $Ct_{(gène\ testé)}$- $Ct_{(gènes\ de\ référence)}$ obtenu pour chaque gène et chaque animal. Plus le ΔCt est petit plus l'expression de l'ARNm est forte, plus il est grand plus l'expression de l'ARNm est faible. Le code couleur du jaune (forte expression de l'ARNm) au violet (faible expression de l'ARNm) permet une représentation visuelle de l'ensemble des résultats obtenus. Les flèches correspondent aux gènes qui présentent des différences significatives entre les conditions expérimentales et qui sont présentés dans la figure suivante. Dans le thalamus latéral du côté controlatéral, il semble y avoir une tendance à une moindre expression de l'ensemble des ARNm des marqueurs astrocytaires et microgliaux chez les animaux SNL et sham. Les autres marqueurs de réactivité ne présentent pas de tendance globale, sauf peut-être une tendance à une moindre expression chez les animaux naïfs pour les gènes MAPK8, MMP2, NFκBIA, NGF et BDNF comparé aux animaux SNL (SNL, sham et naïfs : n=8, sauf pour certains gènes où il y a eu des problèmes expérimentaux = case blanche).

Sur la figure 37, on note une tendance générale à une moindre expression des marqueurs astrocytaires et microgliaux dans les tissus thalamiques latéraux du côté controlatéral des animaux sham et SNL comparée à celle des animaux naïfs. En revanche, l'analyse statistique n'a révélé que peu de différences significatives. Ainsi, on note une diminution significative de l'expression de l'ARNm de la CTSS chez les animaux SNL comparée à celle des animaux naïfs (diminution de 28%; Fig. 38, A1). On remarque que l'expression de l'ARNm de la CTSS n'est pas très différente entre les animaux sham et SNL mais il n'existe cependant pas de différence significative entre les animaux sham et naïfs. De plus, il existe une diminution significative de l'expression de l'ARNm codant pour le récepteur à la fractalkine CX3CR1 chez les animaux sham comparée à celle obtenue chez les animaux naïfs (diminution de 26% Fig. 38, A2). On notera là encore qu'il n'existe pas de différence significative entre les animaux SNL et naïfs, bien que l'expression de l'ARNm de CX3CR1 chez les animaux SNL soit similaire à celle des animaux sham. La barre d'erreur plus grande chez les animaux neuropathiques pourrait être la raison de ce résultat.

En ce qui concerne les tissus thalamiques latéraux du côté ipsilatéral, la représentation mosaïque permet d'observer une tendance générale à une augmentation de l'expression de l'ARNm de plusieurs gènes des différentes catégories chez les animaux SNL comparée à celle observée chez les animaux naïfs (Fig. 39). Les analyses statistiques n'ont révélé qu'une seule différence significative entre les trois conditions expérimentales : une augmentation significative de l'expression de l'ARNm codant pour NFκBia chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs (augmentation de 28% ; Fig. 40). On remarque que les animaux sham ont une expression de l'ARNm codant pour NFκBia très proche de celle des animaux naïfs, sans pour autant présenter de différence significative avec les animaux SNL.

A1. CTSS mRNA expression in lateral thalamic tissus from the controlateral side



A2. CX3CR1 mRNA expression in lateral thalamic tissus from the controlateral side

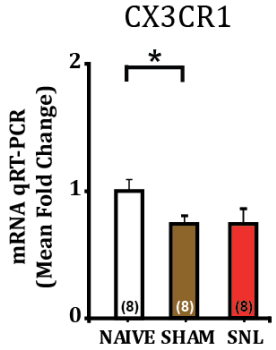


Figure 38 : Diminution significative dans les tissus thalamiques latéraux du côté controlatéral de l'expression de l'ARNm des gènes microgliaux codant pour la CTSS et CX3CR1 chez les animaux SNL et sham respectivement comparés aux animaux naïfs à J14. Les graphiques représentent le facteur de variation ou fold change ($FC = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ où $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{condition d'intérêt})} - \Delta Ct_{(\text{condition de référence})}$. La condition de référence est ici la condition « animaux naïfs ». L'expression de l'ARNm de la CTSS est significativement moins importante chez les animaux neuropathiques que chez les animaux naïfs (A1). On remarque que l'expression de l'ARNm codant pour ce gène chez les animaux sham est très proche de celle des animaux SNL, mais n'est tout de même pas significativement différente de celle des animaux naïfs. De plus, l'expression de l'ARNm codant pour CX3CR1 est significativement plus faible chez les animaux sham comparé aux animaux naïfs. On remarque que l'expression de cet ARNm chez les animaux SNL est très proche de celle des animaux sham, mais n'est pas significativement différente de celle des animaux naïfs (A2 ; SNL, sham et naïfs : n=8 ; *, $p<0,05$).

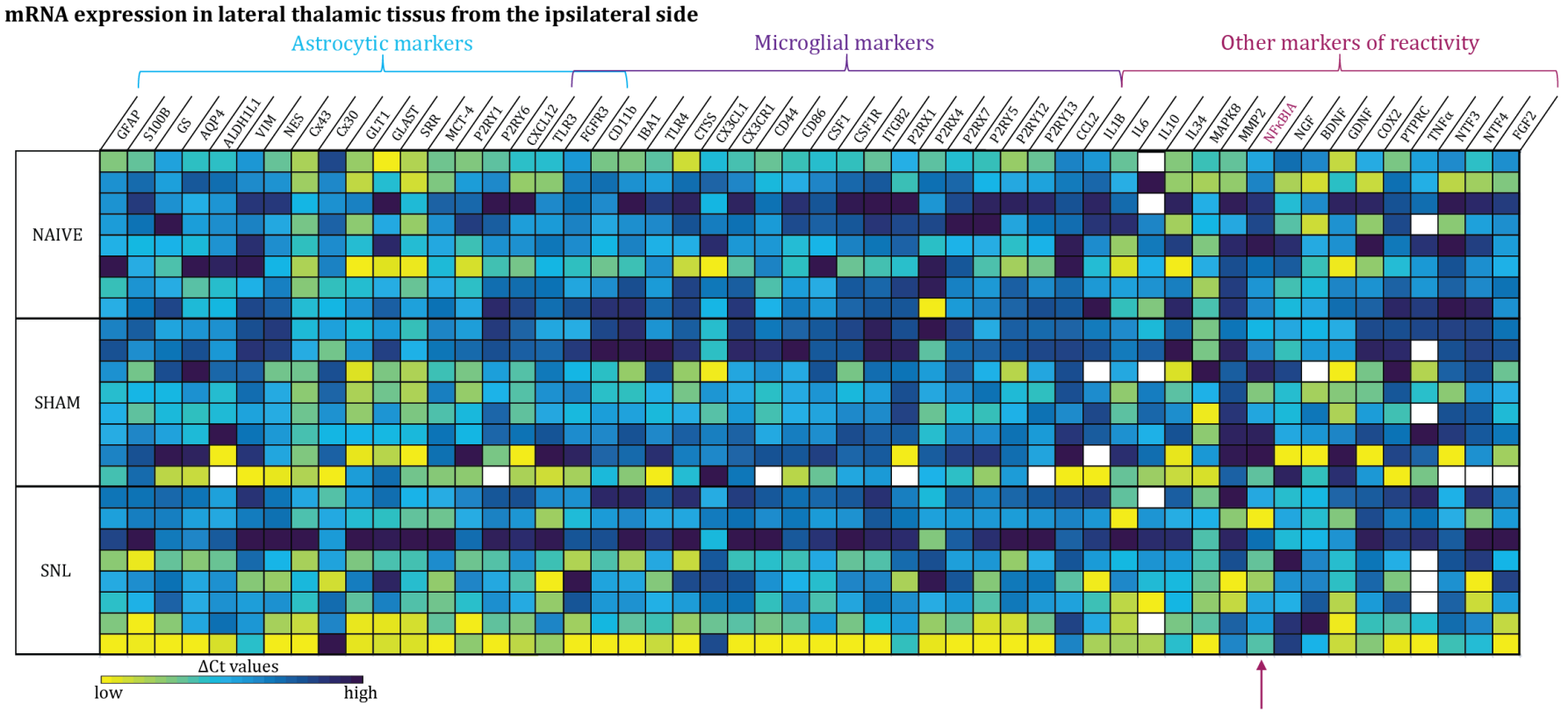


Figure 39 : Représentation mosaïque de l'expression des ARNm des 52 gènes testés sur les tissus thalamiques latéraux du côté ipsilatéral à J14. Le tableau représente le ΔCt= $Ct_{(gène\ testé)}$- $Ct_{(gènes\ de\ référence)}$ pour chaque animal et chaque gène testé. Plus le ΔCt est petit plus l'expression de l'ARNm est forte, plus il est grand plus l'expression de l'ARNm est faible. Le code couleur du jaune (forte expression de l'ARNm) au violet (faible expression de l'ARNm) permet une représentation visuelle de l'ensemble des résultats obtenus. La flèche correspond au gène qui présente une différence significative entre les conditions expérimentales et qui sera présenté dans la figure suivante. De manière générale, on note que dans le thalamus ispilatéral il semble y avoir une tendance générale à une augmentation de l'expression de l'ARNm de plusieurs gènes des différentes catégories chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs. (SNL, sham et naïfs : n=8, sauf pour certains gènes où il y a eu des problèmes expérimentaux = case blanche).

NFκBia mRNA expression in lateral thalamic tissus from the ipsilateral side

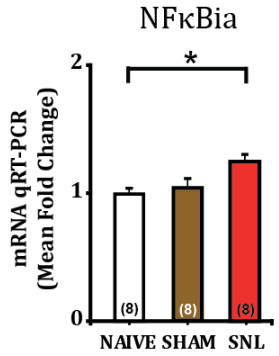


Figure 40 : Augmentation significative dans les tissus thalamiques latéraux du côté ipsilatéral de l'expression de l'ARNm du gène codant pour NFκBia chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs à J14. Le graphique représente le facteur de variation ou fold change ($FC= 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ où $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(condition\ d'intérêt)} - \Delta Ct_{(condition\ de\ référence)}$. La condition de référence est « animaux naïfs ». L'expression de l'ARNm de NFκBia est significativement plus importante chez les animaux neuropathiques que chez les animaux naïfs. On remarque que l'expression de l'ARNm codant pour ce gène chez les animaux sham est très proche de l'expression des animaux naïfs, mais n'est pas différente significativement de celle des animaux SNL (SNL, sham et naïfs : n=8 ; *, $p<0,05$).

Dans les tissus thalamiques latéraux, seules quelques différences significatives ont été mises en évidence : une diminution de l'expression de l'ARNm de la CTSS et une augmentation de celle de NFκBia chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs dans les tissus provenant du côté controlatéral et ipsilatéral respectivement ainsi qu'une diminution du côté controlatéral de l'expression de l'ARNm codant pour CX3CR1, le récepteur de la fractalkine, chez les animaux sham comparés aux animaux naïfs. Ces résultats m'ont beaucoup surprise. Tout d'abord, au vu de la littérature abondante sur les sur-expressions d'ARNm de marqueurs astrocytaires et microgliaux au niveau spinal dans le modèle SNL, je m'attendais à trouver un nombre conséquent de variations significatives au niveau thalamique parmi les différents gènes testés. Ensuite, j'ai été surprise que parmi le faible nombre de différences significatives, une soit retrouvée au niveau du thalamus ipsilatéral. En effet les neurones de projection de la moelle épinière sont connus pour projeter majoritairement sur le thalamus latéral du côté controlatéral. Enfin, j'ai été surprise par le fait que les animaux sham présentent également des modifications de l'expression de l'ARNm d'un gène codant pour un marqueur microglial. Ainsi, la chirurgie par elle-même ne semble pas exempte d'effet sur l'expression de certains gènes codant pour des protéines gliales.

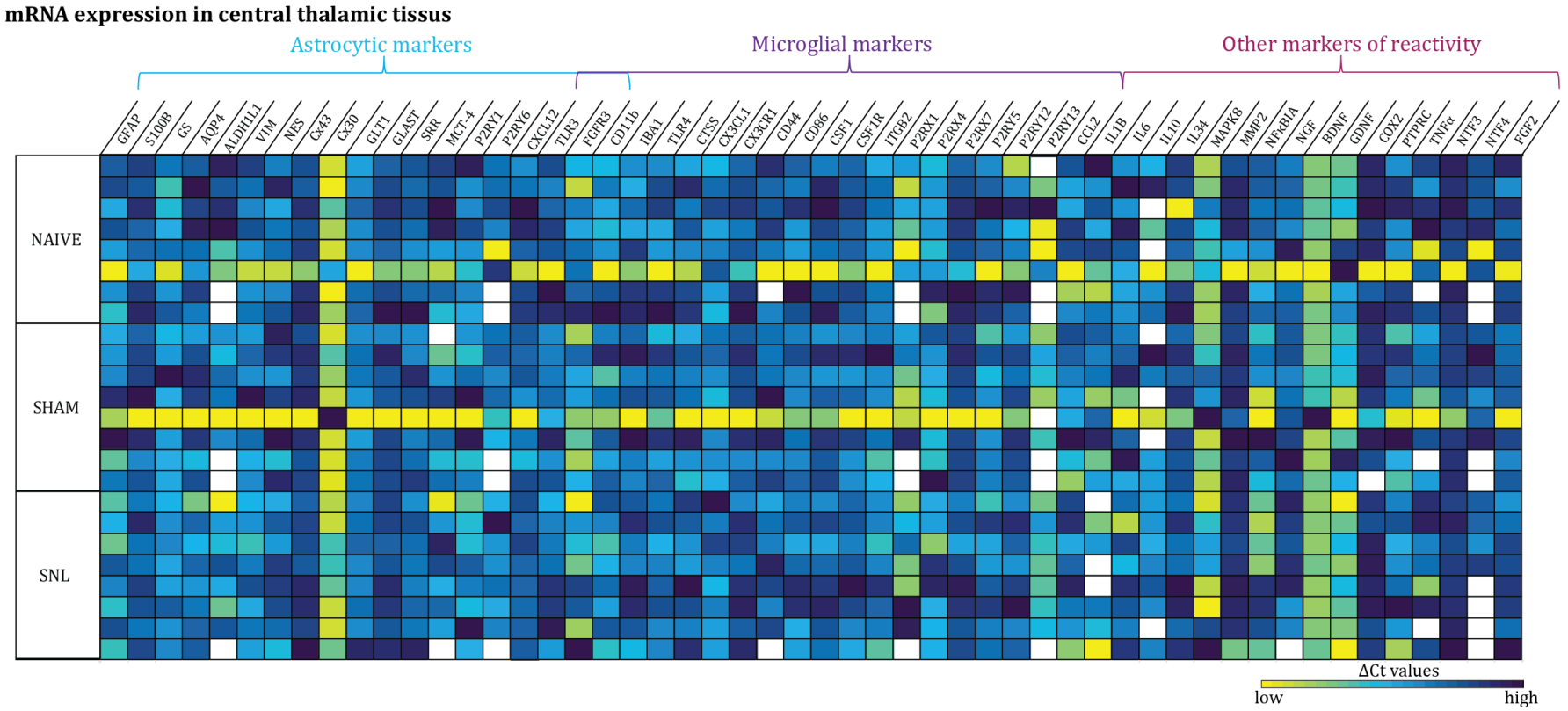


Figure 41 : Représentation mosaïque de l'expression des ARNm des 52 gènes testés sur les tissus thalamiques centraux à J14. Le tableau représente le ΔCt= $Ct_{(gène\ testé)}$- $Ct_{(gènes\ de\ référence)}$ pour chaque animal et chaque gène testé. Plus le ΔCt est petit plus l'expression de l'ARNm est forte, plus il est grand plus l'expression de l'ARNm est faible. Le code couleur du jaune (forte expression de l'ARNm) au violet (faible expression de l'ARNm) permet une représentation visuelle de l'ensemble des résultats obtenus pour chaque ARNm. Il ne semble pas y avoir de tendance globale particulière quelle que soit la catégorie d'ARNm testée (SNL, sham et naïfs : n=8, sauf pour certains gènes où il y a eu des problèmes expérimentaux = case blanche).

En ce qui concerne les tissus thalamiques centraux, aucune tendance ne se dégage de l'observation de la représentation en mosaïque de l'expression de l'ARNm des 52 gènes testés (Fig. 41). De plus l'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative : aucun gène n'est exprimé différemment entre les trois groupes expérimentaux.

Ainsi, ces expériences de qRT-PCR ont pu mettre en évidence qu'il n'existait pas d'altération massive de l'expression de l'ARNm des 52 gènes testés en condition de douleurs neuropathiques. En effet j'ai seulement mis en évidence des signes ténus d'altération de l'expression de l'ARNm codant pour les protéines CTSS et CX3CR1 dans le thalamus controlatéral et NFκBia dans le thalamus ipsilatéral. Face à de tels résultats, je me suis demandée si mon mode de prélèvement n'avait pas entraîné un biais. En effet, le prélèvement de tissus thalamiques, bien que très utile pour tester un grand nombre de gènes, ne permet pas une étude qui cible uniquement le thalamus ni qui cible spécifiquement un seul noyau thalamique (Fig. 25, Matériels et Méthodes). Ainsi, il est possible que des modifications très localisées de l'expression de l'ARNm des marqueurs gliaux puissent être « diluées » dans de tels prélèvements. Il m'est donc apparu nécessaire de mieux cibler mes prélèvements. Comme je n'ai détecté que quelques variations d'expression dans le thalamus latéral j'ai décidé de me focaliser sur le noyau VPL, présent dans le thalamus latéral et principal site d'intégration de la composante sensori-discriminative de la nociception, ainsi qu'à titre de contrôle sur le noyau VPM qui permet l'intégration des informations nociceptives en provenance de la tête et du crâne. Pour mieux cibler mes prélèvements j'ai opté pour la microdissection laser des noyaux d'intérêt sur des coupes au cryostat très légèrement colorées au crésyl violet (Fig. 26 des matériels et méthodes). Les noyaux VPL et VPM contro- et ipsilatéraux ont donc été prélevés par microdissection au laser et les ARNm présents dans ces structures ont été quantifiés.

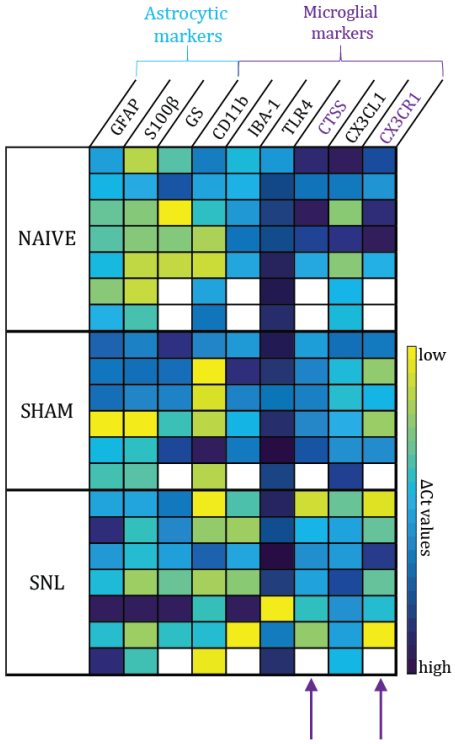
B.2- qRT-PCR sur tissus thalamiques obtenus par microdissection laser

Cette technique cible un noyau thalamique et, de ce fait, la quantité d'ARN totaux extraits des tissus est beaucoup plus faible. Ainsi, le nombre de gènes testés dans cette partie est de 9. Il s'agit des marqueurs astrocytaires GFAP, S100β et GS et des marqueurs microgliaux CD11b, Iba-1, TLR4, CTSS, CX3CL1 et CX3CR1. On constatera que malheureusement le gène codant pour NFκBia n'a pas été testé.

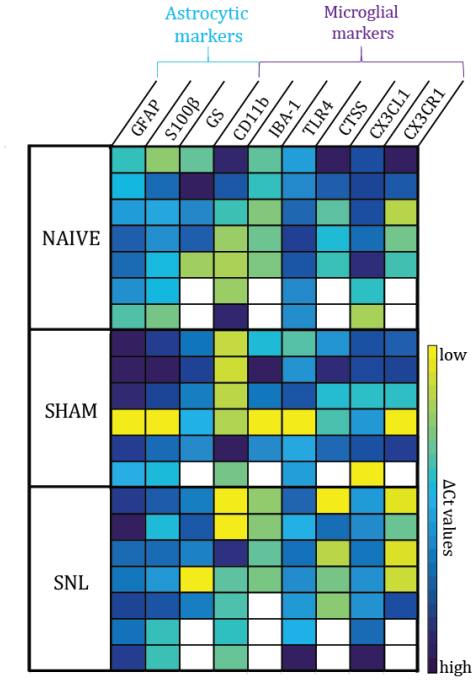
L'étude de l'expression de ces marqueurs dans le noyau VPL controlatéral a révélé une augmentation significative de l'expression de l'ARNm codant pour la CTSS chez les animaux neuropathiques comparés aux animaux naïfs (augmentation de 33% ; Fig. 42, A1 et A2). La quantification a également mis en évidence une augmentation significative de l'expression de l'ARNm codant pour CX3CR1 chez les animaux neuropathiques comparés aux animaux naïfs (augmentation de 34% ; Fig. 42, A1 et A2). On notera que l'expression de cet ARNm chez les animaux sham est intermédiaire entre celle observée chez les animaux naïfs et celle observée chez les animaux SNL. Enfin, on note une tendance à une diminution de l'expression de la GFAP dans le VPL controlatéral chez les animaux neuropathiques comparés aux animaux naïfs qui n'atteint cependant pas la significativité statistique (p=0,08).

L'étude de l'expression des marqueurs gliaux dans le noyau VPL ipsilatéral n'a pas mis en évidence de différence significative entre les trois groupes expérimentaux (Fig. 42, B). On notera cependant la tendance globale à une diminution de l'expression des ARNm codant pour GFAP et S100β chez les animaux SNL et sham comparés aux animaux naïfs.

A1. Mosaic of mRNA expression in controlateral VPL nucleus



B. Mosaic of mRNA expression in ipsilateral VPL nucleus



A2. CTSS and CX3CR1 mRNA expression in controlateral VPL nucleus

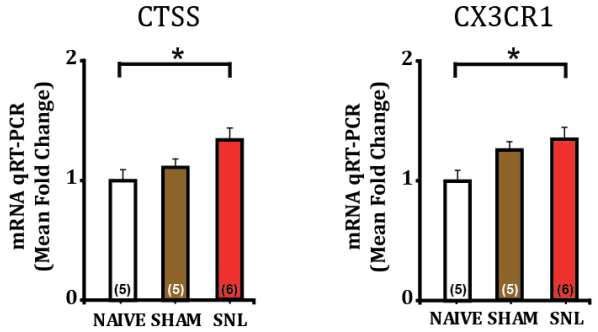


Figure 42 : Expression de l'ARNm des gènes testés sur les noyaux VPL contro- et ipsilatéral : une augmentation significative dans le VPL controlatéral de l'expression des ARNm codant pour la CTSS et CX3CR1 chez les animaux neuropathiques comparés aux animaux naïfs à J14. Les tableaux représentent le $\Delta Ct = Ct_{(gène\ testé)} - Ct_{(gènes\ de\ référence)}$ pour chaque animal et chaque gène testé. Plus le ΔCt est petit plus l'expression de l'ARNm est forte, plus il est grand plus l'expression de l'ARNm est faible. Le code couleur du jaune (forte expression de l'ARNm) au violet (faible expression de l'ARNm) permet une représentation visuelle de l'ensemble des résultats obtenus pour chaque ARNm. Les flèches correspondent aux gènes qui présentent une différence significative entre les conditions expérimentales. Les graphiques représentent le facteur de variation ou fold change ($FC = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ où $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(condition\ d'intérêt)} - \Delta Ct_{(condition\ de\ référence)}$. Les résultats obtenus dans le noyau VPL controlatéral montrent une augmentation significative de l'expression des ARNm codant pour la CTSS et CX3CR1 chez les animaux neuropathiques comparés aux animaux naïfs (A1 et A2). On note une tendance à une diminution de l'expression de la GFAP dans ce noyau chez les animaux neuropathiques comparé aux animaux naïfs qui n'atteint pas la significativité (p=0,08). Dans le noyau VPL ipsilatéral il n'existe aucune différence significative entre les trois conditions expérimentales même si une tendance à une diminution de l'expression des ARNm codant pour la GFAP et S100β semble exister entre les animaux SNL et sham comparés aux animaux naïfs (B). (SNL : n=6, sham et naïfs : n=5 , sauf pour certains gènes où il y a eu des problèmes expérimentaux = case blanche ; *, p<0,05).

De plus, l'analyse de l'expression des ARNm de la CTSS et CX3CR1 au sein du noyau VPL controlatéral a permis de mettre en évidence la présence de corrélations entre l'expression de ces ARNm et le comportement douloureux.

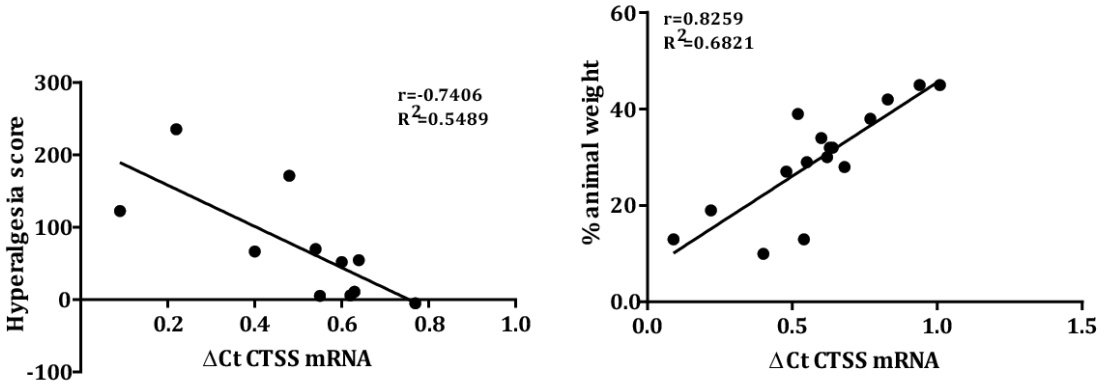
Ainsi, l'expression de l'ARNm de la CTSS présente une forte corrélation avec le score d'hyperalgésie (Fig. 43, A1). De fait, plus un animal présente un score d'hyperalgésie élevé, moins le ΔCt de l'ARNm de la CTSS est élevé et donc plus l'expression de cet ARNm est importante dans le noyau VPL controlatéral. De plus, l'expression de cet ARNm est également corrélée à la présence de douleurs ambulatoires (Fig. 43, A2). De fait, plus un animal présente des signes de douleurs ambulatoires élevés (moins de poids porté sur la patte arrière ipsilatérale), moins le ΔCt de l'ARNm de la CTSS est élevé et donc plus l'expression de cet ARNm est importante dans le noyau VPL controlatéral. Donc plus les animaux sont douloureux plus ils expriment l'ARNm de la CTSS dans le VPL controlatéral.

L'expression de l'ARNm de CX3CR1 est elle aussi corrélée aux douleurs ambulatoires. Ainsi, plus un animal présente des signes importants de douleurs ambulatoires, moins le ΔCt de l'ARNm de

CX3CR1 est élevé et donc plus l'expression de cet ARNm est importante dans le noyau VPL controlatéral.

A. CTSS mRNA expression in controlateral VPL correlated with pain behavior

A1. With hyperalgesia score **A2. With ambulatory pain**



B. CX3CR1 mRNA expression in controlateral VPL correlated with ambulatory pain

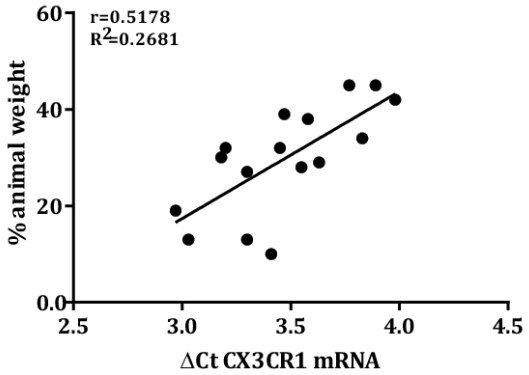


Figure 43 : Illustration des corrélations qui existent entre l'expression des ARNm codant pour la CTSS et CX3CR1 dans le noyau VPL controlatéral et le comportement douloureux des animaux à J14. L'expression de l'ARNm codant pour la CTSS est corrélée au score d'hyperalgésie (A1) et à la douleur ambulatoire (A2). Plus l'animal possède un score d'hyperalgésie élevé, moins le ΔCt est grand, donc plus l'ARNm de la CTSS est exprimé. De même, moins l'animal porte de poids sur sa patte arrière ipsilatérale plus l'ARNm de la CTSS est exprimé. De plus, l'expression de l'ARNm de CX3CR1 est également corrélée à la douleur ambulatoire (B). Moins l'animal porte de poids sur sa patte arrière ipsilatérale plus l'ARNm de la CX3CR1 est exprimé (SNL : n=6, sham et naïfs : n=5).

Ainsi, dans le noyau VPL controlatéral il existe des augmentations significatives de deux marqueurs microgliaux impliqués dans la réactivité microgliale. De plus, l'augmentation de l'expression de ces ARNm est corrélée à l'intensité des symptômes de douleurs neuropathiques : hyperalgésie mécanique et/ou douleurs ambulatoires. Ainsi, cette technique a permis de déceler

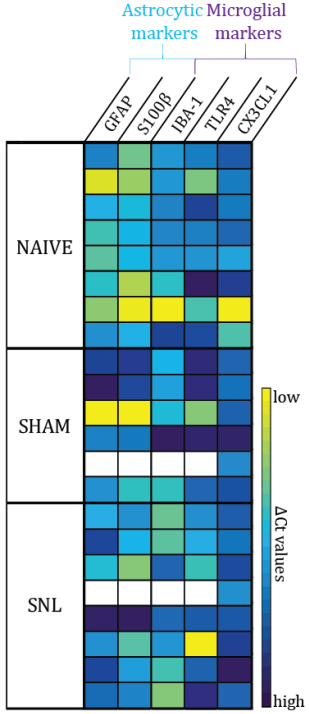
des signes de réactivité microgliale thalamique chez les animaux souffrant de douleurs neuropathiques. L'étude des noyaux VPM va permettre de savoir si les altérations qui existent dans le noyau VPL controlatéral sont spécifiques.

Pour une raison inexpliquée de nombreux problèmes expérimentaux ont été rencontrés sur les échantillons obtenus par microdissection laser du VPM. Ainsi, pour certains gènes et pour certaines conditions expérimentales, un seul échantillon a donné des résultats exploitables en qRT-PCR. Je n'ai donc gardé que les résultats qui ont été obtenus sur au moins trois animaux d'une condition expérimentale.

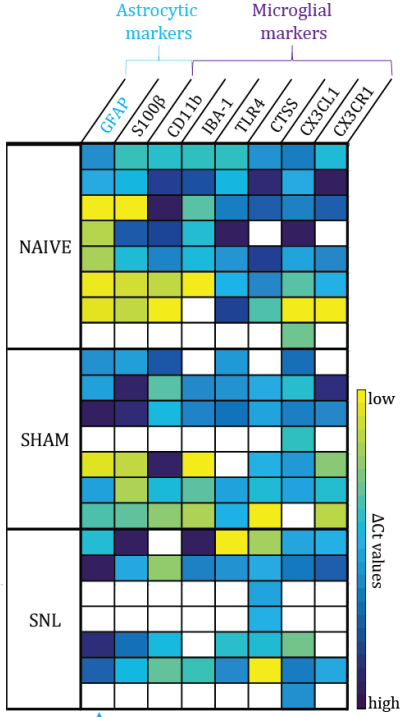
Dans le noyau VPM controlatéral, l'analyse de qRT-PCR n'a révélé aucune différence significative entre les trois conditions sur les 5 gènes testés (Fig. 44, A). Malgré tout on peut relever une tendance à une diminution de l'expression des ARNm des marqueurs astrocytaires GFAP et S100β chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs (Fig. 44, A).

Dans le noyau VPM ipsilatéral en revanche, l'étude a mis en évidence une diminution significative de l'expression de l'ARNm codant pour le marqueur astrocytaire GFAP chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs (diminution de près de 34%; Fig. 44, B1 et B2). On remarque que l'expression de l'ARNm de la GFAP des animaux sham est intermédiaire entre celle des animaux naïfs et celle des animaux SNL On notera également qu'il semble exister une tendance à une diminution de l'expression de l'ARNm codant pour le marqueur astrocytaire S100β chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs dans ce noyau VPM ipsilatéral. Ainsi, bien que le VPM soit impliqué dans l'intégration des informations somesthésiques en provenance de la sphére oro-faciale, il présente des modifications de l'expression de l'ARNm de marqueurs astrocytaires suite à une ligature de nerfs spinaux lombaires. Le VPM ne peut donc pas être considéré comme une structure contrôle dans mon étude, rôle que je lui avais assigné sur des bases bibliographiques.

A. Mosaic of mRNA expression in controlateral VPM nucleus



B1. Mosaic of mRNA expression in ipsilateral VPM nucleus



B2. GFAP mRNA expression in controlateral VPM nucleus

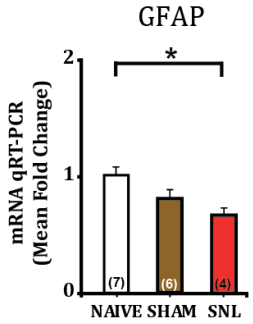


Figure 44 : Expression de l'ARNm des gènes testés sur les noyaux VPM contro- et ipsilatéral : une diminution significative dans le VPM ipsilatéral de l'expression de l'ARNm codant pour la GFAP chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs à J14. Les tableaux représentent le $\Delta Ct = Ct_{(gène\ testé)} - Ct_{(gènes\ de\ référence)}$ pour chaque animal et chaque gène testé. Plus le ΔCt est petit plus l'expression de l'ARNm est forte, plus il est grand plus l'expression de l'ARNm est faible. Le code couleur du jaune (forte expression de l'ARNm) au violet (faible expression de l'ARNm) permet une représentation visuelle de l'ensemble des résultats obtenus pour chaque ARNm. La flèche correspond au gène qui présente une différence significative entre les conditions expérimentales. Le graphique représente le facteur de variation ou fold change ($FC = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ où $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(condition\ d'intérêt)} - \Delta Ct_{(condition\ de\ référence)}$. La condition de référence est « animaux naïfs ». Dans le noyau VPM controlatéral il n'existe aucune différence significative entre les trois conditions expérimentales même si une tendance à une diminution de l'expression de l'ARNm des marqueurs GFAP et S100β semblent exister chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs (A). Dans le noyau VPM ipsilatéral en revanche il existe une diminution significative de l'expression de l'ARNm de la GFAP chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs (B1 et B2). De plus, il semble également exister une tendance à la diminution de l'expression du marqueur astrocytaire S100β chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs. On note que l'expression de l'ARNm de la GFAP des animaux sham est intermédiaire entre celle des animaux naïfs et celle des animaux SNL (SNL, sham et naïfs : $3 \leqslant n \leqslant 8$ en fonction des côtés et des gènes testés ; *, $p<0,05$).

Ainsi, l'étude de l'expression des ARNm codant pour des marqueurs astrocytaires et microgliaux dans les noyaux VPL et VPM prélevés par microdissection au laser a permis de mettre en évidence deux phénomènes. Tout d'abord l'expression de l'ARNm codant pour les marqueurs microgliaux CTSS et CX3CR1 dans le noyau VPL controlatéral est augmentée chez les animaux neuropathiques par rapport aux animaux naïfs et est corrélée positivement avec l'intensité des symptômes douloureux. Ce premier résultat est un indice de la présence d'une réactivité microgliale localisée dans le noyau VPL controlatéral suite à la ligature des nerfs spinaux. Si on compare ce résultat à celui obtenu par la technique de prélèvements de tissus thalamiques latéraux, on s'aperçoit qu'il est totalement inversé. Ceci suggère qu'il puisse exister une régulation différentielle de l'expression de l'ARNm codant pour ces marqueurs : une augmentation localisée au niveau du noyau VPL controlatéral et une diminution de cette expression autour de ce noyau. Le second phénomène observé est une diminution de l'expression de l'ARNm codant pour le marqueur astrocytaire GFAP dans le noyau VPM ipsilatéral chez les animaux neuropathiques comparés aux animaux naïfs. Il va de pair avec une tendance à la diminution de l'expression de l'ARNm codant pour le marqueur astrocytaire S100β. Ces tendances (moindre expression de l'ARNm des marqueurs astrocytaires GFAP et

S100β chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs sans atteindre la significativité) sont aussi présentes dans le VPM ipsilatéral et le VPL controlatéral et ipsilatéral.

Ainsi, dans cette première partie de l'étude des marqueurs astrocytaires et microgliaux, mon travail a pu mettre en évidence des signes de réactivité microgliale thalamique, corrélés au comportement douloureux et localisés dans le noyau VPL controlatéral. En revanche, il n'a pas mis en évidence de signe de réactivité astrocytaire thalamique. Au contraire, il semble qu'il puisse exister des phénomènes de diminution de l'expression de l'ARNm de certains marqueurs astrocytaires au sein des noyaux étudiés.

C- Diminution du nombre de cellules thalamiques exprimant des marqueurs astrocytaires et microgliaux

Afin de poursuivre l'étude de la glie thalamique dans mon modèle SNL de douleurs neuropathiques au niveau neurochimique, j'ai utilisé une approche d'immunohistofluorescence qui permet de quantifier la surface occupée et le nombre de cellules immunopositives pour les marqueurs microgliaux Iba-1, CD11b/c et CTSS et les marqueurs astrocytaires GFAP et S100β. L'étude de l'expression neurochimique de ces marqueurs a été réalisée à la fois dans des noyaux du thalamus latéral et du thalamus central (sauf pour la CTSS qui a été étudiée uniquement dans le thalamus latéral). Dans le thalamus latéral j'ai étudié le noyau VPL, la sous-région du VPL (SSR) ainsi que le noyau VPM. La sous-région du noyau VPL correspond à la zone de projection des afférences en provenance des pattes arrière (voir Fig. 11). Pour le VPL et sa SSR ainsi que pour le VPM, les analyses ont été réalisées du côté controlatéral et ipsilatéral. Dans le thalamus central j'ai étudié les noyaux DM et IL. La zone délimitée pour étudier les noyaux IL (voir Fig. 29) englobe les noyaux PC, CM et CL (voir Fig 27), le dernier noyau des IL, le Pf, est localisé plus caudalement par rapport à mes coupes. Pour ces noyaux centraux, le côté ipsilatéral et le côté controlatéral n'ont pas été distingués. Tous les noyaux cités ont été analysés pour la surface occupée par les différents immunomarquages (VPL, SSR, VPM, DM et IL). Le nombre de cellules immunomarquées a été quantifié dans les SSR ipsi- et controlatérales.

C.1- Les cellules microgliales : approche immunohistochimique

C.1.1- Surface occupée par les immunomarquages microgliaux et nombre de cellules immunopositives dans un plan focal

Les immunomarquages sont réalisés sur des coupes de 30µm d'épaisseur selon les protocoles décrits dans la partie Matériels et méthodes partie V.B. Les images acquises au microscope spinning disk sur un seul plan focal sont quantifiées à l'aide du logiciel MetaMorph (Matériels et Méthodes, VI. A1 et B1.).

C.1.1.1 Immunomarquage de la protéine microgliale Iba-1

L'immunomarquage de la protéine Iba-1 dans le thalamus est un marquage cellulaire globalement réparti de manière homogène au sein du thalamus (Fig. 45, A). Le marquage cellulaire est présent dans le cytoplasme de la cellule microgliale jusque dans les principaux prolongements de la cellule (Fig. 45, C). Les noyaux thalamiques latéraux (du côté controlatéral sur les images) sont délimités comme illustré figure 45 (A, B) pour permettre les quantifications de l'immunomarquage.

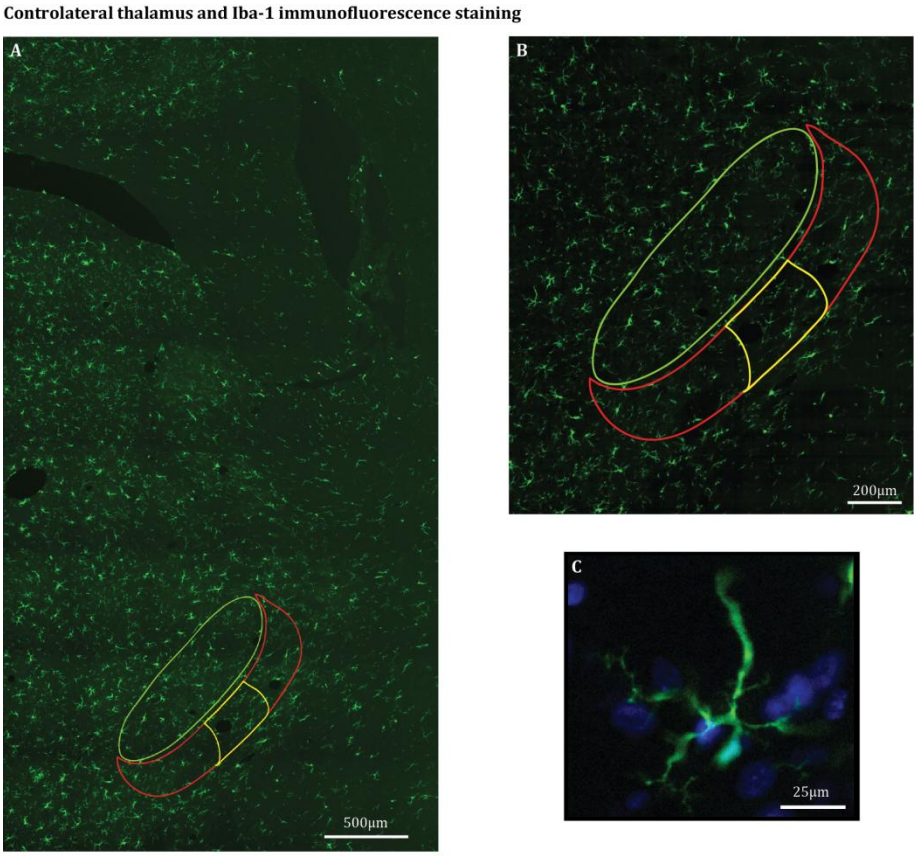
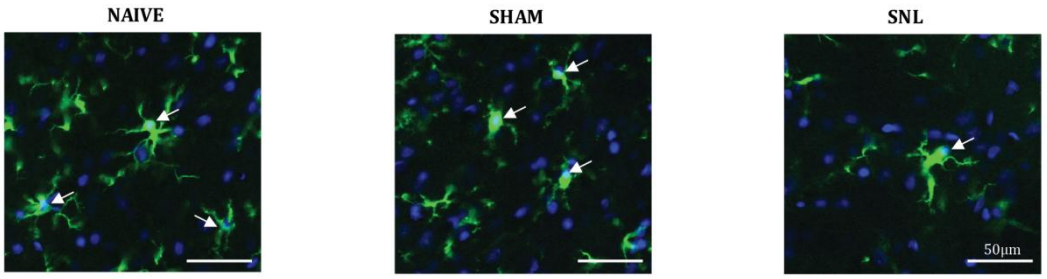


Figure 45 : Immunomarquage Iba-1 dans le thalamus controlatéral. L'immunomarquage de la protéine Iba-1 est visualisé en vert. Il s'agit d'un marquage cellulaire réparti de manière homogène ici illustré au sein du thalamus controlatéral (A, B agrandissement de A). Les noyaux VPL (en rouge), la sous-région du VPL (SSR ; en jaune) et le VPM (en vert) sont délimités comme illustré en A et B afin d'effectuer les quantifications nécessaires. La protéine Iba-1 est une protéine présente dans le cytoplasme du corps cellulaire (colocalisation avec le marquage DAPI visualisé par la couleur turquoise) et des prolongements ramifiés de la cellule microgliale (C).

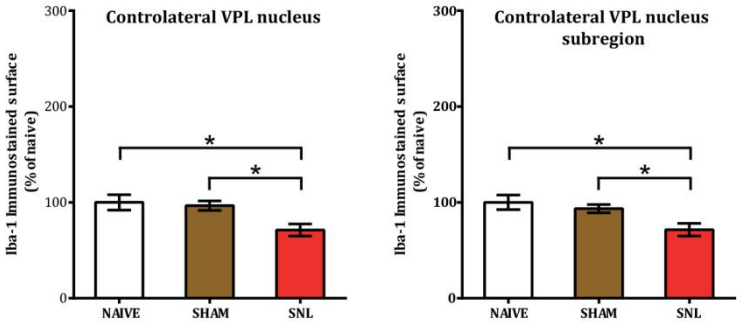
Dans le noyau VPL controlatéral, les analyses de la surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 ont mis en évidence une diminution significative (35% de diminution) au sein du noyau VPL et de sa SSR pour les animaux SNL comparés aux animaux naïfs et sham (Fig. 46, A1 et A2). L'immunomarquage Iba-1 occupe la même surface chez les animaux naïfs et sham. De plus, la quantification des cellules immunopositives pour le marqueur Iba-1 a mis en évidence une diminution significative (21% de diminution) au sein de la SSR controlatérale des animaux SNL comparé aux animaux naïfs (Fig. 46, A1 et A3). Bien que le nombre de cellules Iba-1 immunopositives dans la SRR controlatérale des animaux sham ne semble pas différent de celui des animaux naïfs, il n'existe pas de différence statistique entre les animaux sham et SNL.

Dans le noyau VPL ipsilatéral, les analyses de la surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 ont mis en évidence une diminution significative (32% de diminution) au sein du noyau VPL pour les animaux SNL comparés aux animaux naïfs (Fig. 46, B1 et B2). La surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 chez les animaux sham apparait intermédiaire entre celle mesurée chez les animaux naïfs et celle mesurée chez les animaux SNL. (Fig. 46, B2). Il n'existe aucune différence significative entre les conditions expérimentales dans la surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 dans la SSR ipsilatérale bien que l'allure des résultats soit très proche de celle du VPL ipsilatéral (Fig. 46, B2). La quantification des cellules immunopositives pour le marqueur Iba-1 ne montre aucune différence significative entre les différents groupes expérimentaux dans la SSR ipsilatérale (Fig. 46, B1 et B3).

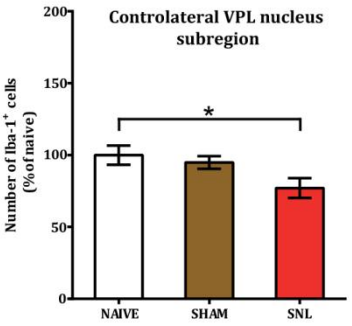
A1. Iba-1 immunostaining in controlateral VPL



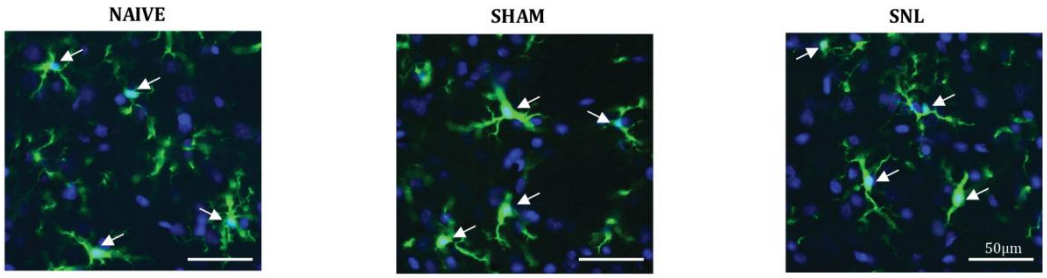
A2. Iba-1 immunostained surface



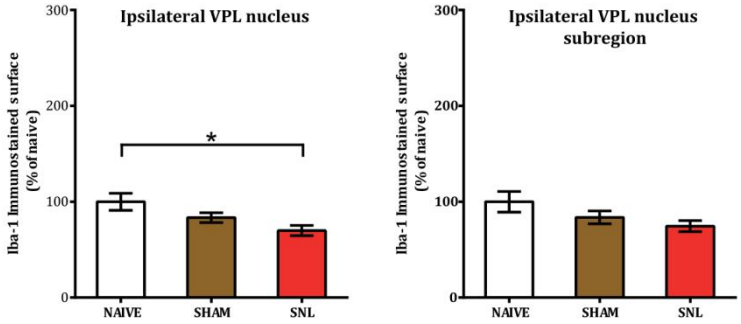
A3. Iba-1 immunopositive cell number



B1. Iba-1 immunostaining in ispilateral VPL



B2. Iba-1 immunostained surface



B3. Iba-1 immunopositive cell number

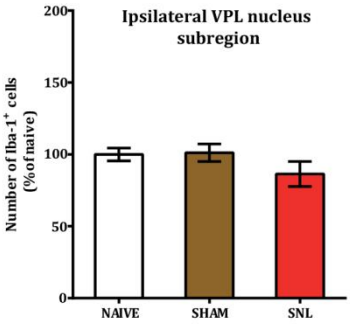


Figure 46 : Diminution de la surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 dans les noyaux VPL et du nombre de cellules Iba-1 immunopositives dans le VPL controlatéral des animaux neuropathiques à J14. Les flèches blanches pointent aux cellules qui ont été comptabilisées c'est à dire qui sont marquées pour Iba-1 (vert) et pour le DAPI nucléaire (bleu) (A1 et B1). Une partie au moins du corps cellulaire apparait donc en turquoise. La surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 dans le noyau VPL et sa SSR du côté controlatéral diminue significativement chez les animaux neuropathiques SNL comparés aux animaux naïfs et sham (A1, A2). De plus, au sein de la SSR, le nombre de cellules Iba-1 immunopositives diminue significativement chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs (A1, A3). La surface occupée du côté ipsilatéral par l'immunomarquage Iba-1 dans le noyau VPL diminue significativement chez les animaux neuropathiques SNL comparés aux animaux naïfs (B1, B2). Il existe une tendance à la diminution de cette surface immunomarquée pour Iba-1 dans la SSR ipsilatérale mais qui n'atteint pas la significativité (B2). Le nombre de cellules Iba-1 immunopositives ne varie pas quelle que soit la condition expérimentale (B1, B3). (SNL et sham : n=6, naïfs : n=4 ; *, $p<0,05$)

Ainsi, chez les animaux neuropathiques, il existe une diminution significative du nombre de cellules microgliales Iba-1 immunopositives dans la SSR du VPL controlatéral, c'est-à-dire dans une région thalamique recevant les afférences de la patte douloureuse. De plus, la surface occupée par le marquage Iba-1 diminue significativement dans le VPL aussi bien controlatéral qu'ipsilatéral chez ces animaux neuropathiques.

La quantification de la surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 au sein du noyau VPM controlatéral n'a décelé aucune différence significative entre les groupes expérimentaux (Fig. 47, A1 et A2). En revanche, dans le noyau VPM ipsilatéral, la quantification a révélé une diminution significative de la surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 (36% de diminution) chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs (Fig. 47, B1 et B2). Les résultats obtenus pour les animaux sham dans ce noyau VPM ipsilatéral les placent en position intermédiaire entre les animaux naïfs et SNL en termes de surface occupée par l'immunomarquage Iba-1.

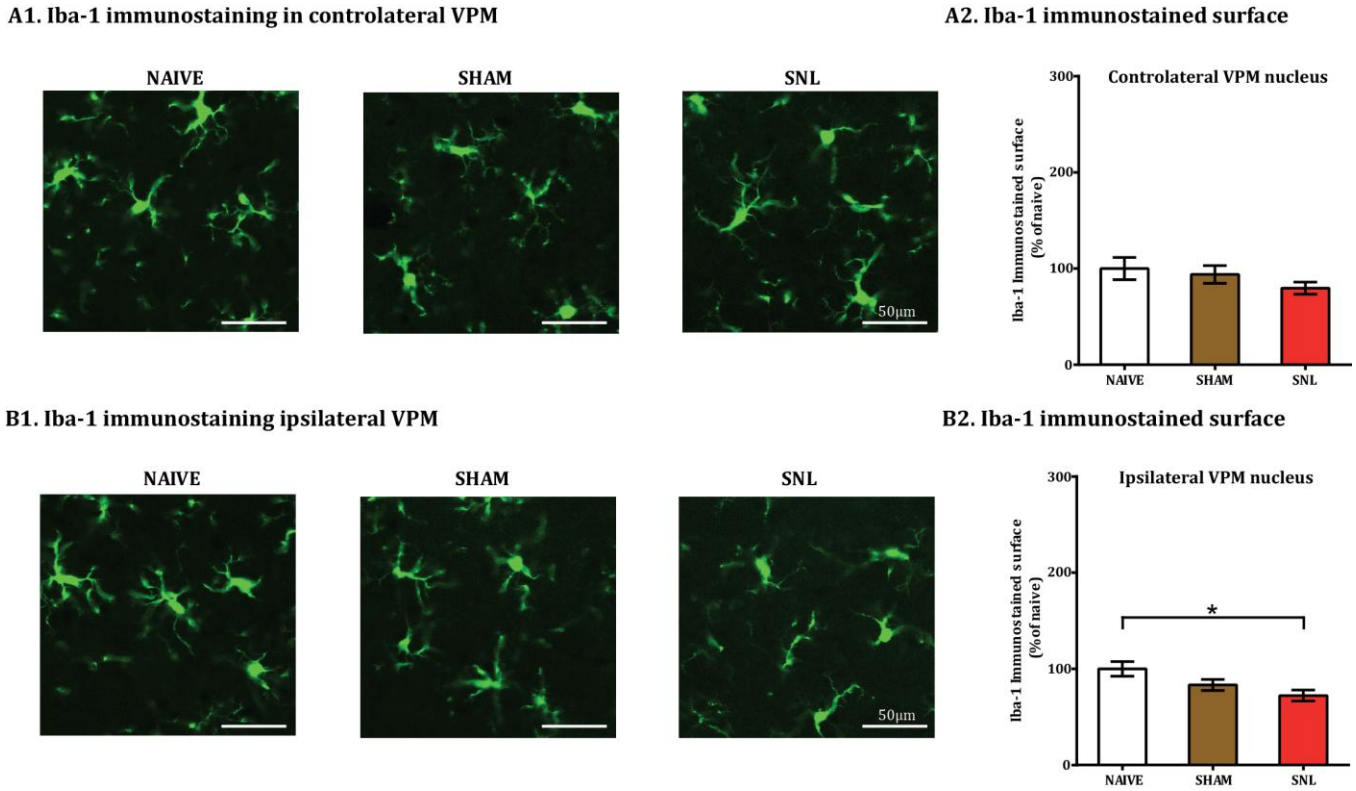


Figure 47 : Diminution de la surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 dans le noyau VPM ipsilatéral chez les animaux neuropathiques à J14. L'immunomarquage Iba-1 apparait en vert (A1 et B1). La surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 dans le noyau VPM controlatéral ne présente aucune différence significative entre les conditions expérimentales (A1 et A2). La surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 dans le VPM ipsilatéral en revanche diminue significativement chez les animaux neuropathiques SNL comparés aux animaux naïfs (B1, B2). (SNL et sham : n=6, naïfs : n=4 ; *, $p<0,05$)

La ligature des nerfs spinaux entraîne donc une diminution de la surface occupée par le marqueur microglial Iba-1 dans le noyau VPL controlatéral mais aussi dans le thalamus latéral (VPL et VPM) du côté ipsilatéral. J'ai pu montrer que cette diminution de l'immunomarquage s'accompagne d'un nombre moins important de cellules immunopositives pour Iba-1 dans le VPL controlatéral et sa SSR qui reçoit spécifiquement les afférences en provenance de la patte douloureuse.

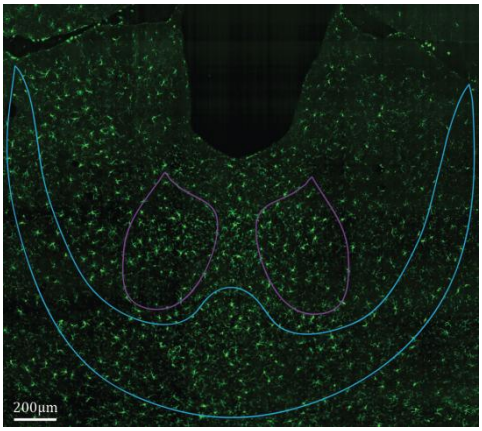


Figure 48 : Immunomarquage Iba-1 dans le thalamus central. L'immunomarquage de la protéine Iba-1 est visualisé en vert. Il s'agit d'un marquage cellulaire globalement homogène. Les noyaux DM (en violet) et IL (en bleu) sont délimités comme illustré sur cette coupe.

Dans le thalamus central, l'immunomarquage Iba-1 est également globalement homogène et la délimitation des noyaux pour les quantifications a été réalisée comme détaillé dans la figure 48. Là, les quantifications de la surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 n'ont décelé aucune différence significative entre les trois groupes expérimentaux ni dans les noyaux DM (Fig. 49, A1 et A2) ni dans les noyaux IL (Fig. 49, B1 et B2). Ainsi, il ne semble pas exister de modification de l'expression neurochimique du marqueur microglial Iba-1 dans le thalamus central dans ce modèle de douleurs neuropathiques SNL.

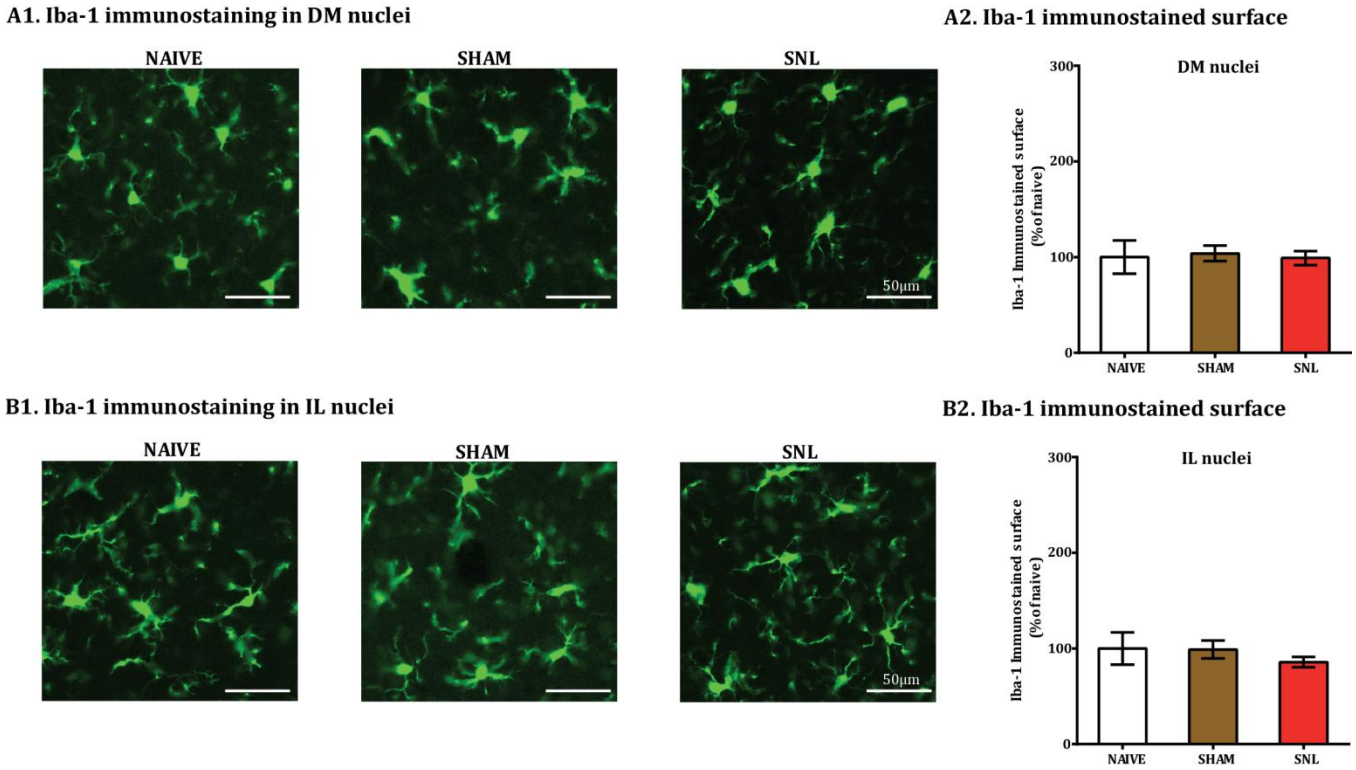


Figure 49 : Aucune différence dans la surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 dans les noyaux DM et IL à J14. L'immunomarquage Iba-1 apparait en vert (A1 et B1). La surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 dans les noyaux DM ne présente aucune différence significative entre les conditions expérimentales (A1 et A2). La surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 dans les noyaux IL ne présente pas non plus de différence entre les groupes expérimentaux (B1 et B2). (SNL et sham : n=6, naïfs : n=4 ; *, $p<0,05$)

C.1.1.2 Immunomarquage de la protéine microgliale CD11b/c

L'immunomarquage de la protéine CD11b/c dans le thalamus est un marquage cellulaire globalement homogène au sein du thalamus latéral (ici du côté controlatéral ; Fig. 50, A). Le marquage cellulaire est présent sur la membrane cellulaire des cellules microgliales et permet de visualiser ses prolongements (Fig. 50, C). Les noyaux thalamiques latéraux sont délimités comme illustré sur la figure 50 (A, B) pour permettre les quantifications de l'immunomarquage.

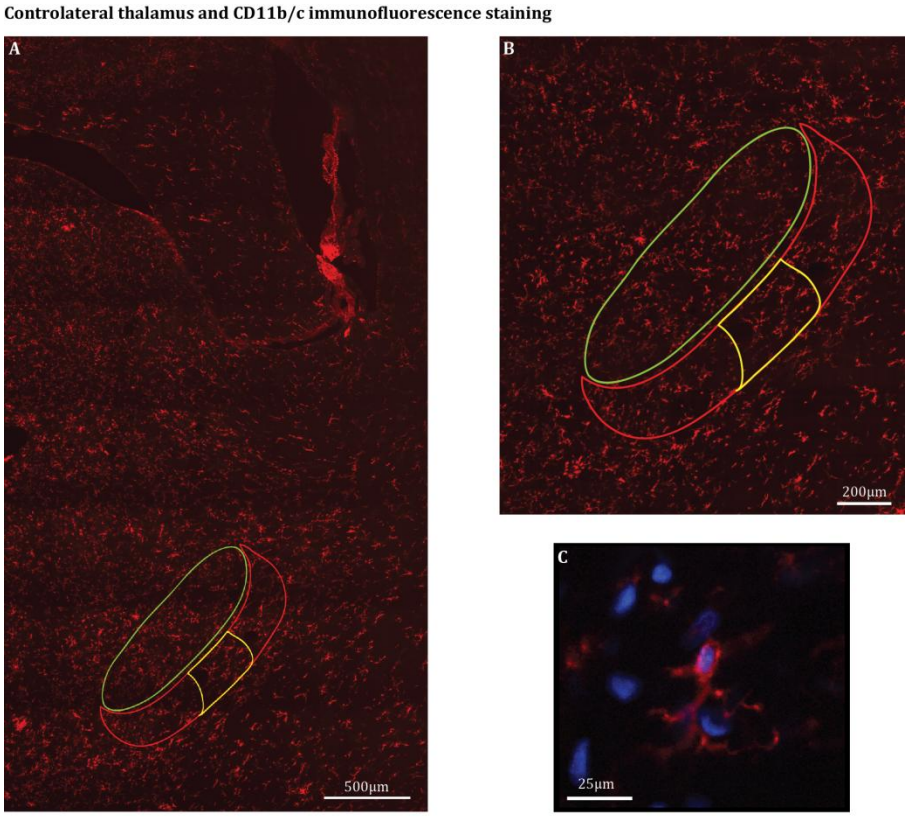
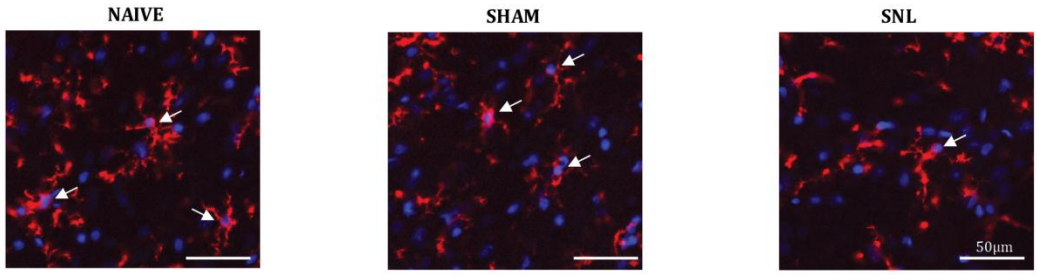


Figure 50 : Immunomarquage CD11b/c dans le thalamus controlatéral. L'immunomarquage de la protéine CD11b/c est visualisé en rouge. Il s'agit d'un marquage cellulaire homogène ici illustré au sein du thalamus controlatéral (A, B : agrandissement de A). Les noyaux VPL (en rouge), la sous-région du VPL (SSR ; en jaune) et le VPM (en vert) sont délimités comme illustré en A et B afin d'effectuer les quantifications nécessaires. La protéine CD11b/c est une protéine transmembranaire présente sur la membrane des cellules microgliales. Elle permet donc de visualiser les prolongements de la cellule microgliale ainsi que la membrane du corps cellulaire autour du noyau visualisé en bleu par le marqueur nucléaire DAPI (C).

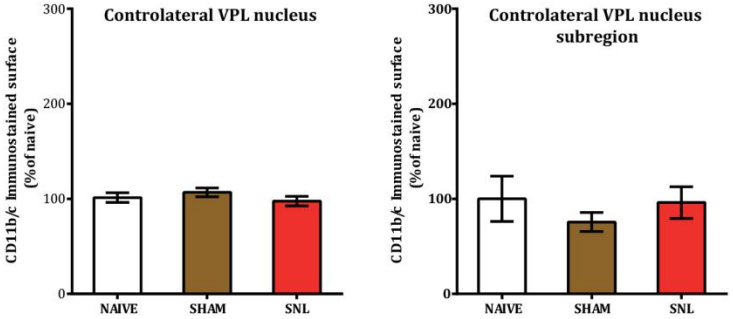
Dans le noyau VPL controlatéral, les analyses de la surface occupée par l'immunomarquage CD11b/c n'a révélé aucune différence significative entre les trois conditions expérimentales (Fig. 51, A1 et A2). En revanche, la quantification des cellules immunopositives pour le marqueur CD11b/c a mis en évidence une diminution significative (18% de diminution) au sein de la SSR controlatérale des animaux SNL comparés aux animaux naïfs (Fig. 51, A1 et A3). Bien que le nombre de cellules CD11b/c immunopositives dans la SRR controlatérale des animaux sham soit proche de celui des animaux naïfs, la différence observée entre les animaux sham et SNL n'atteint pas la significativité.

Dans le noyau VPL ipsilatéral, les analyses de la surface occupée par l'immunomarquage CD11b/c n'ont révélé aucune différence significative entre les trois conditions (Fig. 51, B1 et B2). Il n'existe pas non plus de différence dans le nombre de cellules immunopositives pour le marqueur CD11b/c entre les différents groupes expérimentaux dans la SSR ipsilatérale (Fig. 51, B1 et B3).

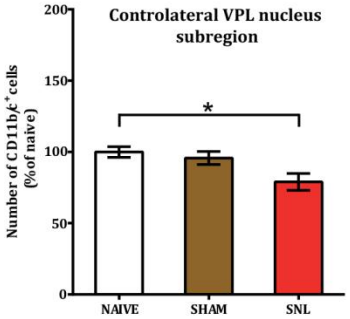
A1. CD11b/c immunostaining in controlateral VPL



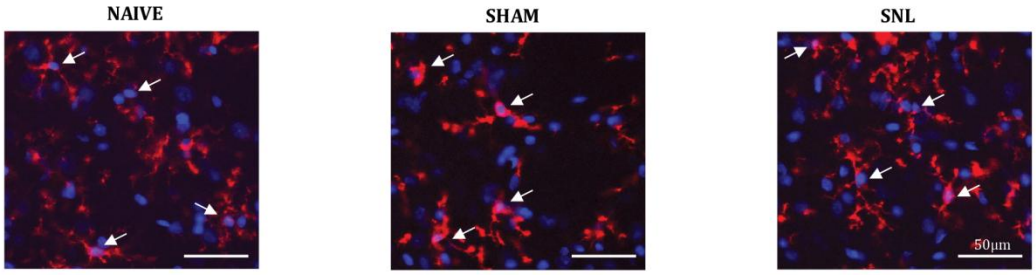
A2. CD11b/c immunostained surface



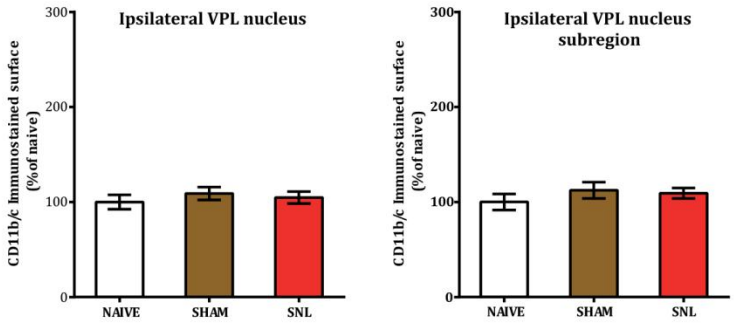
A3. CD11b/c immunopositive cell number



B1. CD11b/c immunostaining in ispilateral VPL



B2. CD11b/c immunostained surface



B3. CD11b/c immunopositive cell number

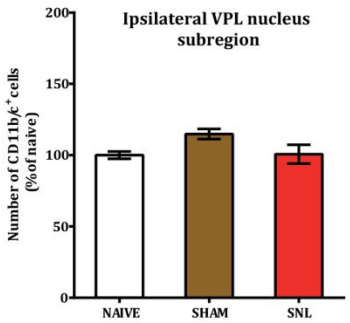


Figure 51 : Diminution nombre de cellules CD11b/c immunopositives dans le VPL controlatéral des animaux neuropathiques à J14. Les flèches blanches pointent aux cellules qui ont été comptabilisées c'est à dire qui sont marquées pour CD11b/c (rouge) et pour le DAPI nucléaire (bleu) (A1 et B1). La surface occupée par l'immunomarquage CD11b/c dans le noyau VPL et sa SSR du côté controlatéral ne présente aucun différence significative entre les groupes expérimentaux (A1 et A2). Dans la SSR controlatérale en revanche, le nombre de cellules CD11b/c immunopositives diminue significativement chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs (A1, A3). La surface occupée du côté ipsilatéral par l'immunomarquage CD11b/c dans le noyau VPL et la SSR ne présente pas de différence significative entre les conditions expérimentales (B1, B2). Il n'existe aucune différence non plus dans le nombre de cellules CD11b/c immunopositives au sein de la SSR ipsilatérale (B1 et B3). (SNL et sham : n=6, naïfs : n=4 ; *, $p<0,05$)

Ainsi, il existe une diminution significative du nombre de cellules microgliales CD11b/c immunopositives dans la SSR controlatérale recevant les afférences de la patte douloureuse chez les animaux SNL.

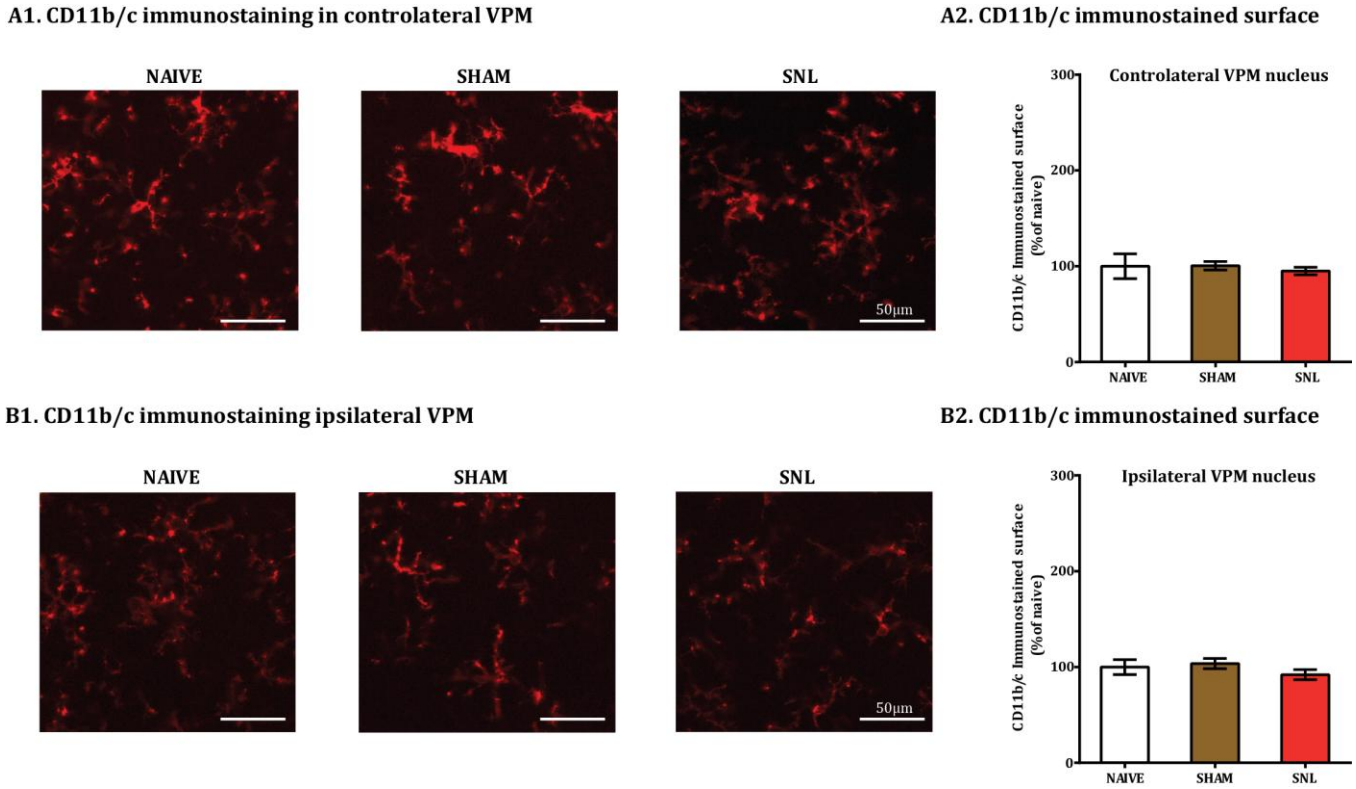


Figure 52 : Aucune différence entre les groupes expérimentaux dans la surface occupée par l'immunomarquage CD11b/c dans les noyaux VPM à J14. L'immunomarquage CD11b/c apparait en rouge (A1 et B1). La surface occupée par l'immunomarquage CD11b/c dans le noyau VPM controlatéral ne présente aucune différence significative entre les conditions expérimentales (A1 et A2). La surface occupée par l'immunomarquage CD11b/c dans le VPM ipsilatéral ne présente pas non plus de différence significative entre les trois groupes expérimentaux (B1, B2). (SNL et sham : n=6, naïfs : n=4 ; *, p<0,05)

La quantification de la surface occupée par l'immunomarquage CD11b/c au sein des noyaux VPM controlatéral et ipsilatéral n'a décelé aucune différence significative entre les trois groupes expérimentaux (Fig. 52, A1 et A2, B1 et B2).

Ainsi, la ligature des nerfs spinaux est seulement associée à une diminution du nombre de cellules CD11b/c immunopositives dans le noyau VPL controlatéral. Dans ces conditions, l'absence de modification de la surface occupée par ce marqueur laisse à penser que les cellules qui restent CD11b/c immunopositives chez les SNL ont subi une hypertrophie et/ou une augmentation du nombre de leurs prolongements.

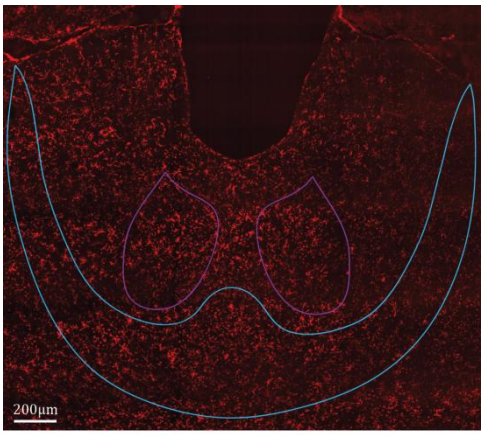


Figure 53 : Immunomarquage CD11b/c dans le thalamus central. L'immunomarquage de la protéine CD11b/c est visualisé en rouge. Il s'agit d'un marquage cellulaire globalement homogène dans le thalamus central. Les noyaux DM (en violet) et IL (en bleu) sont délimités comme illustré sur cette coupe.

Dans le thalamus central, l'immunomarquage CD11b/c est également globalement homogène et la délimitation des noyaux pour les quantifications a été réalisée comme détaillé dans la figure 53. Là, les quantifications de la surface occupée par l'immunomarquage CD11b/c n'ont décelé aucune différence significative entre les trois groupes expérimentaux ni dans les noyaux DM (Fig. 54, A1 et A2) ni dans les noyaux IL (Fig. 54, B1 et B2). Ainsi, il ne semble pas exister de modifications de l'expression neurochimique du marqueur microglial CD11b/c dans le thalamus central dans ce modèle de douleurs neuropathiques SNL.

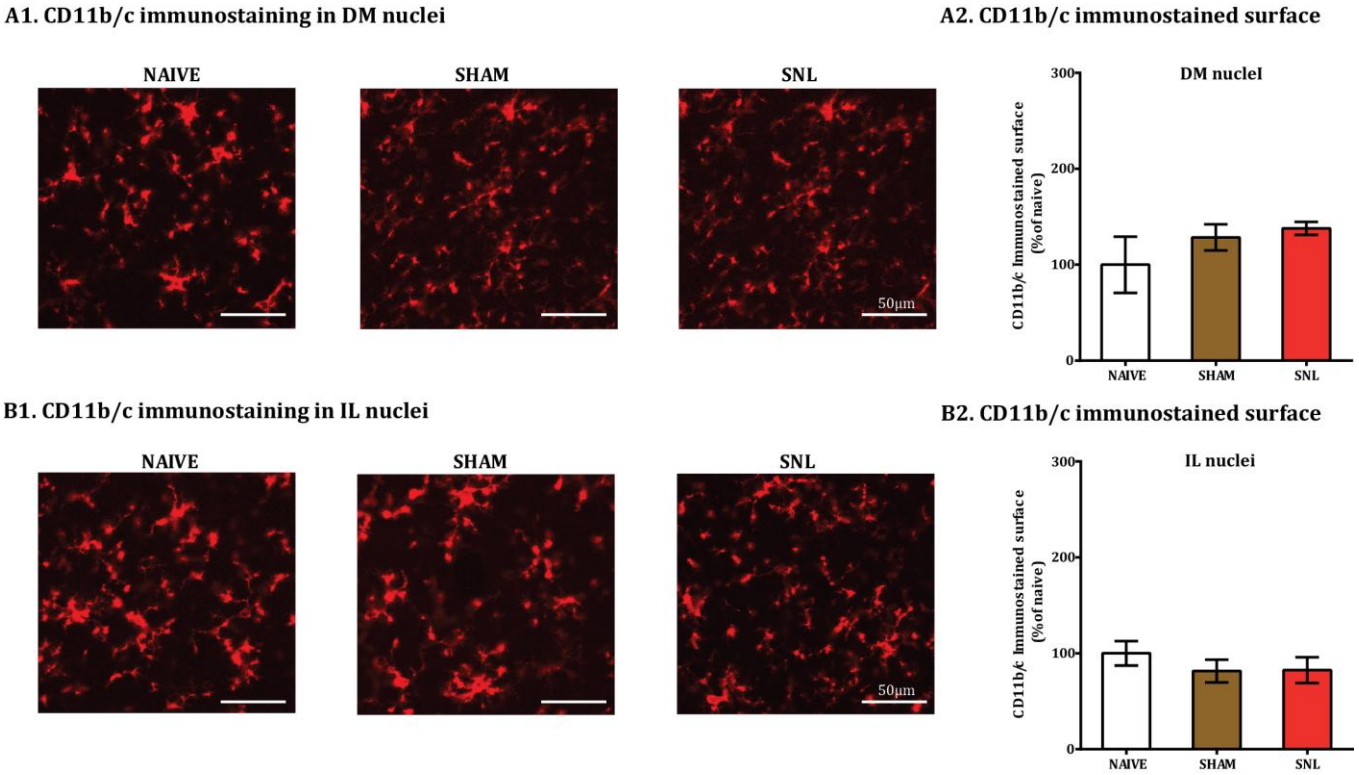


Figure 54 : Aucune différence entre les conditions expérimentales dans la surface occupée par l'immunomarquage CD11b/c dans les noyaux DM et IL à J14. L'immunomarquage CD11b/c apparait en rouge (A1 et B1). La surface occupée par l'immunomarquage CD11b/c dans les noyaux DM ne présente aucune différence significative entre les conditions expérimentales (A1 et A2). La surface occupée par l'immunomarquage CD11b/c dans les noyaux IL ne présente pas non plus de différence entre les trois groupes expérimentaux (B1 et B2). (SNL et sham : n=6, naïfs : n=4 ; *, p<0,05)

Ainsi, l'étude de l'expression neurochimique des marqueurs microgliaux Iba-1 et CD11b/c a abouti à un résultat très surprenant : une diminution du nombre de cellules microgliales immunopositives pour Iba-1 et pour CD11b/c au sein de la SSR controlatérale du VPL. L'approche immunohistochimique m'a donc permis de révéler des modifications de l'expression de marqueurs protéiques microgliaux alors que l'expression de l'ARNm de ces mêmes marqueurs n'était pas significativement modifiée dans mon étude de qRT-PCR. Qu'en est-il alors pour les marqueurs qui présentaient des variations d'expression de leur ARNm ? Je vous rappelle qu'il s'agit de la CTSS et de CX3CR1. Dans une expérience pilote j'ai réalisé des immunomarquages pour ces deux protéines. L'immunomarquage CX3CR1 est apparu extrêmement punctiforme empêchant toute quantification aisée des cellules CX3CR1 immunopositives. A l'opposé, l'immunomarquage CTSS est apparu comme un marquage cytoplasmique au niveau du corps cellulaire facilitant ainsi la quantification des cellules CTSS immunopositives. J'ai donc sélectionné le marqueur microglial CTSS.

C.1.1.3 Immunomarquage de la protéine microgliale CTSS

L'étude de ce marqueur microglial a été uniquement réalisée dans les noyaux du thalamus latéral (VPL, SSR et VPM). L'immunomarquage de la protéine CTSS est très épars dans le thalamus et dans l'ensemble des structures cérébrales présentes sur les coupes utilisées. Le marquage de la protéine CTSS apparait comme un marquage cellulaire et est présent majoritairement dans le cytoplasme autour du noyau (Fig. 55, A et B). Les cellules immunopositives pour la CTTS sont bien des cellules microgliales comme le confirme la colocalisation avec le marqueur Iba-1 (Fig. 55, C). Sur mes coupes, toutes les cellules CTSS immunopositives étaient aussi Iba-1 immunopositives. On note aussi un faible marquage diffus dans le parenchyme (Fig. 55) qui pourrait correspondre à la CTSS libérée par les cellules microgliales et donc à un marquage extracellulaire. Pour ce marquage, j'ai adopté un seuillage lors des quantifications qui me permettait de ne pas prendre en compte ce marquage *a priori* extracellulaire.

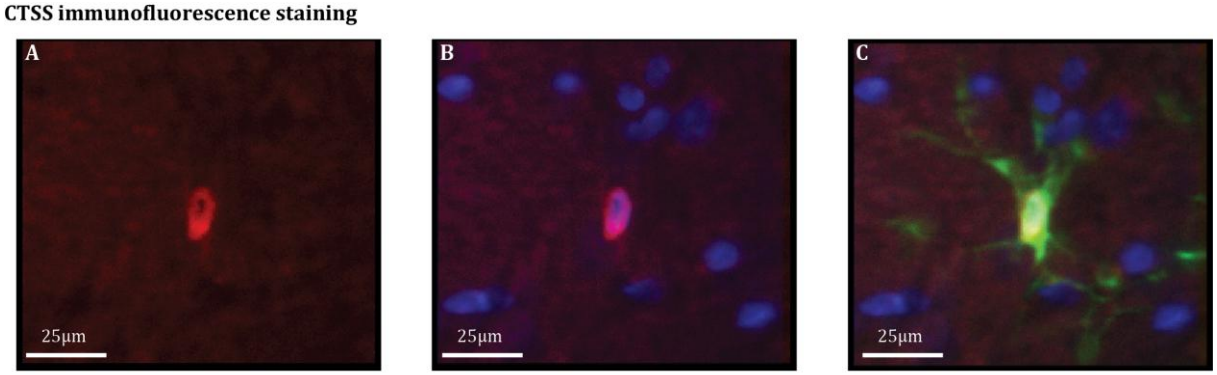


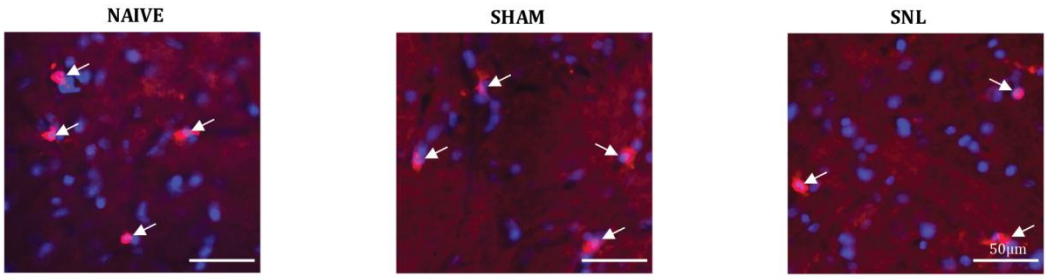
Figure 55 : Immunomarquage CTSS dans le thalamus controlatéral. L'immunomarquage de la protéine CTSS est visualisé en rouge, l'immunomarquage de la protéine Iba-1 apparait en vert et le marqueur nucléaire DAPI apparait en bleu. Le marquage CTSS est localisé dans le cytoplasme autour du noyau de la cellule (A et B) et ce marquage colocalise avec le marquage Iba-1 (superposition du rouge et du vert qui apparait en jaune, C). On note un faible marquage rouge diffus sur toute la région autour de la cellule CTSS positive.

Dans le noyau VPL controlatéral, les analyses de la surface occupée par l'immunomarquage CTSS n'ont mis en évidence aucune différence entre les trois conditions expérimentales (Fig. 56, A1 et A2). Il n'existe pas non plus de différence entre les groupes expérimentaux en ce qui concerne le nombre de cellules immunopositives pour le marqueur CTSS (Fig. 56, A1 et A3). On notera que les barres d'erreur sont grandes, traduisant une grande variabilité entre les individus au sein de chacun des trois groupes expérimentaux.

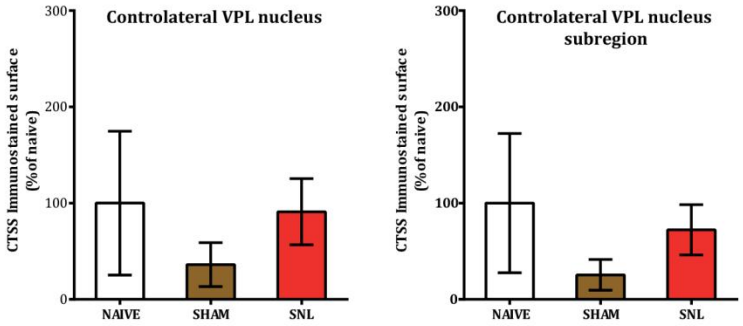
Dans le noyau VPL ipsilatéral, de la même manière, les analyses de la surface occupée par l'immunomarquage CTSS n'ont révélé aucune différence entre les trois conditions expérimentales (Fig. 56, B1 et B2). De même, le nombre de cellules immunopositives pour le marqueur CTSS n'est pas différent entre les trois groupes d'animaux (Fig. 56, B1 et B3). On notera là encore que les barres d'erreur sont grandes, traduisant une grande variabilité entre les individus au sein de chacun des trois groupes expérimentaux.

Ainsi, aucune modification de l'expression neurochimique de la CTSS n'a été décelée dans les noyaux VPL contro- et ipsilatéral. Les variabilités interindividuelles se sont révélées très importantes avec cet immunomarquage.

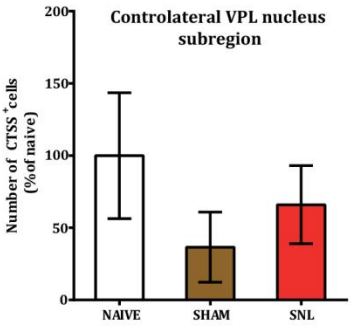
A1. CTSS immunostaining in controlateral VPL



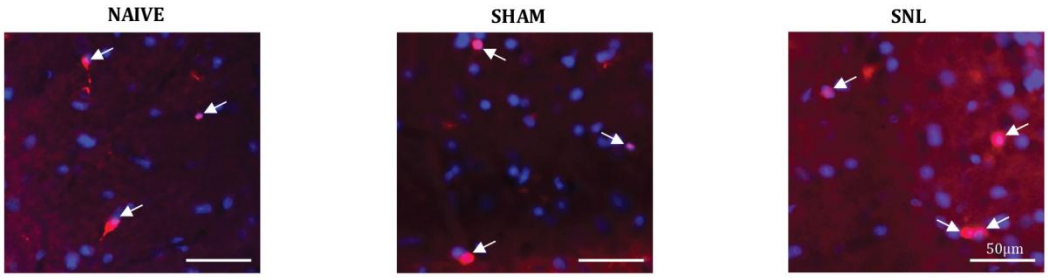
A2. CTSS immunostained surface



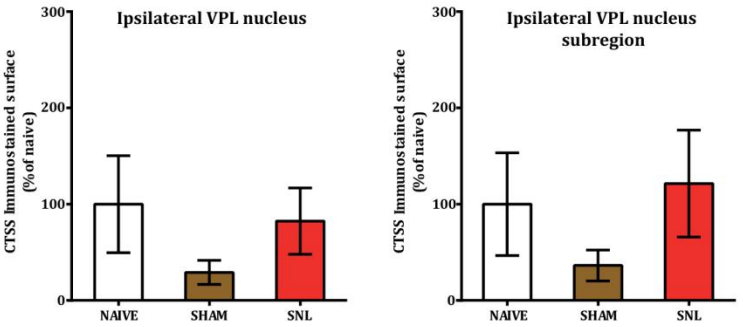
A3. CTSS immunopositive cell number



B1. CTSS immunostaining in ipsilateral VPL



B2. CTSS immunostained surface



B3. CTSS immunopositive cell number

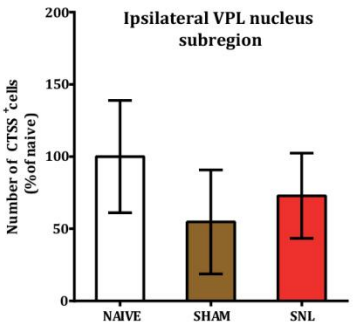


Figure 56 : Aucune différence entre les conditions expérimentales dans la surface occupée par l'immunomarquage CTSS et le nombre de cellules CTSS immunopositives à J14. Les flèches blanches pointent les cellules comptabilisées : elles sont immunomarquées pour la CTSS (rouge) et pour le DAPI nucléaire (bleu). La surface occupée par l'immunomarquage CTSS dans le noyau VPL et sa SSR du côté controlatéral ne présente aucun différence significative entre les groupes expérimentaux (A1 et A2). Dans la SSR controlatérale, le nombre de cellules CTSS immunopositives ne révèle là encore aucune différence entre les trois groupes expérimentaux (A1, A3). La surface occupée du côté ipsilatéral par l'immunomarquage CTSS dans le noyau VPL et la SSR ne présente pas de différence significative entre les conditions expérimentales (B1, B2). Il n'existe aucune différence non plus dans le nombre de cellules CTSS immunopositives au sein de la SSR ipsilatérale entre les différents groupes d'animaux (B1 et B3). (SNL et sham : n=6, naïfs : n=4 ; *, p<0,05)

La quantification de la surface occupée par l'immunomarquage CTSS au sein des noyaux VPM controlatéral et ipsilatéral n'a décelé aucune différence significative entre les trois groupes expérimentaux (Fig. 57, A1 et A2, B1 et B2). Dans ce noyau du thalamus latéral, notons également une très forte variabilité interindividuelle dans la surface occupée par l'immunomarquage CTSS.

Ainsi, l'étude de l'expression neurochimique de la CTSS dans le thalamus latéral n'a révélé aucune modification significative entre les trois groupes expérimentaux alors que l'approche par qRT-PCR a mis en évidence une augmentation de l'expression de l'ARNm de la CTSS dans le thalamus latéral chez les animaux neuropathiques. La grande variabilité interindividuelle observée dans les analyses de l'immunomarquage CTSS pourrait être due au problème de seuillage que j'ai évoqué en début de section. En effet, le faible marquage diffus *a priori* extracellulaire peut être variable selon les coupes : par exemple les images en figure 55, B1 présentent des différences au niveau de ce marquage diffus alors que les images en figure 55, A1 n'en présentent pratiquement pas. Mon seuillage a donc été variable selon les coupes analysées ce qui forcément a impacté mes analyses de surface occupée par l'immunomarquage CTSS et pourrait expliquer les fortes variabilités interindividuelles observées.

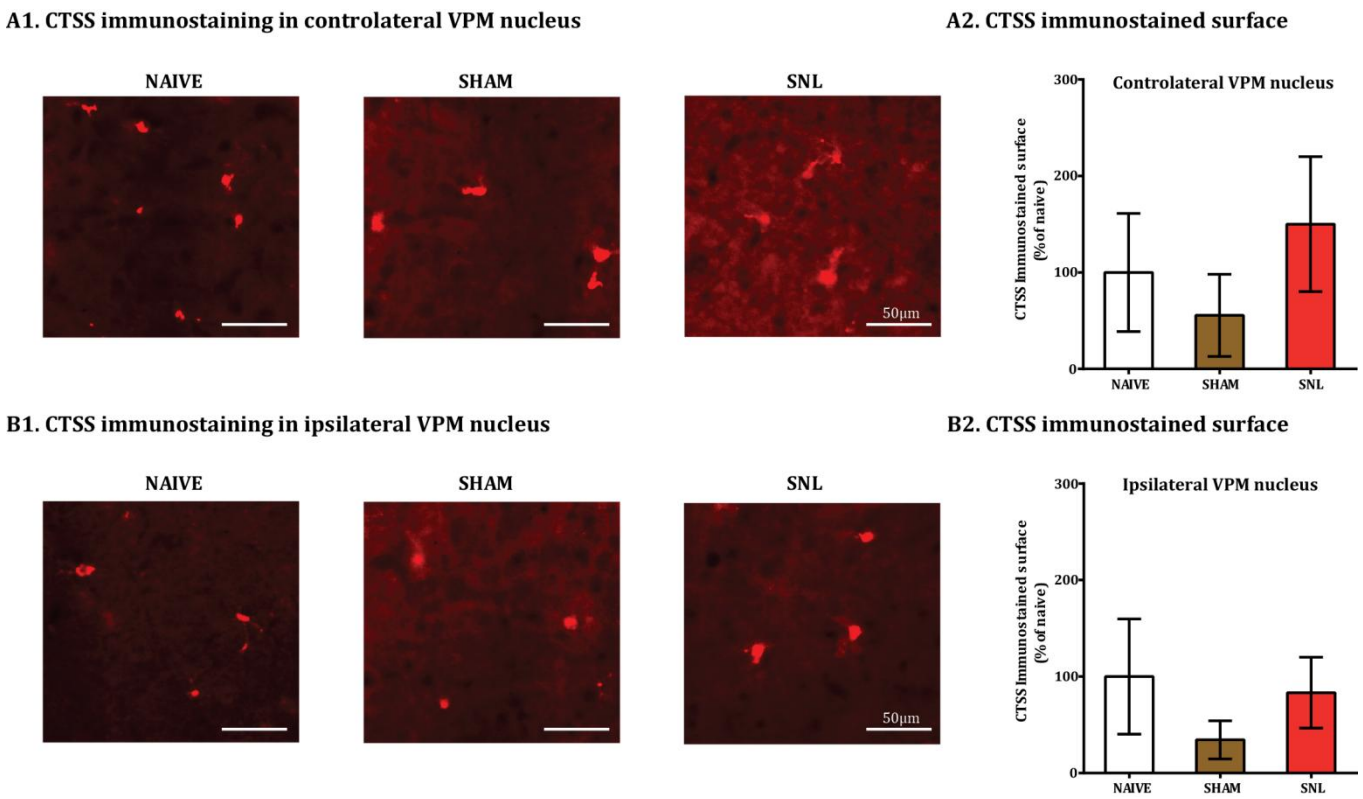


Figure 57 : Aucune différence entre les groupes expérimentaux dans la surface occupée par l'immunomarquage CTSS dans les noyaux VPM à J14. L'immunomarquage CTSS apparait en rouge (A1 et B1). La surface occupée par l'immunomarquage CTSS dans le noyau VPM controlatéral ne présente aucune différence significative entre les conditions expérimentales (A1 et A2). La surface occupée par l'immunomarquage CTSS dans le VPM ipsilatéral ne présente pas non plus de différence significative entre les trois groupes expérimentaux (B1, B2). (SNL et sham : n=6, naïfs : n=4 ; *, $p<0,05$)

L'ensemble de l'étude immunohistochimique des marqueurs microgliaux dans le thalamus montre donc qu'il existe moins de cellules Iba-1 immunopositives et moins de cellules CD11b/c immunopositives dans la sous-région du VPL controlatéral qui reçoit les afférences somesthésiques en provenance des pattes arrière chez les animaux neuropathiques comparés aux animaux naïfs. Mes coupes étant doublement marquées pour Iba-1 et CD11b/c, j'ai vérifié que la diminution significative concerne aussi les cellules doublement marquées pour Iba-1 et CD11b/c (Fig. 58). Je rappelle que ces décomptes ont été réalisés sur des images qui ont été acquises sur un seul plan focal. Face au résultat très surprenant d'une diminution de cellules thalamiques exprimant des marqueurs microgliaux, j'ai cherché à valider ce résultat en utilisant une méthode de quantification stéréologique et en l'étendant à l'ensemble du VPL.

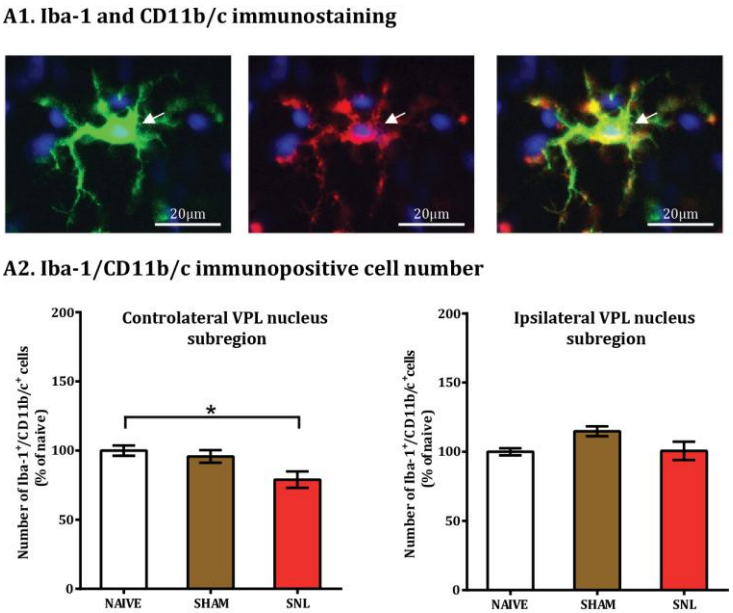


Figure 58 : Diminution du nombre de cellules immunopositives pour Iba-1 et CD11b/c dans le VPL controlatéral des animaux neuropathiques. Illustration de la colocalisation du marquage Iba-1 (vert) avec le marquage CD11b/c (rouge) et le marquage nucléaire DAPI (bleu) (A1). La flèche blanche montre que la cellule microgliale est à la fois marquée avec Iba-1 et avec CD11b/c. La superposition des marquages apparait donc en jaune. Dans la SSR controlatérale, le nombre de cellules Iba-1/CD11b/c immunopositives diminue significativement chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs (A2). Le nombre de cellules Iba-1/CD11b/c immunopositives ne varie pas quelle que soit la condition expérimentale dans la SSR ipsilatérale (A2). (SNL et sham : n=6, naïfs : n=4 ; *, $p<0,05$)

C.1.2- Quantification stéréologique des cellules Iba-1 positives

Pour réaliser cette quantification j'ai choisi d'utiliser le marqueur Iba-1 car il produit un immunomarquage cytoplasmique aussi bien autour du noyau qu'au niveau des prolongements microgliaux, facilitant ainsi les décomptes. J'ai utilisé la méthode du dissector optique pour comptabiliser les cellules Iba-1 immunopositives dans l'ensemble du noyau VPL (ipsilatéral et controlatéral) sur des images acquises en Z (Matériels et Méthodes, parties VI. A2 et B2).

Dans le noyau VPL controlatéral, la quantification stéréologique des cellules Iba-1 immunopositives a confirmé le résultat obtenu par le comptage dans un seul plan focal : le nombre de cellules Iba-1 immunopositives est significativement moins élevé chez les animaux SNL que chez les animaux naïfs (31,5% de diminution ; Fig. 59, A1 et A2). On remarque que le nombre de cellules Iba-1 immunopositives chez les animaux sham est intermédiaire entre celui des animaux naïfs et celui des animaux SNL, mais sans atteindre la significativité. De plus, il existe une corrélation forte entre le nombre de cellules Iba-1 immunopositives dans le noyau VPL controlatéral et le comportement douloureux (Fig. 60, A1 et A2). Ainsi, plus l'animal présente un score d'allodynie élevé plus le nombre de cellules Iba-1 immunopositives du VPL controlatéral est faible (Fig. 60, A1). De même, moins l'animal porte son poids sur la patte arrière ipsilatérale plus le nombre de cellules Iba-1 immunopositives du VPL controlatéral est faible (Fig. 60, A2). Ainsi, moins l'animal présente de cellules Iba-1 immunopositives dans le VPL controlatéral, plus ses symptômes douloureux sont importants.

Dans le noyau VPL ipsilatéral, la quantification du nombre de cellules Iba-1 immunopositives par méthode de stéréologie n'a pas mis en évidence de différence significative entre les trois conditions expérimentales (Fig. 59, B1 et B2). Cependant, on notera qu'il existe une tendance à la présence de moins de cellules Iba-1 immunopositives dans le noyau VPL ipsilatéral chez les animaux neuropathiques.

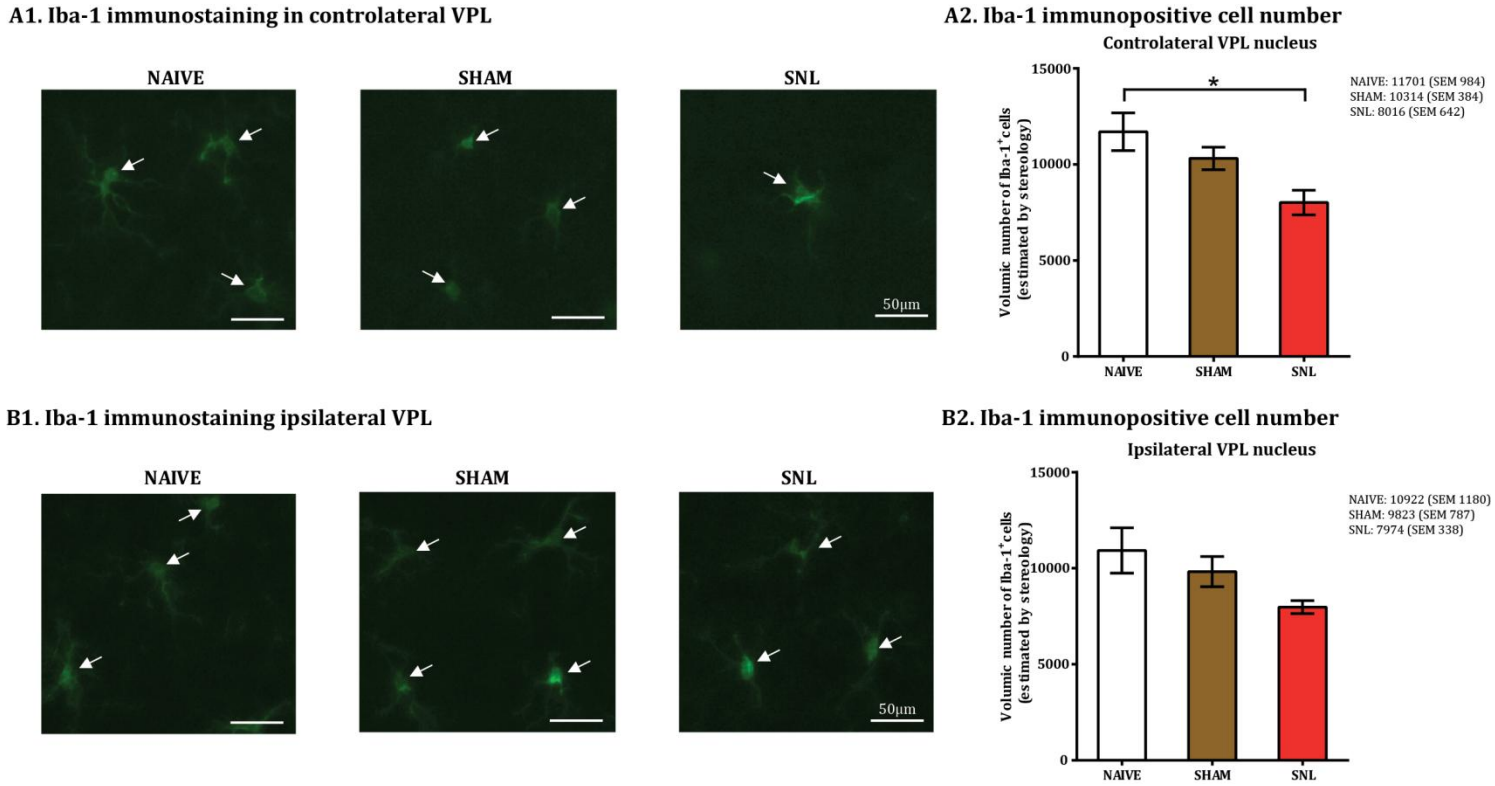


Figure 59 : Diminution significative du nombre de cellules Iba-1 immunopositives dans le noyau VPL controlatéral chez les animaux neuropathiques par quantification stéréologique sur les images acquises en Z à J14. Les flèches blanches pointent aux cellules qui ont été comptabilisées, elles présentent un immunomarquage Iba-1 qui est visualisé en vert Iba-1 (A1 et B1). Les images en A1 et B1 sont des projections en Z de chaque série d'images. On notera que l'on illustre un fort grossissement alors que les cellules ont été comptées sur l'ensemble du VPL. Le nombre de cellules Iba-1 immunopositives diminue significativement dans le noyau VPL controlatéral chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs (A1 et A2). Le nombre de cellules Iba-1 immunopositives dans le VPL ipsilatéral ne révèle pas de différence significative entre les trois conditions expérimentales bien qu'une tendance nette à une diminution de ce nombre de cellules soit à noter chez les animaux SNL (B1, B2). (SNL et sham : n=6, naïfs : n=4 ; *, $p<0,05$)

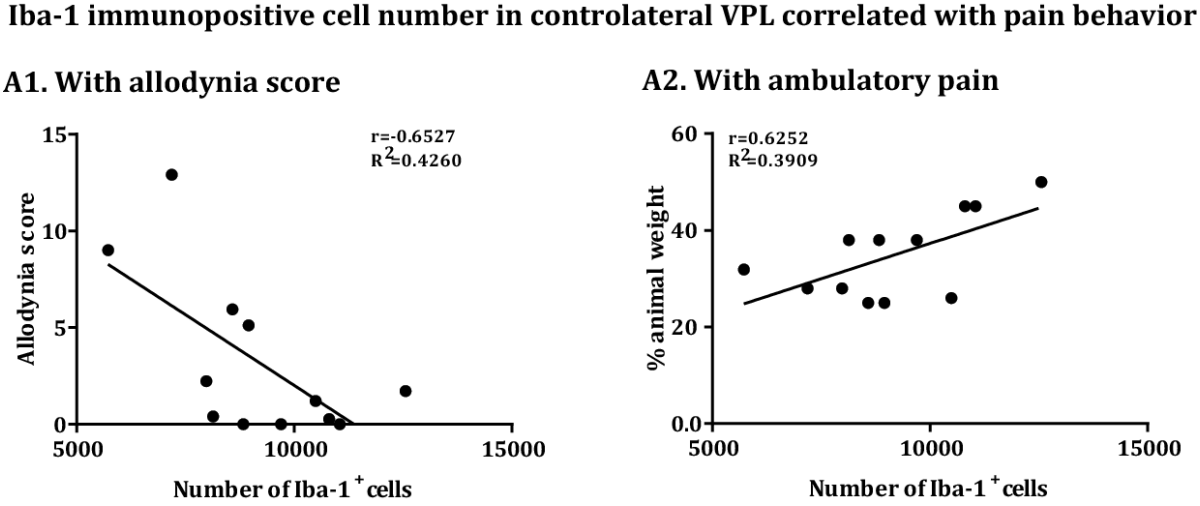


Figure 60 : Illustration de la corrélation qui existe entre le nombre de cellules Iba-1 immunopositives dans le noyau VPL controlatéral et le comportement douloureux des animaux à J14. Le nombre de cellules Iba-1 immunopositives est plus bas quand le score d'allodynie est plus élevé (A1). Le nombre de cellules Iba-1 immunopositives est plus bas quand l'animal porte moins de poids sur sa patte arrière ipsilatérale. (Sham et SNL : n=6)

Ainsi, les résultats surprenants obtenus par l'approche de comptage non stéréologique (sur un seul plan focal) ont été retrouvés pour le marqueur microglial Iba-1 grâce à cette méthode plus rigoureuse de quantification. De fait, il y a moins de cellules Iba-1 immunopositives dans le VPL controlatéral des animaux neuropathiques. Cette diminution du nombre de cellules microgliales Iba-1 immunopositives est corrélée à un comportement douloureux plus important. Ainsi, la quantification sur un seul plan focal permet de quantifier de manière fiable le nombre de cellules immunomarquées pour les marqueurs utilisés et il n'est pas besoin d'acquisitions en Z pour obtenir un résultat satisfaisant.

En conclusion, le résultat majeur de cette partie est la présence d'une diminution du nombre de cellules microgliales Iba-1 et CD11b/c immunopositives dans le noyau VPL controlatéral chez les animaux neuropathiques.

C.2- Les cellules astrocytaires : surface immunomarquée et nombre de cellules immunopositives

C.2.1- Immunomarquage de la protéine astrocytaire GFAP

L'immunodétection de la protéine GFAP dans le thalamus aboutit à un marquage relativement homogène au sein des différents noyaux (Fig. 61, A). On note cependant une moindre proportion de cellules GFAP immunopositives dans le VPL par exemple comparé au marquage dans le noyau thalamique réticulaire ou encore dans les autres structures cérébrales. Le marquage est présent seulement au niveau des prolongements proximaux des astrocytes (Fig. 61, C). Cette localisation rend plus difficile les comptes cellulaires puisque le noyau marqué en bleu par le DAPI va souvent apparaitre décalé par rapport à l'immunomarquage GFAP (Fig. 61, C). Ainsi, une cellule a été comptabilisée comme GFAP immunopositive si elle présentait un immunomarquage GFAP au niveau d'au moins deux prolongements épais (donc près du corps cellulaire) à proximité immédiate d'un noyau cellulaire (marqueur DAPI). Les noyaux thalamiques ont été délimités comme illustré figure 61 (A, B ; ici côté controlatéral) pour permettre les quantifications de l'immunomarquage.

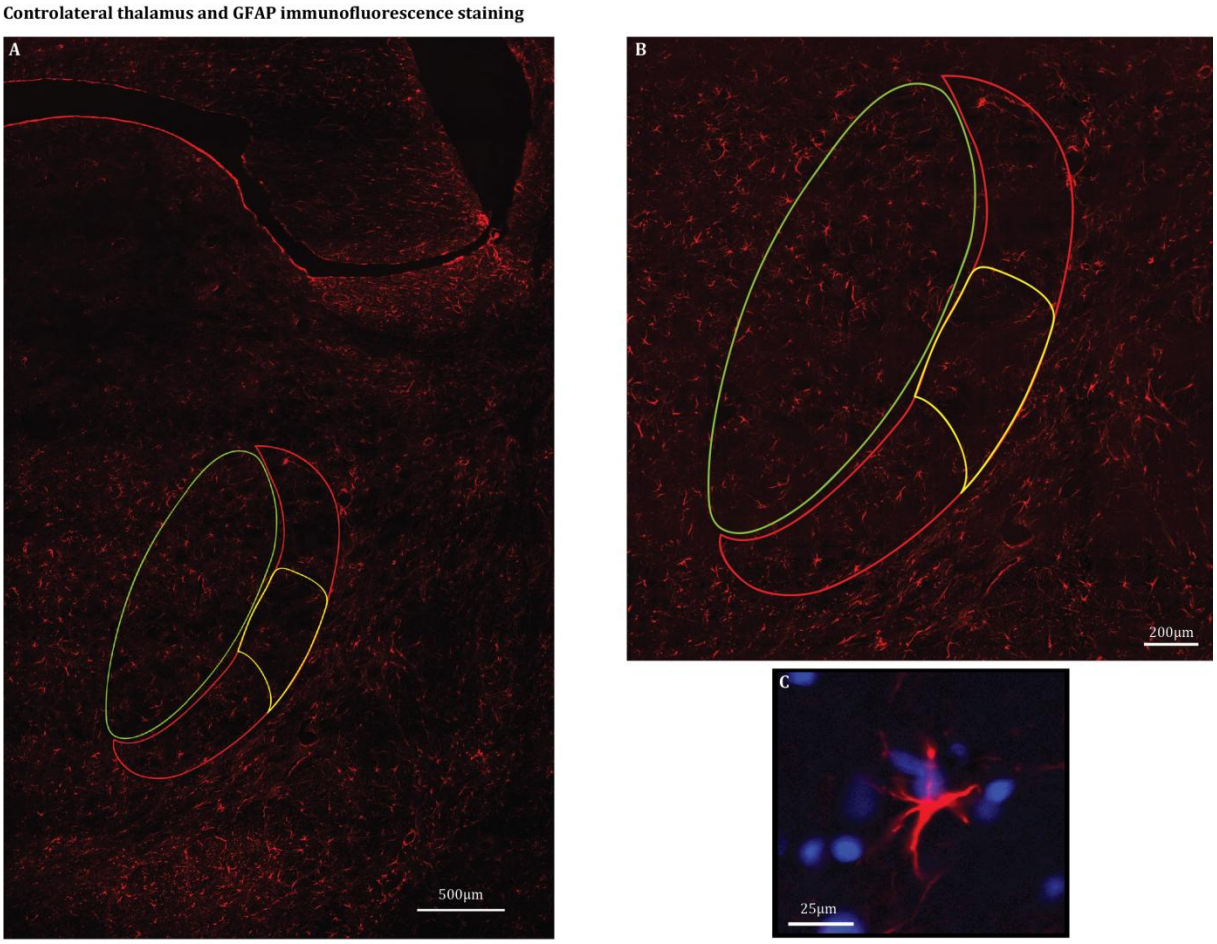
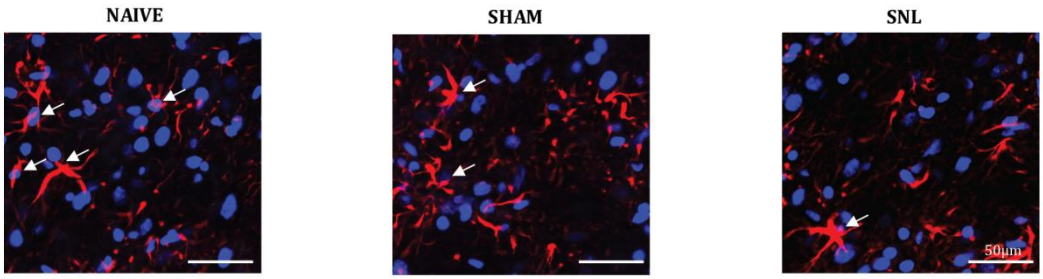


Figure 61 : Immunomarquage GFAP dans le thalamus latéral. L'immunomarquage de la protéine GFAP est visualisé en rouge. Le marquage GFAP est un marquage relativement homogène dans le thalamus, ici illustré au sein du thalamus controlatéral (A, B). On note cependant que l'immunomarquage GFAP est moins présent dans le VPL que dans le noyau réticulaire ou d'autres structures cérébrales (A). Sur les images A et B, le noyau VPL a été délimité en rouge la sous-région du VPL, en jaune et le noyau VPM en vert (A, B). La protéine GFAP est une protéine des filaments intermédiaires qui est présente dans les prolongements proximaux de l'astrocyte (C, marquage nucléaire DAPI en bleu).

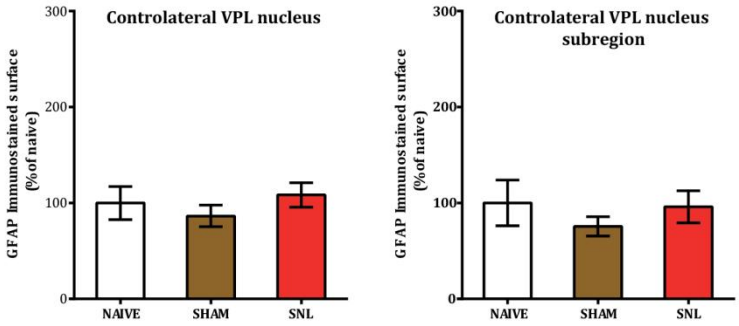
Dans le noyau VPL controlatéral, les analyses de la surface occupée par l'immunomarquage GFAP n'ont montré aucune différence significative entre les trois conditions expérimentales (Fig. 62, A1 et A2). Par contre, la quantification des cellules GFAP immunopositives a mis en évidence une diminution significative (34,5% de diminution) au sein de la SSR controlatérale chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs (Fig. 62, A1 et A3). Le nombre de cellules GFAP immunopositives dans la SRR controlatérale des animaux sham semble être intermédiaire entre les conditions SNL et naïfs, il n'existe cependant pas de différence significative entre les animaux sham et SNL ni sham et naïfs.

Dans le noyau VPL ipsilatéral, les analyses de la surface occupée par l'immunomarquage GFAP n'ont révélé aucune différence entre les trois groupes expérimentaux (Fig. 62, B1 et B2). En revanche, dans la SSR ipsilatérale, la quantification des cellules GFAP immunopositives montre une diminution significative chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs (44,3% de diminution) ainsi qu'une diminution chez les animaux sham comparés aux animaux naïfs (26% de diminution ; Fig. 62, B1 et B3). Le nombre de cellules GFAP immunopositives chez les animaux sham est supérieur à celui trouvé chez les animaux SNL mais cette différence n'atteint pas la significativité

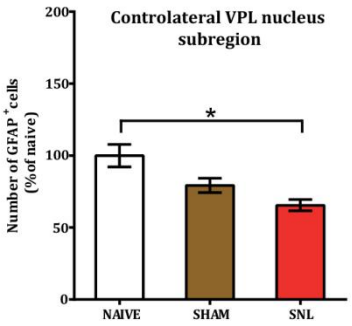
A1. GFAP immunostaining in controlateral VPL



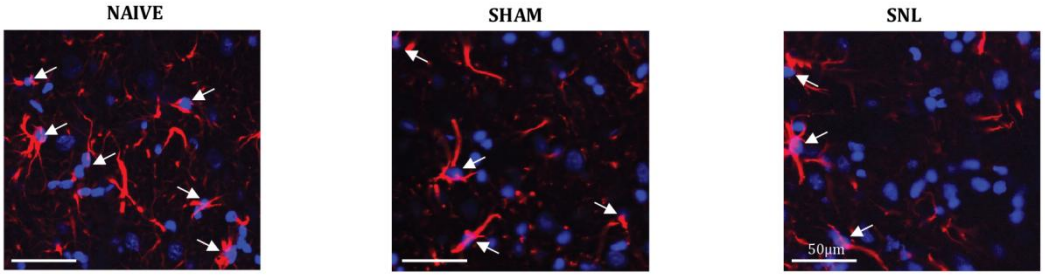
A2. GFAP immunostained surface



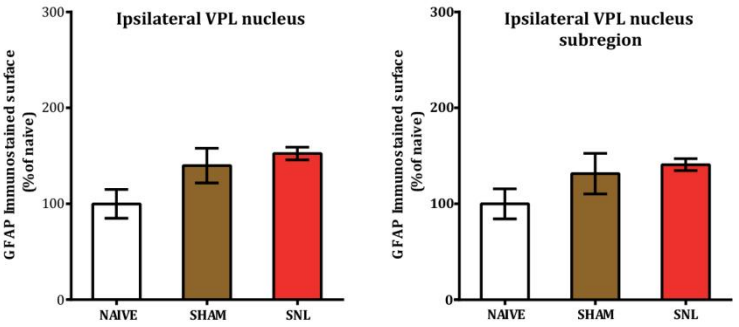
A3. GFAP immunopositive cell number



B1. GFAP immunostaining in ipsilateral VPL



B2. GFAP immunostained surface



B3. GFAP immunopositive cell number

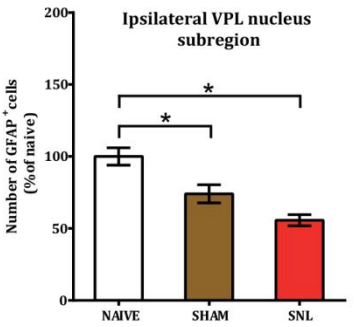


Figure 62 : Diminution du nombre de cellules GFAP immunopositives dans les SSR des VPL des animaux neuropathiques à J14. Les flèches blanches pointent aux cellules qui ont été comptabilisées : elles présentent un immunomarquage GFAP au niveau d'au moins deux prolongements épais (rouge) et à proximité immédiate d'un noyau cellulaire (marqueur DAPI en bleu) (A1 et B1). La surface occupée par l'immunomarquage GFAP dans le noyau VPL et sa SSR du côté controlatéral ne présente aucune différence entre les conditions expérimentales (A1, A2). En revanche, au sein de la SSR controlatérale, le nombre de cellules GFAP immunopositives diminue significativement chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs (A1, A3). La surface occupée du côté ipsilatéral par l'immunomarquage GFAP dans le noyau VPL et sa SSR ne présente pas non plus de différence significative entre les trois conditions (B1, B2). Par contre, le nombre de cellules GFAP immunopositives est significativement diminué chez les animaux SNL et sham comparés aux animaux naïfs. (B1, B3). Bien que les animaux sham semblent avoir un nombre de cellules GFAP immunopositives supérieur à celui des animaux SNL, il n'existe pas de différence significative entre les animaux SNL et sham. (SNL : n=6, sham : n=5, naïfs : n=4 ; *, $p<0,05$)

Ainsi, il existe une diminution significative du nombre de cellules astrocytaires GFAP immunopositives dans les SSR controlatérale et ipsilatérale chez les animaux SNL comparés aux naïfs. Il n'existe aucune modification de la surface occupée par le marqueur GFAP, laissant suggérer des modifications morphologiques des cellules GFAP immunopositives.

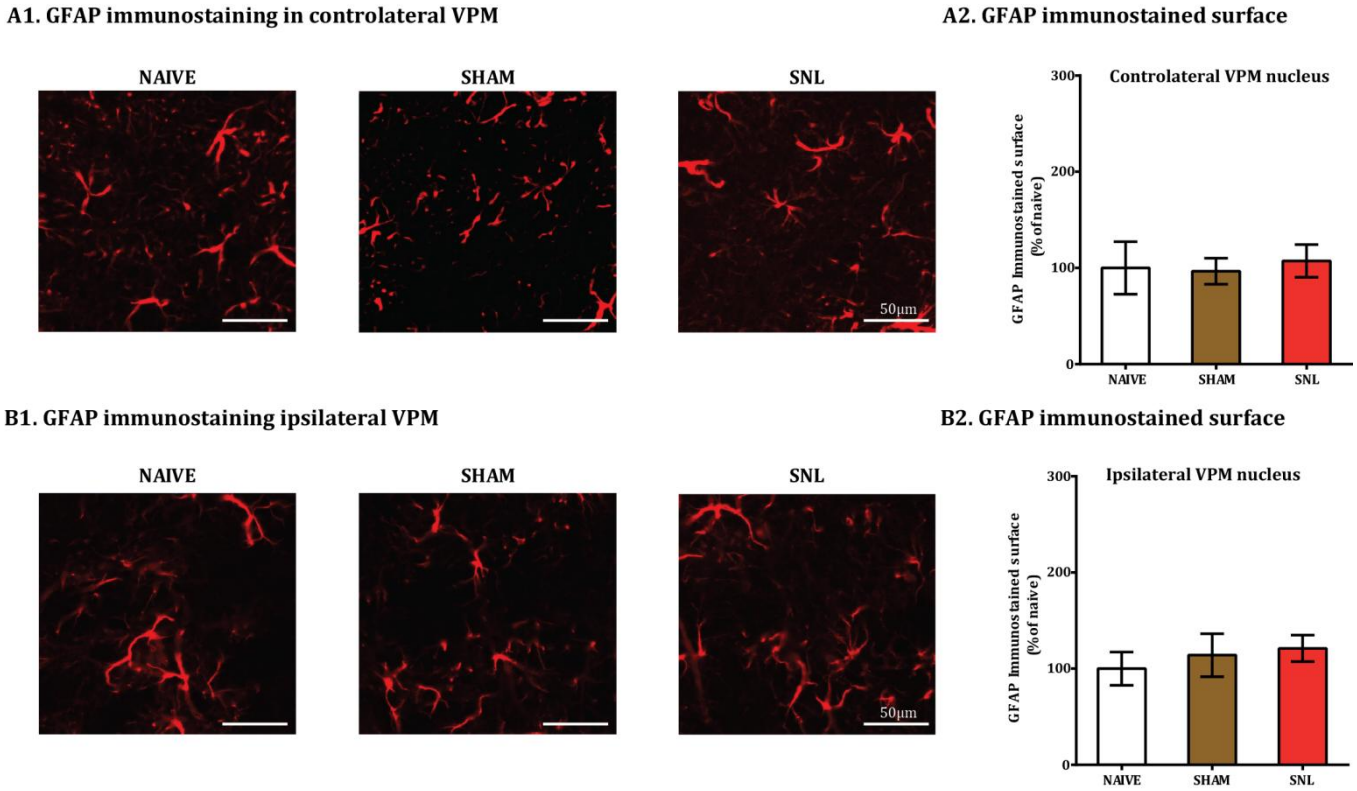


Figure 63 : Aucune modification de la surface occupée par l'immunomarquage GFAP dans les noyaux VPM à J14. L'immunomarquage GFAP apparait en rouge (A1 et B1). La surface occupée par l'immunomarquage GFAP dans le noyau VPM controlatéral ne présente aucune différence significative entre les conditions expérimentales (A1 et A2). La surface occupée par l'immunomarquage GFAP dans le VPM ipsilatéral ne présente pas non plus de différence significative entre les conditions expérimentales (B1, B2). (SNL : n=6, sham : n=5, naïfs : n=4 ; *, p<0,05)

La quantification de la surface occupée par l'immunomarquage GFAP au sein des noyaux VPM contro- et ipsilatéral n'a décelé aucune différence significative entre les trois groupes expérimentaux (Fig. 63, A1 et A2, B1 et B2).

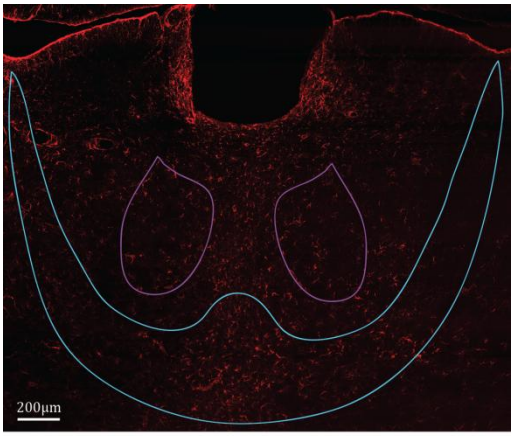


Figure 64 : Immunomarquage GFAP dans le thalamus central. L'immunomarquage de la protéine GFAP est visualisé en rouge. On note que la marquage est peu présent dans certaines zones du thalamus central. Les noyaux DM (en violet) et IL (en bleu) sont délimités comme illustré sur cette image.

Dans le thalamus central, l'immunomarquage GFAP est moins présent que dans d'autres structures cérébrales (par exemple autour du 3° ventricule ; Fig. 64). Là, les quantifications de la surface occupée par l'immunomarquage GFAP n'ont décelé aucune différence significative entre les trois groupes expérimentaux ni dans les noyaux DM (Fig. 65, A1 et A2) ni dans les noyaux IL (Fig. 65, B1 et B2). Ainsi, il ne semble pas exister de modifications de l'expression neurochimique du marqueur astrocytaire GFAP dans le thalamus central dans ce modèle de douleurs neuropathique SNL.

L'ensemble de cette étude de l'immunomarquage GFAP montre que la surface occupée par ce marqueur n'est pas modifiée par les conditions expérimentales dans le thalamus latéral et central. Toutefois, le nombre de cellules GFAP positives est significativement diminué de manière bilatérale dans le VPL chez les animaux SNL comparés aux naïfs.

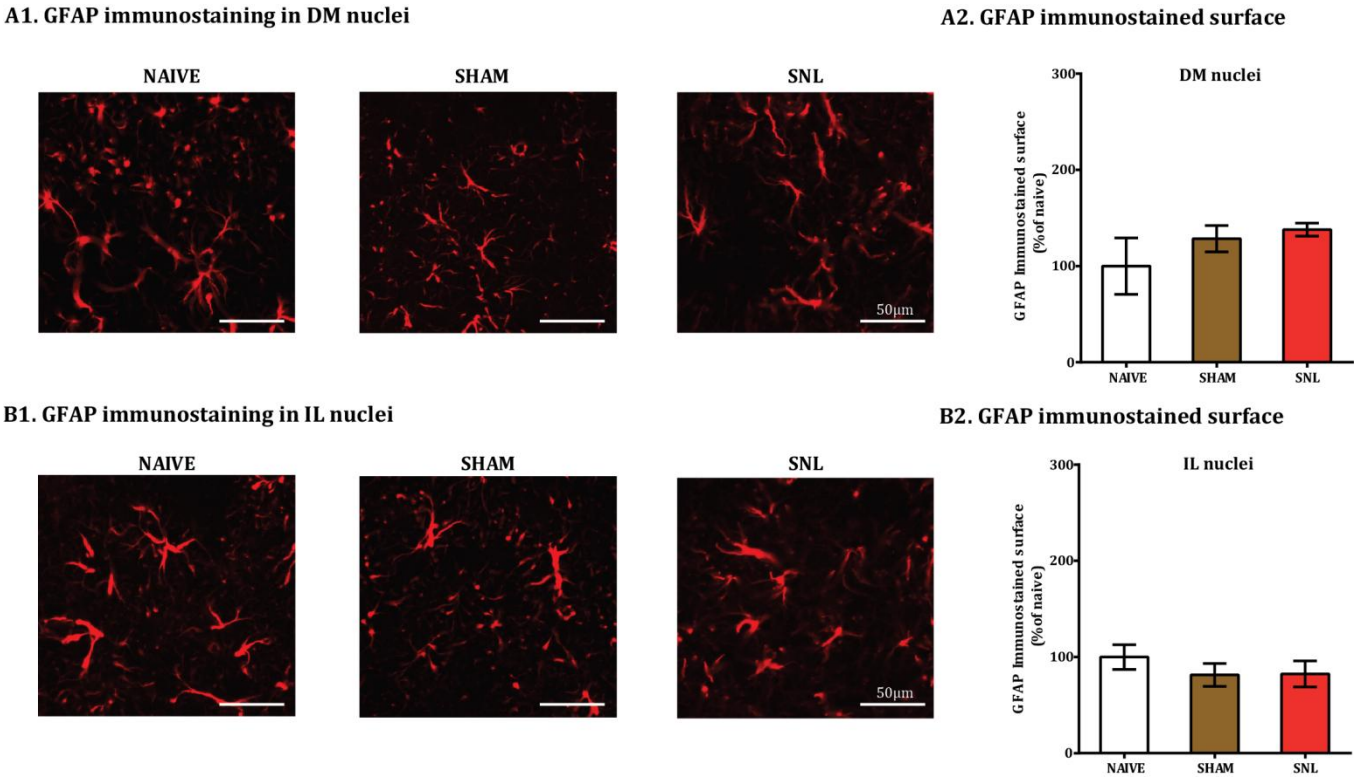


Figure 65 : Aucune différence entre les conditions expérimentales dans la surface occupée par le marquage GFAP dans les noyaux DM et IL à J14. L'immunomarquage GFAP est visualisé en rouge (A1 et B1). La surface occupée par l'immunomarquage GFAP dans les noyaux DM ne présente aucune différence significative entre les trois conditions expérimentales (A1 et A2). La surface occupée par l'immunomarquage GFAP dans les noyaux IL ne présente pas non plus de différence entre les trois groupes expérimentaux (B1 et B2). (SNL : n=6, sham : n=5, naïfs : n=4 ; *, p<0,05)

C.2.2- Immunomarquage de la protéine astrocytaire S100β

L'immunomarquage de la protéine S100β dans le thalamus est un marquage globalement homogène au sein des différents noyaux (Fig. 66, A). L'immunomarquage S100β est cytoplasmique et nucléaire. Il est présent au niveau du corps cellulaire et de la partie proximale des prolongements des astrocytes (Fig. 66, C). Cette localisation permet un comptage aisé des cellules S100β immunopositives. On note un faible immunomarquage diffus au niveau du parenchyme qui *a priori* correspond à de la S100β extracellulaire. En effet, la protéine S100β est synthétisée, stockée et libérée par les astrocytes. Pour diminuer au maximum ce marquage extracellulaire tout en gardant une bonne immunodétection des astrocytes, j'ai dilué l'anticorps primaire (voir matériels et méthodes). Les noyaux thalamiques ont été délimités comme illustré figure 66 (A, B ; ici du côté controlatéral) pour permettre les quantifications de l'immunomarquage.

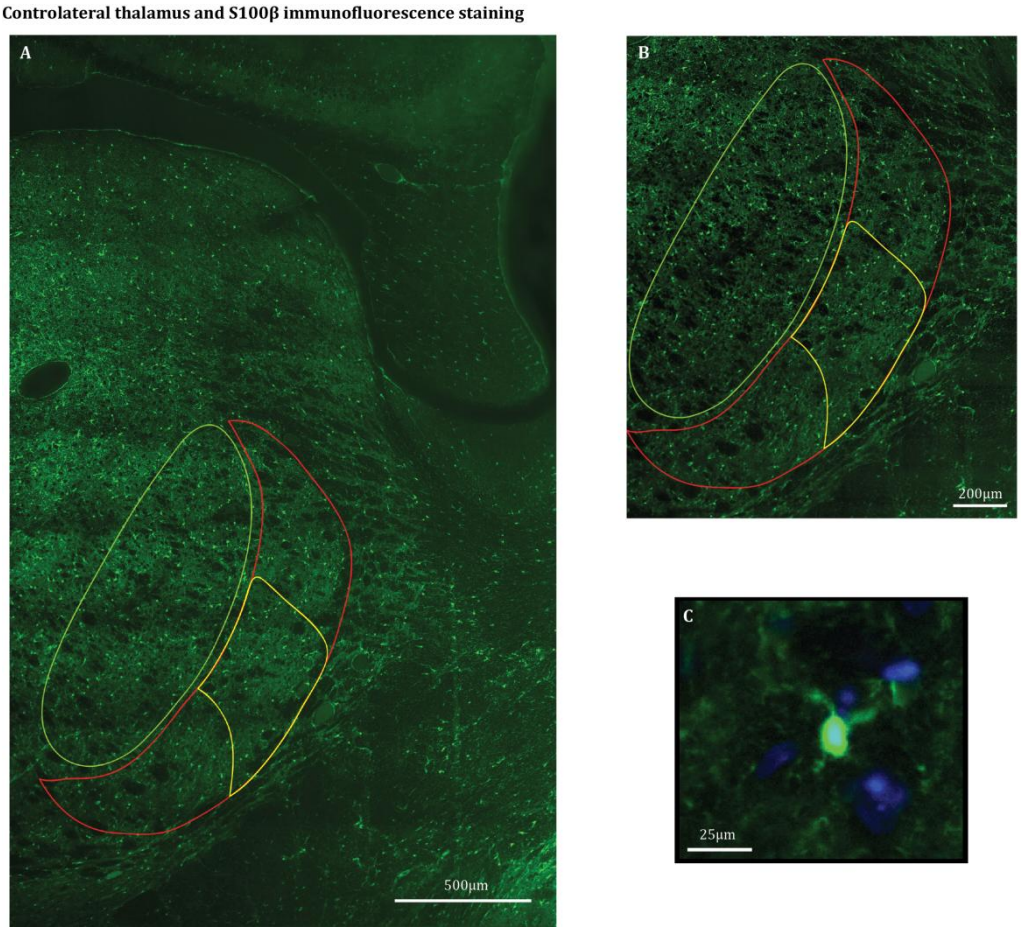
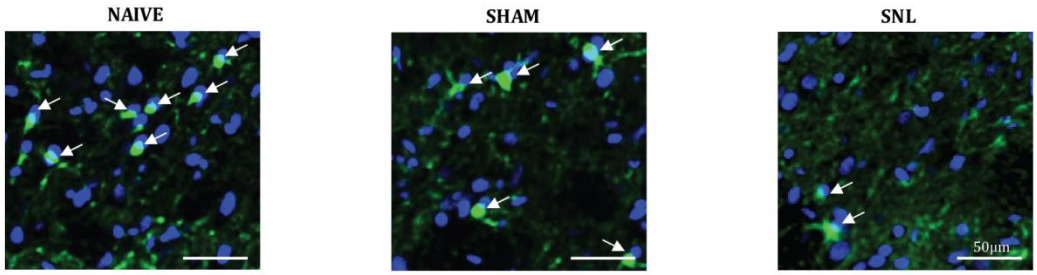


Figure 66 : Immunomarquage S100β dans le thalamus latéral. L'immunomarquage de la protéine S100β est visualisé en vert. Le marquage S100β est un marquage globalement homogène dans le thalamus latéral, ici illustré du côté controlatéral (A, B).On note un marquage cellulaire et un marquage plus faible et diffus dans le parenchyme environnant. Le noyau VPL est délimité en rouge, la sous-région du VPL en jaune et le noyau VPM en vert (A, B). La protéine S100β est une protéine cytoplasmique présente dans le corps cellulaire (colocalisation de l'immunomarquage S100β vert avec le marquage DAPI bleu qui résulte en une couleur turquoise) et les prolongements proximaux des astrocytes (C).

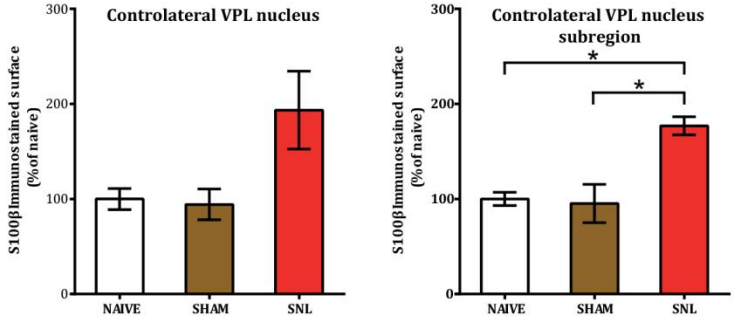
Dans le noyau VPL controlatéral, les analyses de la surface occupée par l'immunomarquage S100β a révélé une augmentation significative dans la SSR controlatérale des animaux SNL (77% d'augmentation) comparés aux animaux naïfs et sham (Fig. 67, A1 et A2). Malgré une nette tendance à l'augmentation de la surface occupée par l'immunomarquage S100β chez les animaux SNL dans le noyau VPL controlatéral, il n'existe pas de différence significative entre les trois conditions expérimentales. La quantification des cellules S100β immunopositives a mis en évidence une diminution significative (21,1% de diminution) au sein de la SSR controlatérale des

animaux SNL comparés aux animaux naïfs (Fig. 67, A1 et A3). Dans le noyau VPL ipsilatéral, les analyses de la surface occupée par l'immunomarquage S100β n'ont révélé aucune différence entre les trois groupes expérimentaux (Fig. 67, B1 et B2). Il en est de même pour la quantification des cellules S100β immunopositives qui ne montre aucune différence entre les trois groupes expérimentaux (Fig. 67, B1 et B3). On note tout de même une tendance à une diminution du nombre de cellules S100β immunopositives pour les animaux sham et SNL comparés aux animaux naïfs mais sans atteindre la significativité.

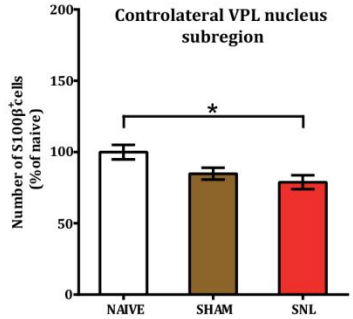
A1. S100β immunostaining in controlateral VPL



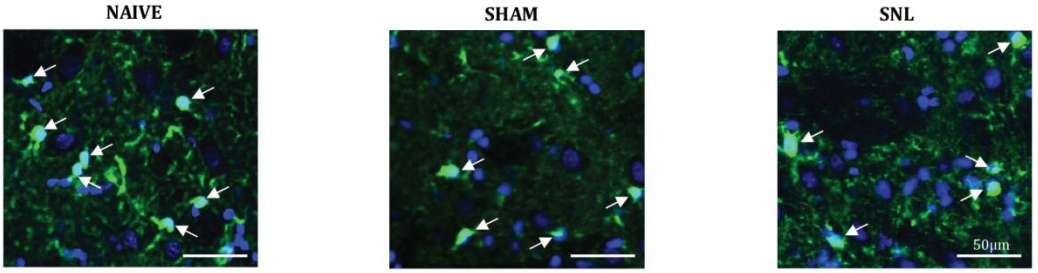
A2. S100β immunostained surface



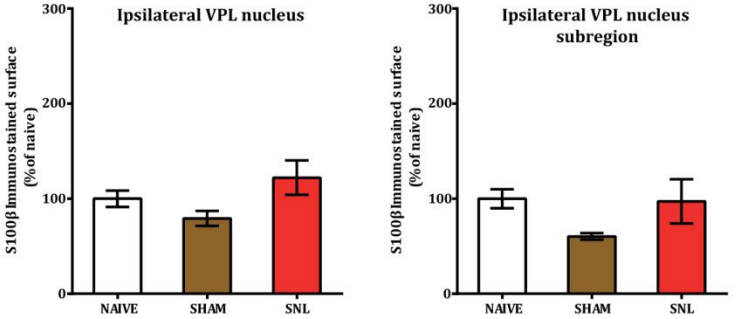
A3. S100β immunopositive cell number



B1. S100β immunostaining in ipsilateral VPL



B2. S100β immunostained surface



B3. S100β immunopositive cell number

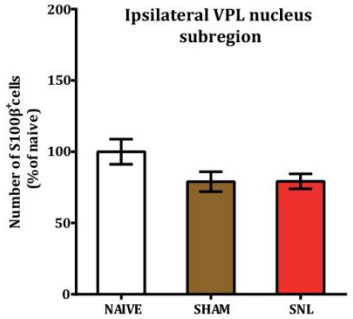


Figure 67 : Augmentation de la surface occupée par l'immunomarquage S100β et diminution du nombre de cellules S100β immunopositives dans la SSR controlatérale du VPL des animaux neuropathiques à J14. L'immunomarquage S100β est visualisé en vert et le marquage nucléaire DAPI apparait en bleu (A1 et B1). Les flèches blanches pointent aux cellules comptabilisées : elles présentent un immunomarquage S100β (vert) au niveau du corps cellulaire (marquage nucléaire bleu) ce qui se traduit par une couleur turquoise (A1, B1). La surface occupée par l'immunomarquage S100β dans le noyau VPL controlatéral ne présente pas de différence significative entre les conditions expérimentales même si une tendance à l'augmentation de la surface occupée par l'immunomarquage S100β chez les animaux SNL est notable (A1, A2). En revanche, au sein de la SSR controlatérale, la surface occupée par l'immunomarquage S100β augmente significativement chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs et sham (A1, A2). De plus, dans la SRR controlatérale, le nombre de cellules S100β immunopositives diminue significativement chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs (A3). La surface occupée du côté ipsilatéral par l'immunomarquage S100β dans le noyau VPL et sa SSR ne présente pas de différence significative entre les conditions expérimentales (B1, B2). Le nombre de cellules S100β immunopositives n'est pas non plus différent dans la SSR ipsilatérale entre les trois groupes expérimentaux. (B1, B3). On notera quand même une tendance à une diminution du nombre de cellules S100β immunopositives chez les SNL et les sham comparés aux animaux naïfs. (SNL : n=6, sham : n=5, naïfs : n=4 ; *, $p<0,05$)

Ainsi, il existe une augmentation significative de la surface occupée par l'immunomarquage S100β ainsi qu'une diminution du nombre de cellules astrocytaires S100β immunopositives dans la SSR du VPL controlatéral chez les animaux SNL.

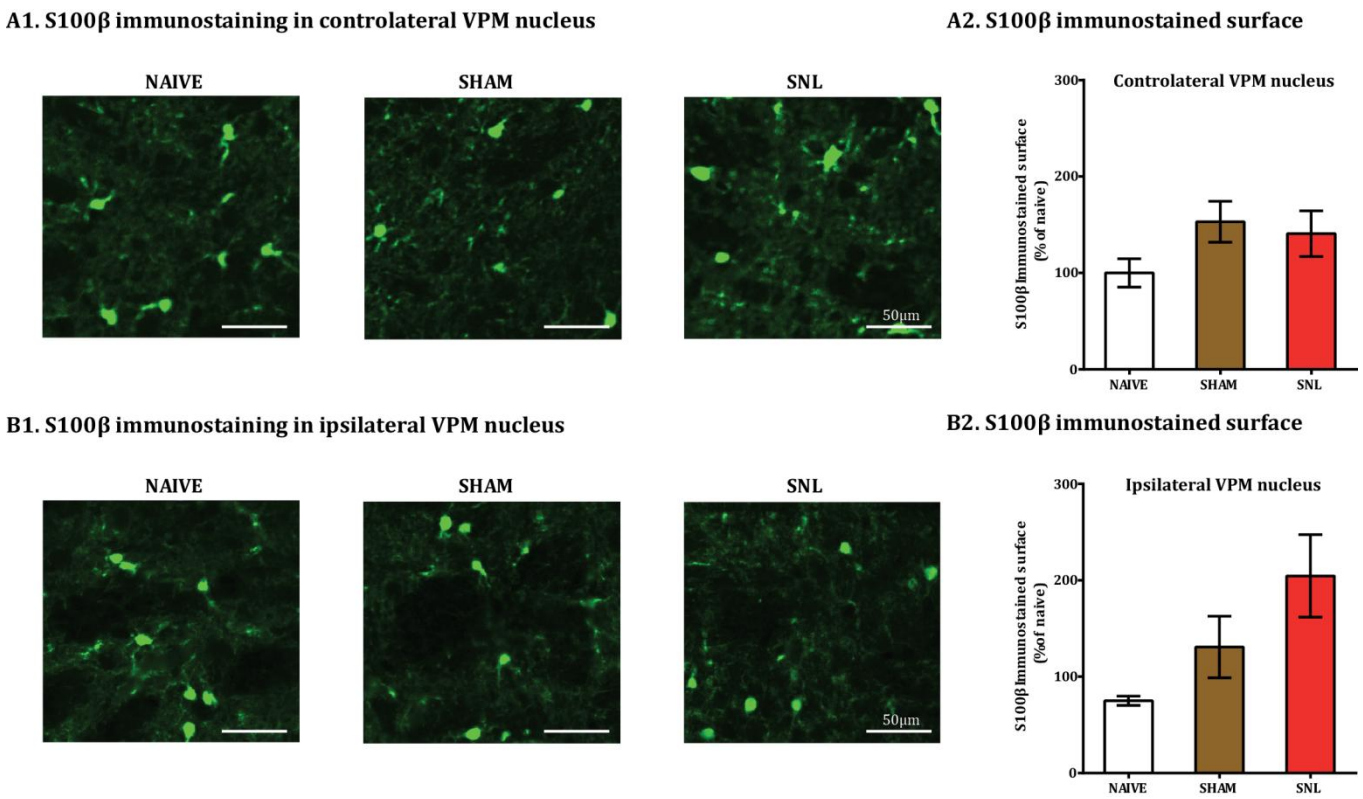


Figure 68 : Aucune modification de la surface occupée par l'immunomarquage S100β dans les noyaux VPM entre les différentes conditions expérimentales à J14. L'immunomarquage S100β apparait en vert (A1 et B1). La surface occupée par l'immunomarquage S100β dans le noyau VPM controlatéral ne présente aucune différence significative entre les conditions expérimentales (A1 et A2). La surface occupée par l'immunomarquage S100β dans le VPM ipsilatéral ne présente pas non plus de différence significative entre les conditions expérimentales bien qu'une tendance nette à l'augmentation est visible chez les animaux SNL (B1, B2). (SNL : n=6, sham : n=5, naïfs : n=4 ; *, $p<0,05$)

La quantification de la surface occupée par l'immunomarquage S100β au sein des noyaux VPM contro- et ipsilatéral n'a décelé aucune différence significative entre les trois groupes expérimentaux bien qu'il faille noter la présence d'une tendance à l'augmentation de la surface occupée par l'immunomarquage S100β chez les animaux SNL dans le noyau VPM ipsilatéral (Fig. 68, A1 et A2, B1 et B2) même si les variations interindividuelles sont importantes.

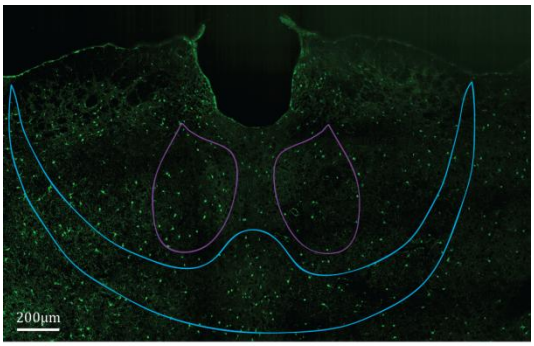


Figure 69 : Immunomarquage S100β dans le thalamus central. L'immunomarquage de la protéine S100β est visualisé en vert. Il s'agit d'un marquage globalement homogène. Les noyaux DM (en violet) et IL (en bleu) sont délimités comme illustré sur cette image.

Dans le thalamus central, l'immunomarquage S100β est également homogène (Fig. 69). Là, les quantifications de la surface occupée par l'immunomarquage S100β n'ont décelé aucune différence significative entre les trois groupes expérimentaux ni dans les noyaux DM (Fig. 70, A1 et A2) ni dans les noyaux IL (Fig. 70, B1 et B2). Ainsi, il ne semble pas exister de modifications de l'expression neurochimique du marqueur astrocytaire S100β dans le thalamus central dans ce modèle de douleurs neuropathique SNL.

Ainsi, l'étude de l'expression neurochimique du marqueur astrocytaire S100β dans le thalamus latéral et central a révélé des modifications uniquement dans la SSR controlatérale : une diminution significative du nombre de cellules S100β immunopositives chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs et une augmentation significative de la surface occupée par le marquage S100β chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs et sham. La coexistence de ces deux phénomènes (moins de cellules marquées et plus de surface marquée) implique des modifications morphologiques des cellules S100β immunopositives.

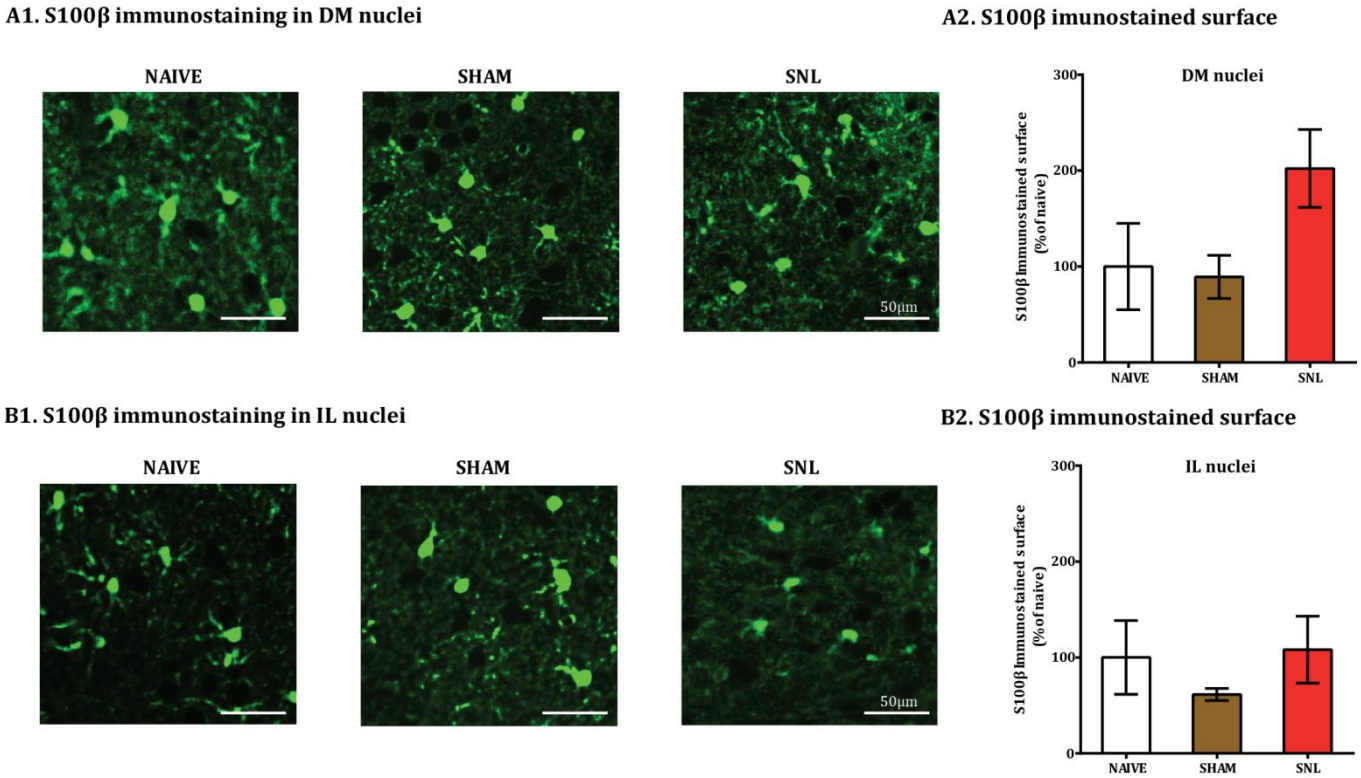


Figure 70 : Aucune différence significative entre les trois conditions expérimentales dans la surface occupée par le marquage S100β dans les noyaux DM et IL à J14. En vert, l'immunomarquage S100β couplé au fluorochrome A488 (A1 et B1). La surface occupée par l'immunomarquage S100β dans les noyaux DM ne présente aucune différence significative entre les trois conditions expérimentales bien qu'une tendance à l'augmentation de la surface occupée par l'immunomarquage S100β soit à noter pour les animaux SNL (A1 et A2). La surface occupée par l'immunomarquage S100β dans les noyaux IL ne présente pas de différence entre les trois groupes expérimentaux (B1 et B2). (SNL : n=6, sham : n=5, naïfs : n=4 ; *, $p<0,05$)

L'absence de signes robustes de réactivité gliale ainsi que la mise en évidence d'une diminution du nombre de cellules exprimant des marqueurs gliaux dans le thalamus m'ont conduit à me demander si ma fenêtre temporelle d'étude n'était pas trop précoce. J'ai ainsi poursuivi mon étude en réalisant la même approche comportementale, moléculaire et immunohistochimique mais cette fois-ci vingt-huit jours après les chirurgies.

II- Vingt-huit jours après la ligature des nerfs spinaux : maintien des symptômes douloureux et indices de réactivité gliale thalamique

A- Maintien des symptômes douloureux chez les animaux SNL

A.1- Allodynie et hyperalgésie mécaniques

Le seuil nociceptif à J28 de la patte arrière ipsilatérale est drastiquement diminué chez les animaux SNL (0,62 ± 0,13 g) comparé aux animaux naïfs (4,65 ± 0,46 g) et sham (2,66 ± 0,26 g) (Fig. 71, A). Les animaux sham présentent également une diminution significative du seuil nociceptif de leur patte arrière ipsilatérale par rapport à celui des animaux naïfs. La mesure du seuil nociceptif montre qu'il y a à J28 un maintien du symptôme d'allodynie mécanique déjà observé à J14 chez les animaux SNL et sham.

Le score d'allodynie mesuré à J28 pour la patte arrière ipsilatérale est toujours significativement beaucoup plus élevé chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs et sham (près de 64 fois supérieur ; Fig. 71, B). En utilisant cette mesure de l'allodynie on se rend compte que seuls les animaux SNL développent (J14) et maintiennent (J28) des symptômes d'allodynie. Le score d'hyperalgésie mesuré à J28 pour la patte arrière ipsilatérale est là encore significativement plus élevé chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs et sham (près de trois fois supérieur ; Fig. 71, C). Par contre, le score d'hyperalgésie des animaux sham n'est maintenant plus significativement différent de celui des animaux naïfs. La légère hyperalgésie développée par la patte arrière ipsilatérale des animaux sham à J14 n'est donc plus présente à J28. En revanche, l'hyperalgésie développée à J14 par la patte arrière ipsilatérale des animaux SNL est maintenue à J28.

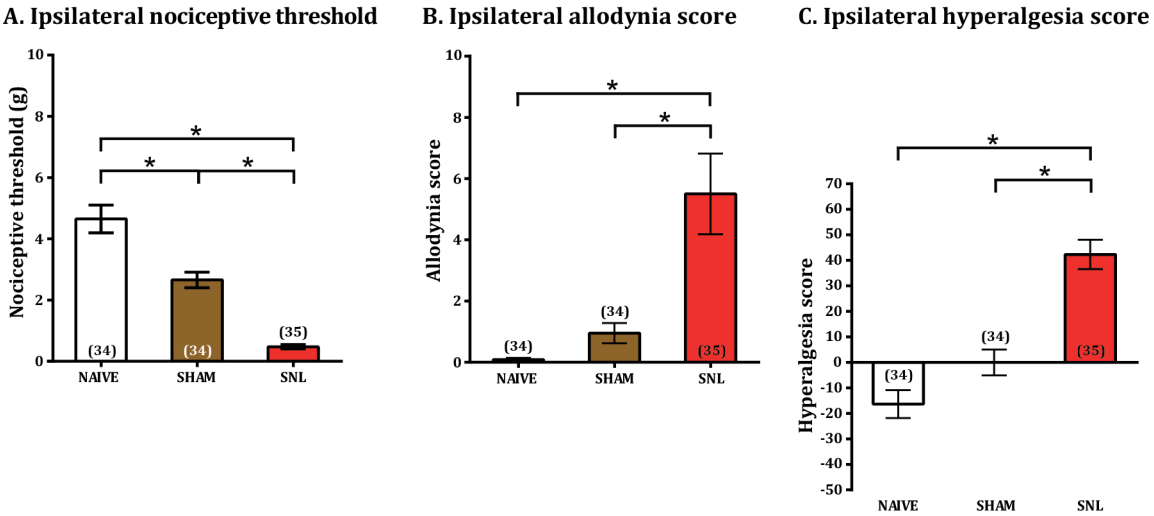


Figure 71 : Maintien des symptômes d'allodynie et d'hyperalgésie mécaniques sur la patte arrière ipsilatérale des animaux SNL. En A, le seuil nociceptif observé à J28 pour la patte arrière ipsilatérale est extrêmement diminué pour les animaux SNL comparé à celui des aux animaux naïfs et sham. Les animaux sham possèdent également un seuil significativement plus faible que celui des animaux naïfs. En B, le score d'allodynie de la patte arrière ipsilatérale des animaux SNL est extrêmement élevé comparé aux animaux naïfs et sham. A J28, le symptôme d'allodynie pour la patte arrière ipsilatérale est maintenu chez les animaux SNL. En C, le score d'hyperalgésie est lui aussi significativement plus important chez les animaux SNL que chez les animaux naïfs et sham. A J28, le symptôme d'hyperalgésie pour la patte arrière ipsilatérale est maintenu chez les animaux SNL. (*, $p<0,05$)

Concernant la patte arrière controlatérale, les résultats ne mettent en évidence aucune différence significative entre les trois groupes expérimentaux à J28 que ce soit pour le seuil nociceptif (Fig. 72, A), le score d'allodynie (Fig. 72, B) ou encore pour le score d'hyperalgésie (Fig. 72, C). Ainsi, à J28, les phénomènes de compensations observés à J14 pour les animaux SNL ne sont plus présents.

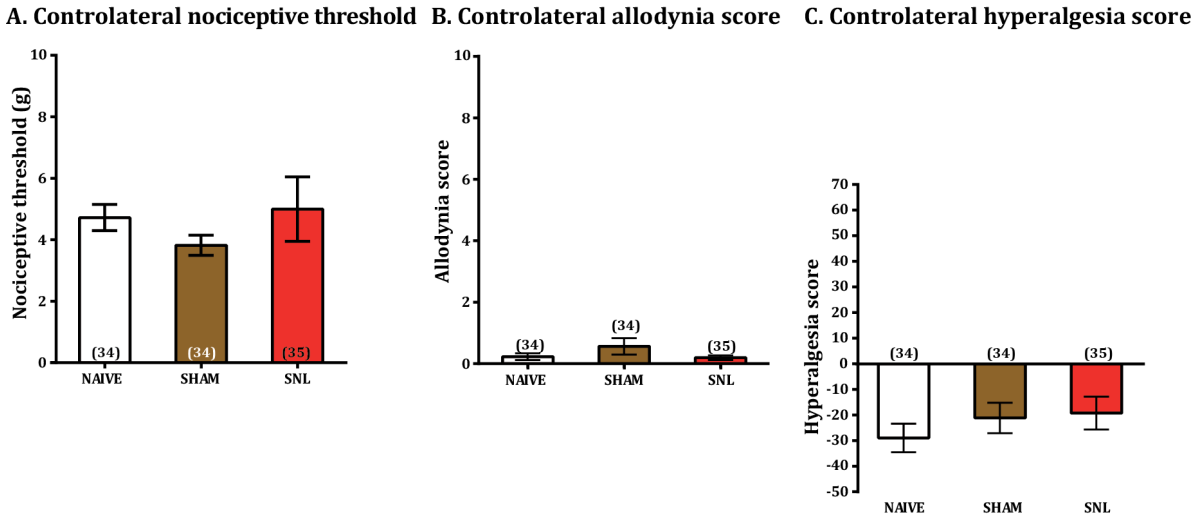


Figure 72 : Suivi du seuil nociceptif et des scores d'allodynie et d'hyperalgésie pour la patte arrière controlatérale des animaux à J28. En A, le seuil nociceptif observé à J28 pour la patte arrière controlatérale ne présente aucune différence significative entre les conditions expérimentales. En B, le score d'allodynie de la patte controlatérale ne présente pas non plus de différence entre les différentes conditions expérimentales à J28. En C, le score d'hyperalgésie ne présente aucune différence significative entre les trois groupes expérimentaux à J28. A J28, il n'existe aucune différence significative entre les trois groupes expérimentaux concernant ces trois paramètres pour la patte arrière controlatérale. (*, $p<0,05$)

A.2- Douleurs ambulatoires

Le test de distribution pondéral dynamique effectué à J28 a mis en évidence le maintien de la diminution significative du poids porté par la patte arrière ipsilatérale des animaux SNL comparés aux animaux naïfs et sham (Fig. 73, A). Les animaux SNL présentent toujours des douleurs ambulatoires à J28. De plus, le poids porté aussi bien par la patte arrière controlatérale que par les pattes avant de ces animaux SNL est significativement plus important que celui mesuré chez les animaux naïfs et sham (Fig. 73, B, C et D). Il y a donc une amplification des mécanismes de compensation déjà présents à J14 : les animaux SNL reportent à J28 leur poids sur toutes les autres pattes. Ce test montre également une diminution significative à J28 du poids porté par la patte arrière ipsilatérale des animaux sham comparés aux animaux naïfs (Fig. 73, A). De manière surprenante, ce phénomène n'est pas compensé par des augmentations significatives du poids porté par les autres pattes chez ces animaux (Fig. 73, B, C et D).

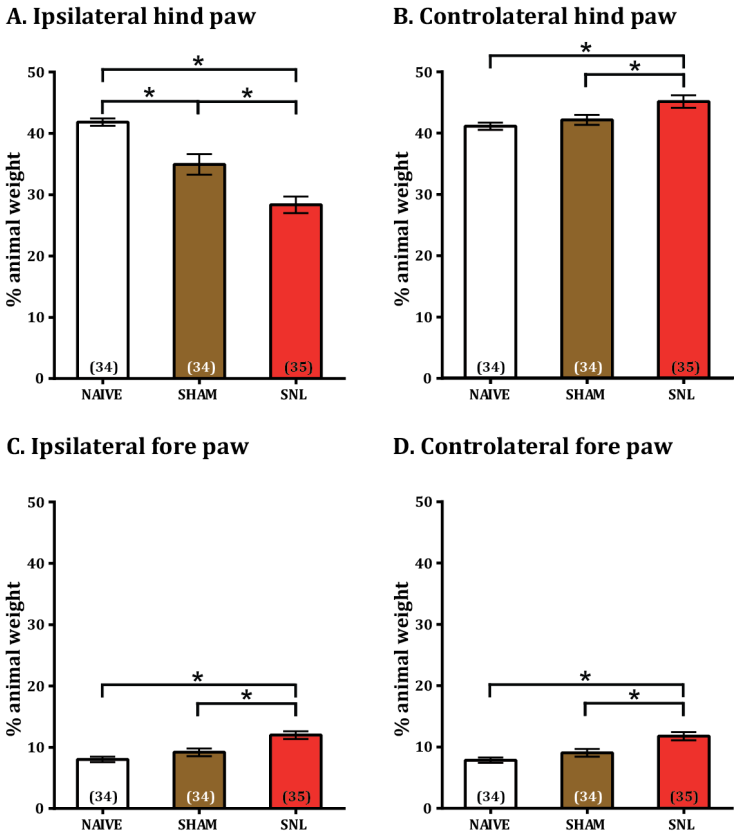


Figure 73 : Maintien des douleurs ambulatoires et amplification des phénomènes compensatoires chez les animaux SNL à J28. En A, le poids porté par la patte arrière ipsilatérale est significativement diminué chez les animaux SNL comparés aux naïfs et aux sham à J28. Les animaux SNL développent des douleurs ambulatoires à J14 et s'appuient ainsi moins sur leur patte douloureuse. De plus, le poids porté par la patte ipsilatérale des animaux sham est significativement moins importante que celui porté par la patte ipsilatérale des animaux naïfs. Les animaux sham développent de légères douleurs ambulatoires. En B, on remarque que le poids porté par la patte arrière controlatérale des animaux SNL est plus grand que celui des animaux naïfs et sham à J28. En C et D, le poids porté par les pattes avant ipsilatérale et controlatérale respectivement augmente à J28 chez les SNL comparés aux animaux naïfs et sham. Ainsi, les animaux SNL compensent la diminution du poids porté par la patte arrière ipsilatérale en augmentant le poids porté par leur patte arrière controlatérale et leurs deux pattes avant. Les animaux sham ne reportent pas significativement plus de poids sur d'autres pattes. (*, $p<0,05$)

Ainsi, notre étude a mis évidence le maintien des symptômes d'allodynie et d'hyperalgésie mécaniques ainsi que de douleurs ambulatoires chez les animaux SNL vingt-huit jours après la ligature des nerfs spinaux. De plus, la légère hyperalgésie ipsilatérale des animaux sham n'est plus présente à J28. Par contre, de manière surprenante, ces animaux sham présentent des signes de douleurs ambulatoires mais sans phénomène compensatoire.

B- Poursuite des signes de réactivité microgliale thalamique par approche de qRT-PCR

B.1- qRT-PCR sur prélèvements de tissus thalamiques

Dans cette première partie, les résultats de qRT-PCR des 54 gènes testés ont pu être exploités. Dans les tissus thalamiques latéraux prélevés du côté controlatéral à J28, les analyses de qRT-PCR ont révélé une tendance à une moindre expression de l'ARNm des marqueurs testés chez les animaux SNL comparés aux naïfs (Fig. 74). Dans un premier temps, l'étude des marqueurs astrocytaires a révélé une diminution significative de l'ARNm codant pour S100β de 20% chez les animaux SNL et sham comparés aux animaux naïfs (Fig. 75, A1). L'expression de l'ARNm codant pour ce gène chez les animaux sham n'est pas différente de celle des animaux SNL. L'expression de l'ARNm codant pour GS est également significativement plus faible de 12% chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs (Fig. 75, A2). L'expression de l'ARNm de ce marqueur chez les animaux sham se situe entre celle trouvée chez les animaux naïfs et celle trouvée chez les SNL sans toutefois présenter de différence significative. Enfin, l'étude a montré une diminution significative de l'expression de l'ARNm codant pour la DAAO de 45% chez les animaux sham comparés aux animaux naïfs (Fig. 75, A3). On notera que l'expression de cet ARNm chez les animaux SNL est proche de celle des animaux sham, sans pour autant être significativement différente de celle des animaux naïfs.

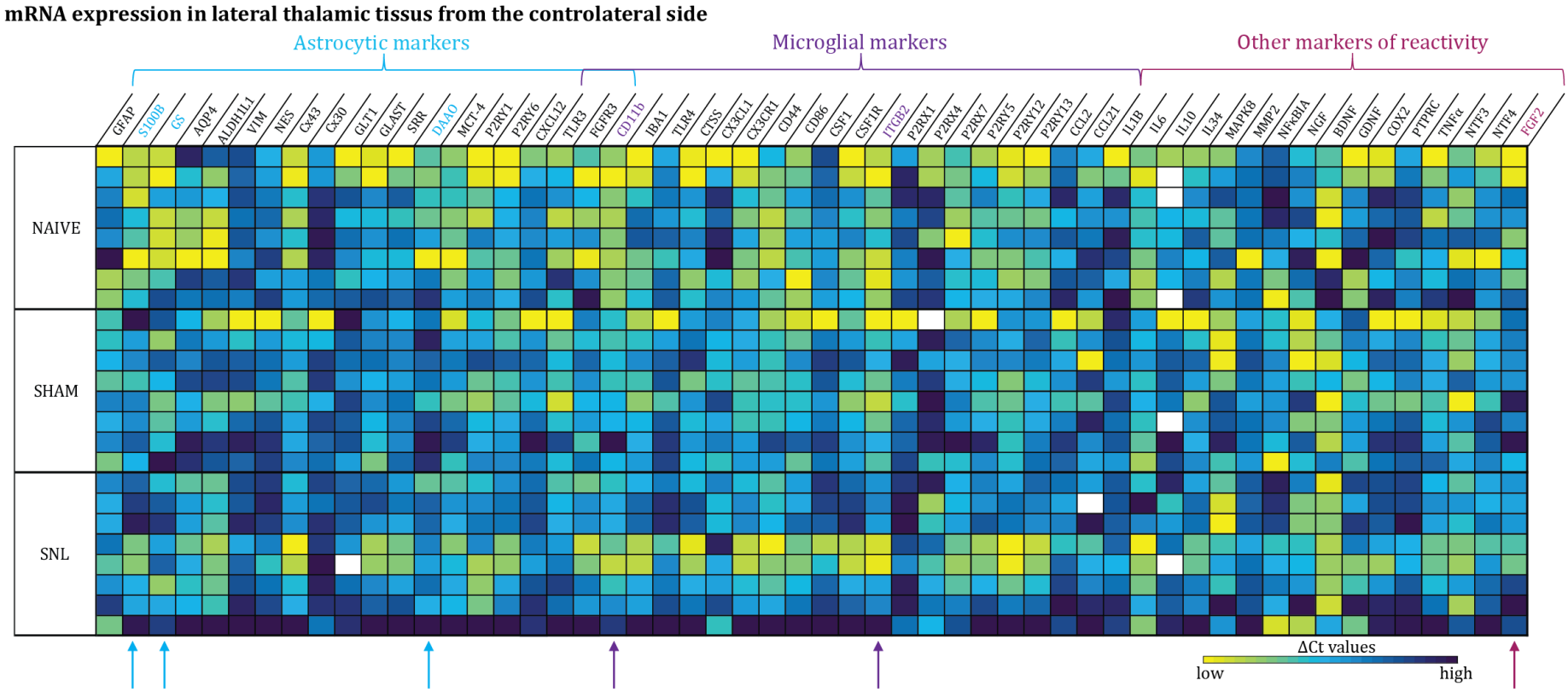
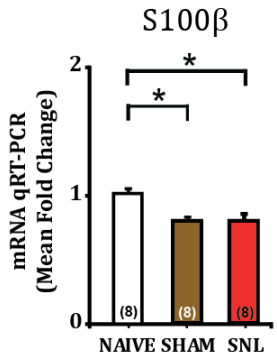
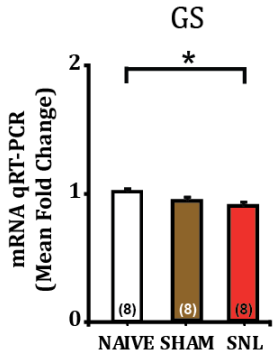


Figure 74 : Représentation mosaïque de l'expression de l'ARNm des 54 gènes testés sur les tissus thalamiques latéraux du côté controlatéral à J28. Le tableau représente le $\Delta Ct = Ct_{(gène\ testé)} - Ct_{(gènes\ de\ référence)}$ obtenu pour chaque gène et chaque animal. Plus le ΔCt est petit plus l'expression de l'ARNm est forte, plus il est grand plus l'expression de l'ARNm est faible. Le code couleur du jaune (forte expression de l'ARNm) au violet (faible expression de l'ARNm) permet une représentation visuelle de l'ensemble des résultats obtenus Les flèches correspondent aux gènes qui présentent des différences significatives entre les conditions expérimentales (voir figure suivante). Il existe une tendance générale à une moindre expression des ARNm des marqueurs étudiés (notamment astrocytaires) chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs. (SNL, sham et naïfs : n=8, sauf pour certains gènes où il y a eu des problèmes expérimentaux = case blanche).

A1. S100β mRNA expression in lateral thalamic tissus from the controlateral side



A2. GS mRNA expression in lateral thalamic tissus from the controlateral side



A3. DAAO mRNA expression in lateral thalamic tissus from the controlateral side

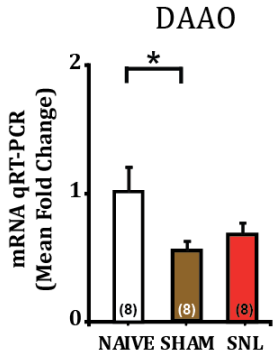
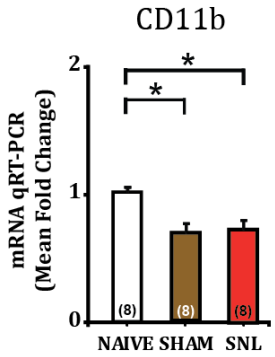


Figure 75 : Diminution significative dans les tissus thalamiques prélevés du côté controlatéral de l'expression de l'ARNm des marqueurs astrocytaires codant pour la S100β, GS et DAAO chez les animaux SNL et/ou sham comparés aux animaux naïfs à J28. Le graphique représente le facteur de variation ou fold change ($FC= 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ où $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{condition d'intérêt})} - \Delta Ct_{(\text{condition de référence})}$La condition de référence est ici la condition « animaux naïfs ». L'expression de l'ARNm codant pour S100β est significativement moins importante chez les animaux SNL et sham que chez les animaux naïfs (A1). On remarque que l'expression de l'ARNm codant pour ce gène chez les animaux sham est n'est pas différente de celle des animaux SNL. De plus, l'expression de l'ARNm codant pour GS est significativement plus faible chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs (A2). Les animaux sham se situent en position intermédiaire entre les animaux naïfs et SNL sans être significativement différent avec ces groupes expérimentaux. Enfin, l'expression de l'ARNm codant pour la DAAO est significativement moins importante chez les animaux sham que chez les animaux naïfs (A3). On notera que l'expression de l'ARNm de la DAAO chez les animaux SNL est très proche de celle des animaux sham sans être significativement différente de celle des animaux naïfs pour autant (SNL, sham et naïfs : n=8 ; *, $p<0,05$).

Dans un second temps, cette étude a mis en évidence des diminutions de l'expression de l'ARNm de marqueurs microgliaux. Ainsi, il existe une diminution significative de l'expression de l'ARNm codant pour le marqueur microglial CD11b d'environ 30% chez les animaux SNL et sham comparés aux animaux naïfs (Fig. 76, A1). Il n'existe donc pas de différence entre l'expression de l'ARNm de ce marqueur entre les animaux neuropathiques et sham. De plus, l'étude révèle également une diminution significative de 24% de l'expression de l'ARNm codant pour le marqueur microglial Itgβ2 chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs (Fig. 76, A2). L'expression de l'ARNm de ce marqueur chez les animaux sham se situe entre celle des animaux naïfs et celle des animaux SNL, sans toutefois être significativement différente.

A1. CD11b mRNA expression in lateral thalamic tissus from the controlateral side



A2. Itgβ2 mRNA expression in lateral thalamic tissus from the controlateral side

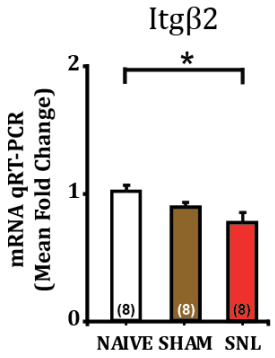


Figure 76 : Diminution significative dans tissus thalamiques prélevés du côté controlatéral de l'expression de l'ARNm des marqueurs microgliaux codant pour CD11b chez les animaux SNL et sham et Itgβ2 chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs à J28. Le graphique présente le facteur de variation ($FC = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ où $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(condition\ d'intérêt)} - \Delta Ct_{(condition\ de\ référence)}$). La condition de référence est ici la condition « animaux naïfs ». L'expression de l'ARNm codant pour CD11b diminue significativement chez les animaux neuropathiques et sham comparés aux animaux naïfs (A1). L'expression cet ARNm chez les animaux sham est proche de celle des animaux SNL. De plus, l'expression de l'ARNm codant pour Itgβ2 diminue significativement chez les animaux SNL comparés aux animaux

naïfs (A2). L'expression de cet ARNm chez les animaux sham se situe entre celle des animaux naïfs et celle des animaux SNL mais sans en être significativement différente (SNL, sham et naïfs : n=8 ; *, p<0,05).

Dans un dernier temps, cette étude de qRT-PCR dans les tissus thalamiques latéraux du côté controlatéral a mis en évidence une diminution de l'expression de l'ARNm d'un autre marqueur de réactivité, le facteur FGF2 (Fig. 77). Il existe une diminution significative de l'expression de l'ARNm codant pour le marqueur FGF2 de 20% chez les animaux sham comparés aux animaux naïfs. L'expression de l'ARNm codant pour le marqueur FGF2 est moindre chez les animaux SNL que chez les naïfs, sans pour autant être significativement différente.

FGF2 mRNA expression in lateral thalamic tissus from the controlateral side

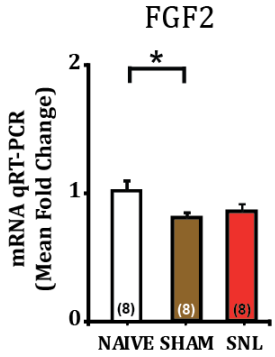


Figure 77 : Diminution significative dans les tissus thalamiques prélevés du côté controlatéral de l'expression de l'ARNm codant pour le marqueur de réactivité FGF2 chez les animaux sham comparés aux animaux naïfs à J28. Le graphique représente le facteur de variation ou fold change (FC= $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ où $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{condition d'intérêt})} - \Delta Ct_{(\text{condition de référence})}$. La condition de référence est ici la condition « animaux naïfs ». L'expression de l'ARNm codant pour Fgf2 est significativement moins importante chez les animaux sham que chez les animaux naïfs. On remarque que l'expression de l'ARNm codant pour ce gène chez les animaux SNL est très proche de celle des animaux sham, mais n'est tout de même pas significativement différente de celle des animaux naïfs. (SNL, sham et naïfs : n=8 ; *, p<0,05).

Ainsi, l'analyse de l'expression des ARNm des marqueurs étudiés dans les tissus thalamiques latéraux prélevés du côté controlatéral a révélé plusieurs diminutions d'expression de marqueurs astrocytaires et microgliaux à J28 chez les animaux neuropathiques et/ou sham comparés aux naïfs. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les animaux SNL et sham.

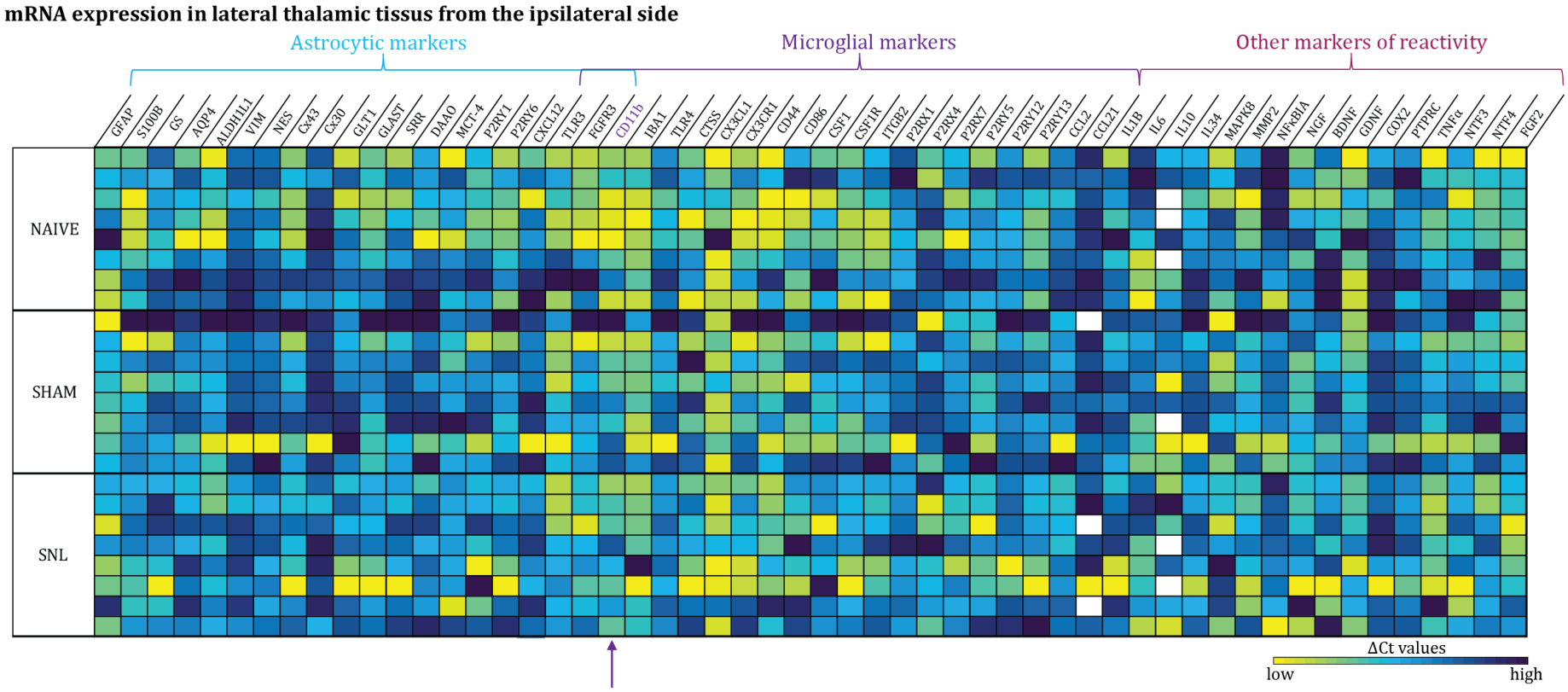


Figure 78 : Représentation mosaïque de l'expression de l'ARNm des 54 gènes testés sur les tissus thalamiques prélevés du côté ipsilatéral à J28. Le tableau représente le ΔCt= $Ct_{(gène\ testé)}$- $Ct_{(gènes\ de\ référence)}$ obtenu pour chaque gène et chaque animal. Plus le ΔCt est petit plus l'expression de l'ARNm est forte, plus il est grand plus l'expression de l'ARNm est faible. Le code couleur du jaune (forte expression de l'ARNm) au violet (faible expression de l'ARNm) permet une représentation visuelle de l'ensemble des résultats obtenus. La flèche correspond au gène qui présente une différence significative entre les conditions expérimentales. On ne note pas de tendance spécifique dans l'expression de l'ARNm des gènes testés (SNL, sham et naïfs : n=8, sauf pour certains gènes où il y a eu des problèmes expérimentaux).

Dans les tissus thalamiques latéraux du côté ipsilatéral à J28, on ne note pas de tendance bien affirmée à des variations dans l'expression de l'ARNm des 54 gènes testés en fonction des conditions expérimentales (Fig. 78). Seule une différence significative a été mise à jour grâce aux analyses de qRT-PCR : une diminution de l'expression de l'ARNm codant pour le marqueur microglial CD11b de 30% chez les animaux sham comparés aux animaux naïfs (Fig. 78 et Fig. 79). On peut noter que l'expression de l'ARNm de ce marqueur est proche de celle des animaux sham, sans toutefois être significativement différente de celle des animaux naïfs.

CD11b mRNA expression in lateral thalamic tissus from the ipsilateral side

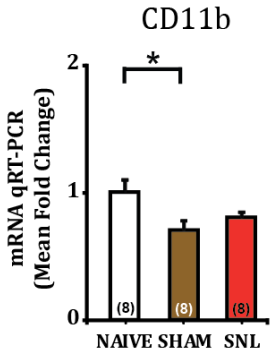


Figure 79 : Diminution significative dans les tissus thalamiques latéraux prélevés du côté ipsilatéral de l'expression de l'ARNm codant pour le marqueur microglial CD11b chez les animaux sham comparés aux animaux naïfs à J28. Le graphique représente le facteur de variation ou fold change ($FC= 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ où $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(condition\ d'intérêt)} - \Delta Ct_{(condition\ de\ référence)}$La condition de référence est ici la condition « animaux naïfs ». L'expression de l'ARNm codant pour CD11b est significativement plus faible chez les animaux sham que chez les animaux naïfs. On remarque que l'expression de l'ARNm codant pour ce gène chez les animaux SNL est proche de celle obtenue chez les animaux sham, mais n'est pas différente significativement de celle des animaux naïfs pour autant (SNL, sham et naïfs : n=8 ; *, $p<0,05$).

Ainsi, dans ces tissus thalamiques latéraux à J28, deux fois plus de marqueurs voient l'expression de leur ARNm altérée comparé à J14. Ce sont aussi bien des marqueurs astrocytaires que microgliaux. Toutes les variations observées vont toujours dans le sens d'une diminution de l'expression des ARNm par rapport à celle observée chez les animaux naïfs. Là encore, j'ai été surprise car je m'attendais plutôt à des sur-expressions. De plus l'expression de l'ARNm de quatre marqueurs est significativement diminuée chez les animaux sham comparés aux naïfs. Ainsi la seule chirurgie semble 28 jours après encore entraîner des variations d'expression d'ARNm de marqueurs gliaux dans le thalamus latéral.

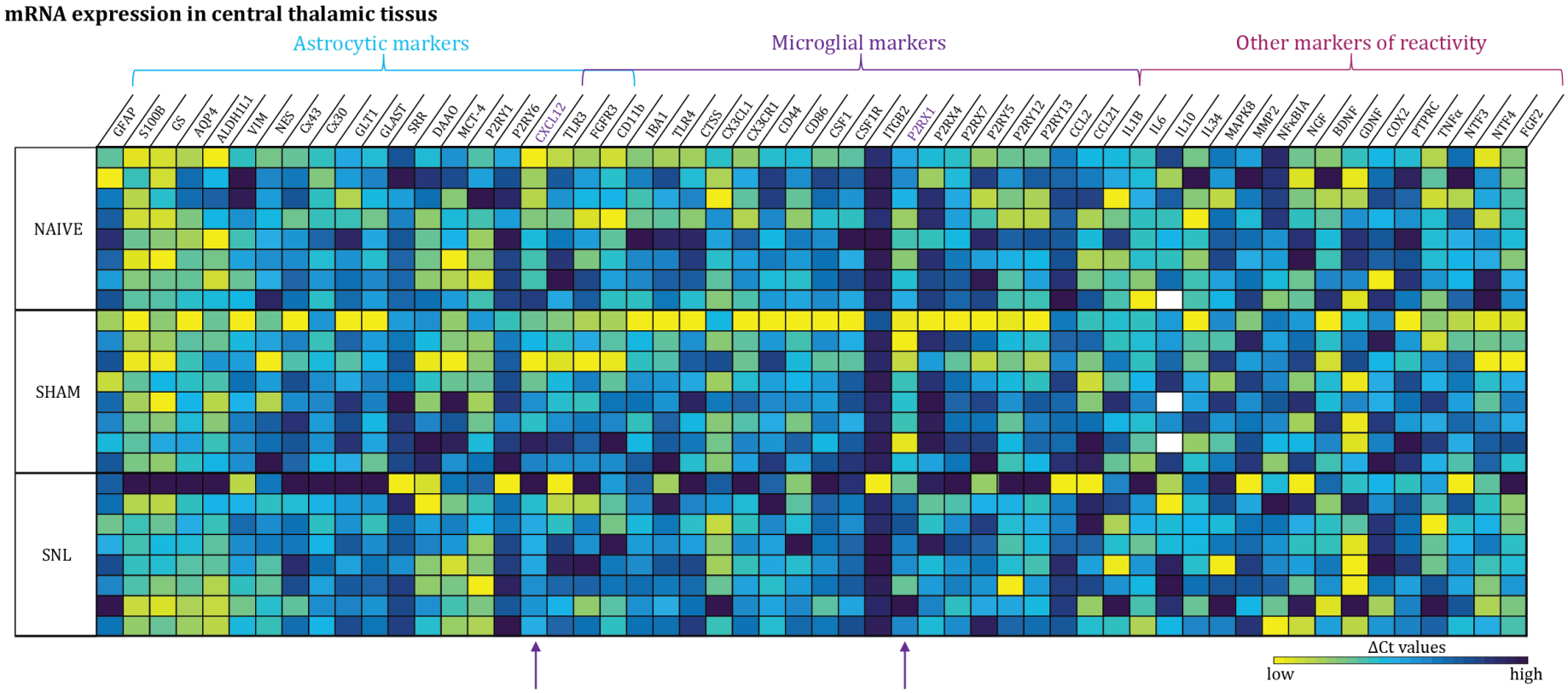


Figure 80 : Représentation mosaïque de l'expression de l'ARNm des 54 gènes testés sur les tissus thalamiques centraux à J28. L'expression de l'ARNm de 54 gènes différents a été testée ici. Le tableau représente le ΔCt= $Ct_{(gène\ testé)}$- $Ct_{(gènes\ de\ référence)}$ obtenu pour chaque gène et chaque animal. Plus le ΔCt est petit plus l'expression de l'ARNm est forte, plus il est grand plus l'expression de l'ARNm est faible. Le code couleur du jaune (forte expression de l'ARNm) au violet (faible expression de l'ARNm) permet une représentation visuelle de l'ensemble des résultats obtenus Les flèches correspondent aux gènes qui présentent des différences significatives entre les conditions expérimentales. Il existe une légère tendance à une moindre expression des ARNm de certains marqueurs microgliaux chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs (SNL, sham et naïfs : n=8, sauf pour certains gènes où il y a eu des problèmes expérimentaux).

Les analyses effectuées sur les tissus thalamiques prélevés dans le thalamus central à J28 ont mis en évidence la diminution significative de l'expression de l'ARNm de deux marqueurs microgliaux (Fig. 80 et Fig. 81). Ainsi, il existe une diminution significative de l'expression de l'ARNm de P2X1R de 35% chez les animaux SNL comparés aux animaux sham (Fig. 81, A1). Même si l'expression de l'ARNm de ce marqueur est moindre chez les animaux SNL comparés aux naïfs, cela n'atteint pas la significativité. De plus, dans ces tissus thalamiques centraux à J28, il existe une diminution significative de 18% de l'expression de l'ARNm codant pour le marqueur CXCL12 chez les animaux neuropathiques comparés aux animaux naïfs (Fig. 81, A2). Son expression chez les animaux sham se situe entre celle des animaux naïfs et celle des animaux SNL sans qu'il n'y ait de différence significative.

A1. P2X1R mRNA expression in central thalamic tissus

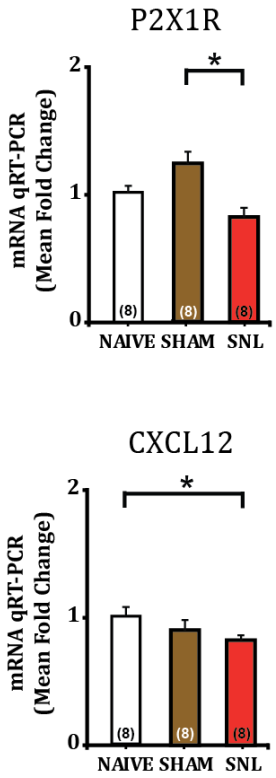


Figure 81 : Diminution significative dans tissus thalamiques centraux de l'expression de l'ARNm codant pour les marqueurs microgliaux P2X1R et CXCL12 chez les animaux SNL comparés aux animaux sham et naïfs respectivement à J28. Le graphique représente le facteur de variation ou fold change ($FC= 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ où $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(condition\ d'intérêt)} - \Delta Ct_{(condition\ de\ référence)}$. La condition de référence est ici la condition « animaux naïfs ».. L'expression de l'ARNm codant pour P2X1R est significativement plus faible chez les animaux SNL que chez les animaux sham (A1). De plus, il existe une diminution significative de l'expression de l'ARNm codant pour CXLC12 chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs (A2). L'expression de l'ARNm pour ce marqueur chez les animaux sham est intermédiaire entre celles des animaux naïfs et SNL. (SNL, sham et naïfs : n=8 ; *, p<0,05).

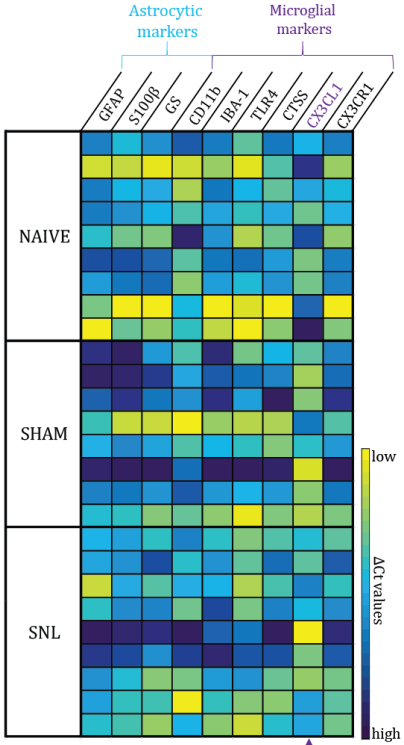
Ainsi, l'étude des ARNm des marqueurs astrocytaires et microgliaux sur les prélèvements de tissus thalamiques à J28 a permis de mettre en évidence un phénomène inattendu : la diminution de l'expression d'ARNm de marqueurs astrocytaires et microgliaux chez les animaux neuropathiques et bien souvent aussi chez les animaux sham comparés aux animaux naïfs. Le nombre de marqueurs dont l'expression est modifiée est plus important qu'à J14 aussi bien pour les tissus thalamiques latéraux que centraux.

B.2- qRT-PCR sur tissus thalamiques obtenus par microdissection laser

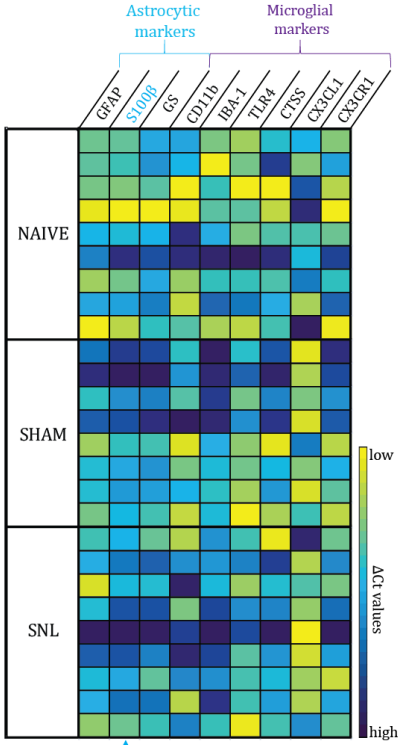
Cette approche a été réalisée avec les mêmes méthodes qu'à J14 et cette fois ci les résultats pour les 9 gènes de marqueurs astrocytaires et microgliaux ont pu être analysés.

L'étude de l'expression de ces marqueurs dans le noyau VPL controlatéral à J28 a révélé une augmentation significative de l'expression de l'ARNm codant pour la CX3CL1 de 31% chez les animaux neuropathiques comparés aux animaux naïfs (Fig. 82, A1 et A2). On remarque que l'expression de cet ARNm chez les animaux sham est intermédiaire (20% d'augmentation comparé aux animaux naïfs) mais n'est pas significativement différente de celle des animaux naïfs, ni de celle des animaux SNL. Le marqueur CX3CL1 est présent sur les membranes des neurones mais peut être clivé par la CTSS microgliale en condition de réactivité microgliale et agir, une fois clivé, sur la microglie qui exprime les récepteurs spécifiques CX3CR1 (Fig. 18). A J14, une augmentation de l'expression des marqueurs microgliaux CTSS et CX3CR1 a été mis en évidence. Or, ces marqueurs appartiennent tous à une boucle d'amplification des phénomènes de sensibilisation mise en évidence en conditions de douleurs neuropathiques dans la moelle épinière. L'étude de l'expression des marqueurs au sein du noyau VPL ipsilatéral à J28 a aussi révélé une diminution significative de l'expression de l'ARNm du marqueur astrocytaire S100β de 33% chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs (Fig. 82, B1 et B2). On remarque également que, bien que l'expression de cet ARNm chez les animaux sham soit très proche de celle observée chez les animaux SNL, il n'existe pas de différence significative entre sham et naïfs pour ce marqueur.

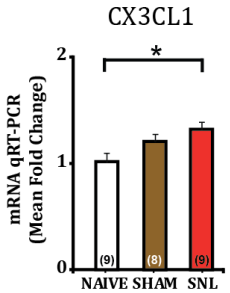
A1. Mosaic of mRNA expression in controlateral VPL nucleus



B1. Mosaic of mRNA expression in ipsilateral VPL nucleus



A2. CX3CL1 mRNA expression in controlateral VPL nucleus



B2. S100β mRNA expression in controlateral VPL nucleus

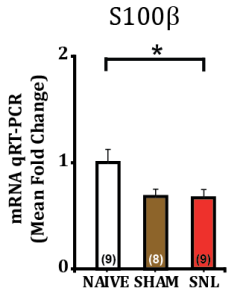


Figure 82 : Représentation mosaïque de l'expression de l'ARNm des 9 gènes testés sur les noyaux VPL contro- et ipsilatéral : des altérations de l'expression de l'ARNm des marqueurs CX3CL1 et S100β chez les animaux neuropathiques comparés aux animaux naïfs à J28. Les tableaux (A1 et B1) présentent le $\Delta Ct = Ct_{(gène\ testé)} - Ct_{(gènes\ de\ référence)}$ obtenu pour chaque gène et chaque animal. Plus le ΔCt est petit plus l'expression de l'ARNm est forte, plus il est grand plus l'expression de l'ARNm est faible. Le code couleur du jaune (forte expression de l'ARNm) au violet (faible expression de l'ARNm) permet une représentation visuelle de l'ensemble des résultats obtenus La flèche correspond au gène qui présente une différence significative entre les conditions expérimentales. Les graphiques (A2, B2) représentent le facteur de variation ou fold change ($FC = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ où $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(condition\ d'intérêt)} - \Delta Ct_{(condition\ de\ référence)}$. La condition de référence est ici la condition « animaux naïfs ». Les résultats obtenus dans le noyau VPL controlatéral montrent une augmentation significative de l'expression de l'ARNm codant pour la CX3CL1 chez les animaux neuropathiques comparés aux animaux naïfs (A1 et A2). De plus, on remarque que l'expression de l'ARNm de ce marqueur chez les animaux sham est intermédiaire entre celle obtenue chez les animaux naïfs et celle obtenue chez les animaux SNL. Dans le noyau VPL ipsilatéral il existe une diminution significative de l'expression de l'ARNm codant pour S100β chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs (B1 et B2). (SNL : n=9, sham : n= 8, naïfs : n=9 ; *, $p<0,05$).

L'analyse de qRT-PCR à J28 dans le VPM n'a révélé aucune tendance et aucune différence significative dans l'expression de l'ARNm des 9 gènes testés entre les trois conditions expérimentales quel que soit le côté contro- ou ipsilatéral étudié (Fig. 83, A et B).

Ainsi, dans cette étude à J28, l'approche par microdissection laser a révélé une augmentation de l'expression de la CX3CL1 dans le noyau VPL controlatéral, indice potentiel d'une réactivité microgliale thalamique. Cette augmentation à J28 fait suite à celle des ARNm codant pour la CTSS et CX3CR1, récepteur de la CX3CL1, qui a été observée à J14. Ces expériences de microdissection laser couplées aux analyses de qRT-PCR semblent mettre en évidence la présence d'une boucle d'amplification de la réactivité gliale dans le noyau VPL controlatéral en conditions de douleurs neuropathiques.

De plus, à J28 dans le VPL controlatéral, il existe une diminution de l'expression de l'ARNm du marqueur astrocytaire S100β chez les animaux neuropathiques comparés aux animaux naïfs.

Enfin, il n'existe pas de modifications de l'expression de l'ARNm de marqueurs astrocytaires et microgliaux dans les noyaux VPM à J28. L'effet décelé à J14 n'a donc pas été maintenu ou amplifié. Il s'agissait donc d'un effet transitoire et précoce.

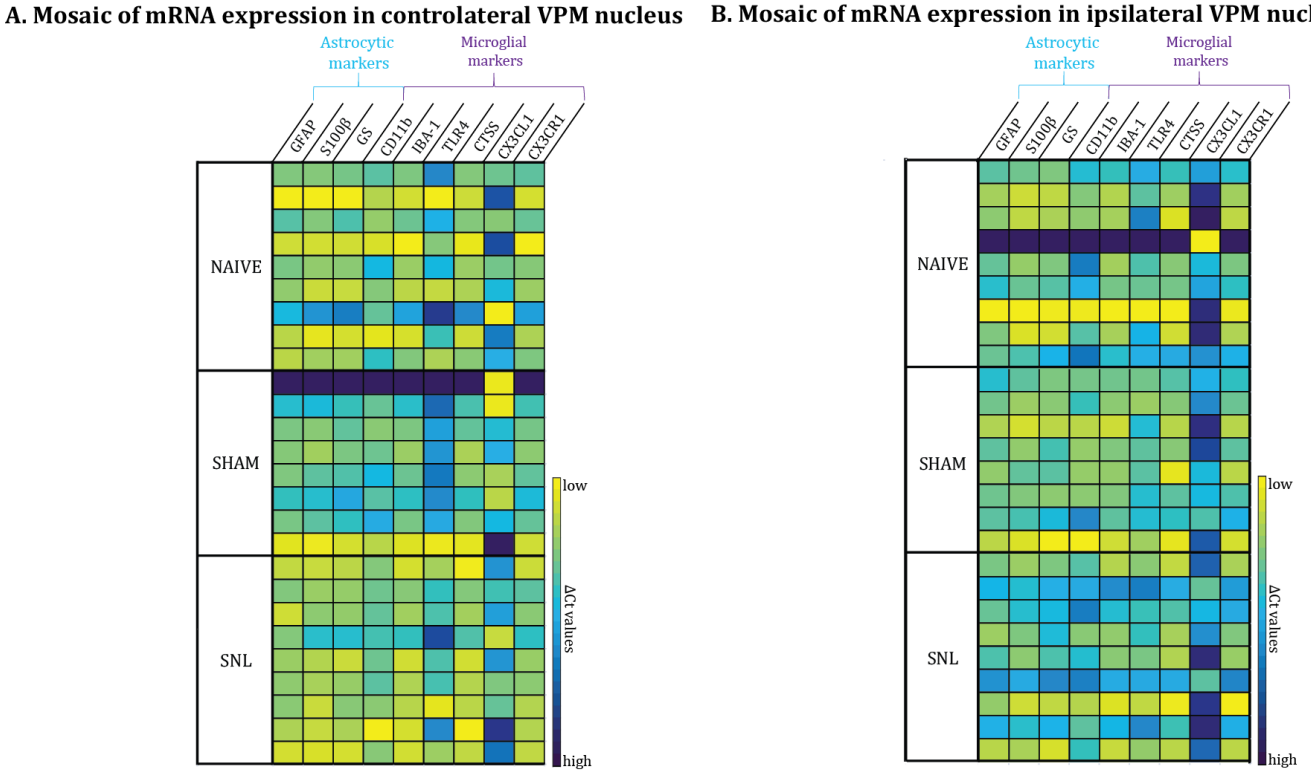


Figure 83 : Représentation mosaïque de l'expression de l'ARNm des 9 testés sur les noyaux VPM contro- et ipsilatéral : aucune différence significative entre les trois groupes expérimentaux à J28. Les tableaux représentent le $\Delta Ct = Ct_{(gène\ testé)} - Ct_{(gènes\ de\ référence)}$ obtenu pour chaque gène et chaque animal. Plus le ΔCt est petit plus l'expression de l'ARNm est forte, plus il est grand plus l'expression de l'ARNm est faible. Le code couleur du jaune (forte expression de l'ARNm) au violet (faible expression de l'ARNm) permet une représentation visuelle de l'ensemble des résultats obtenus Dans le noyau VPM controlatéral il n'existe aucune différence significative entre les trois conditions expérimentales (A). Dans le noyau VPM ipsilatéral il n'existe pas non plus de différence significative entre les trois groupes expérimentaux (B). (SNL, sham et naïfs : n=9; *, p<0,05).

Dans cette partie d'étude de l'expression de l'ARNm de marqueurs gliaux à J28, j'ai décelé des signes de réactivité microgliale thalamique chez les animaux neuropathiques, confirmant ceux trouvés dans l'étude à J14. Une réactivité microgliale thalamique à l'échelle génomique semble donc exister dans ce modèle animal de douleurs neuropathiques. Des signes de réactivité microgliale thalamique peuvent-ils être détectés au niveau protéique ? Nous allons voir que, contre toute attente, mon approche immunohistochimique n'a décelé aucun signe de réactivité microgliale mais par contre a mis en évidence des signes de réactivité astrocytaire.

C- Des signes de réactivité astrocytaire par approche immunohistochimique

J'ai étudié l'expression neurochimique des marqueurs microgliaux Iba-1, CD11b/c et CTSS ainsi qu'astrocytaires GFAP et S100β vingt-huit jours après la chirurgie au niveau du VPL et de sa sous-région, du VPM, du DM et des IL. J'ai réalisé les mêmes analyses quantitatives qu'à J14.

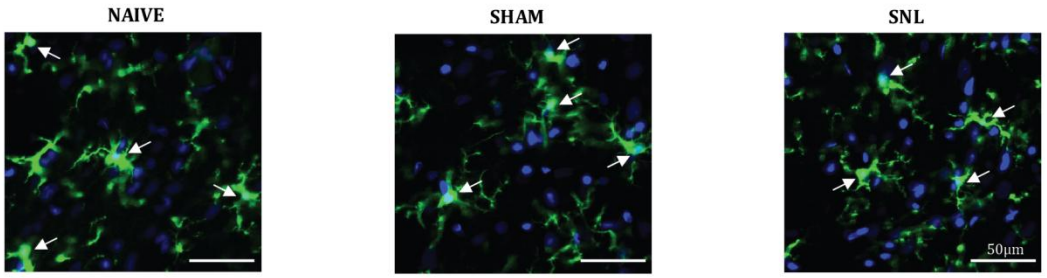
C.1- Les cellules microgliales : approche immunohistochimique

C.1.1- Surface occupée par les immunomarquages microgliaux et nombre de cellules immunopositives dans un plan focal

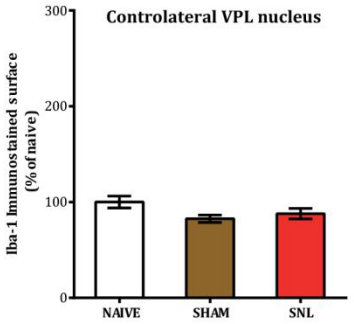
C.1.1.1 Immunomarquage de la protéine microgliale Iba-1

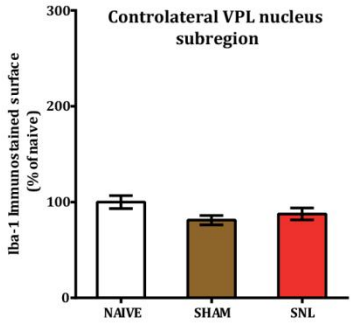
A J28, dans le VPL controlatéral aussi bien qu'ipsilatéral, les analyses de la surface occupée par l'immunomarquage iba-1 n'ont révélé aucune différence significative entre les trois groupes expérimentaux (Fig. 84, A1 et A2, B1 et B2). Il n'existe pas non plus de différence dans le nombre de cellules Iba-1 immunopositives dans la SSR controlatérale et ipsilatérale entre les trois conditions expérimentales (Fig. 84, A1 et A3, B1 et B3).

A1. Iba-1 immunostaining in controlateral VPL

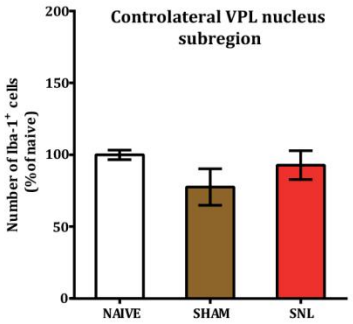


A2. Iba-1 immunostained surface

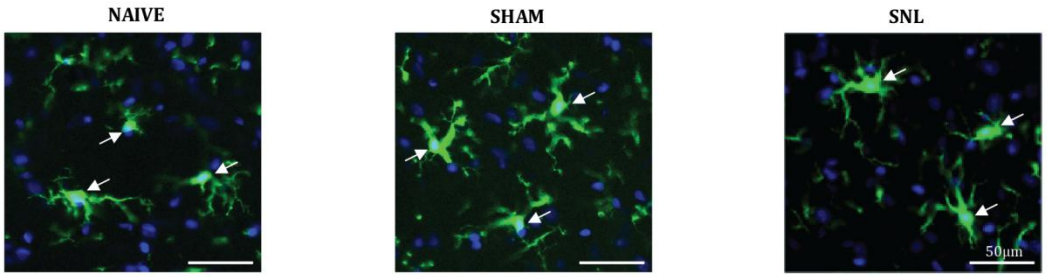




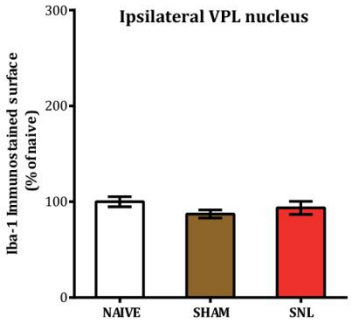
A3. Iba-1 immunopositive cell number

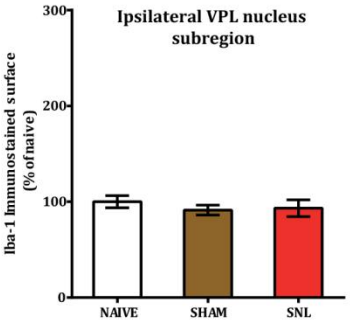


B1. Iba-1 immunostaining in ispilateral VPL



B2. Iba-1 immunostained surface





B3. Iba-1 immunopositive cell number

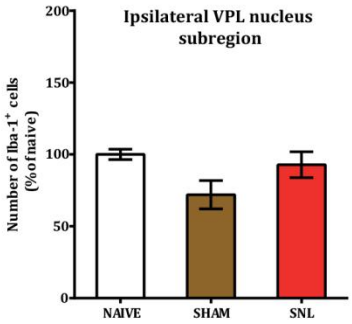


Figure 84 : Aucune différence entre les conditions expérimentales dans la surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 et le nombre de cellules Iba-1 immunopositives dans le VPL contro- et ipsilatéral à J28. Les flèches blanches pointent aux cellules qui ont été comptabilisées c'est à dire qui sont marquées pour iba-1 (vert) et pour le DAPI nucléaire (bleu) (A1 et B1). Une partie au moins du corps cellulaire apparait donc en turquoise. La surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 dans le noyau VPL et sa SSR du côté controlatéral ne présente aucune différence significative entre les trois groupes expérimentaux (A1, A2). Le nombre de cellules Iba-1 immunopositives dans la SSR controlatérale n'est pas non plus différent entre les trois groupes (A1, A3). La surface occupée du côté ipsilatéral par l'immunomarquage Iba-1 n'est lui non plus pas modifié entre les conditions expérimentales (B1, B2). De même, il n'existe aucune différence significative entre les groupes expérimentaux dans le nombre de cellules Iba-1 immunopositives dans la SSR ipsilatérale (SNL : n=5, sham : n=4, naïfs : n=5 ; *, $p<0,05$)

Ainsi, à J28 il n'existe aucun signe de modification de l'expression neurochimique de la protéine microgliale Iba-1 dans les noyaux VPL contro- et ipsilatéral.

De la même manière, les études à J28 de la surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 au sein du noyau VPM n'a décelé aucune différence significative entre les groupes expérimentaux que ce soit dans le noyau VPM controlatéral (Fig. 85, A1 et A2) ou le noyau VPM ipsilatéral (Fig. 85, B1 et B2).

Ainsi, il semble que les diminutions de la surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 à J14 aient été transitoires de même que les modifications du nombre de cellules Iba-1 immunopositives puisqu'aucune différence n'est retrouvée à J28 dans aucun des noyaux du thalamus latéral étudié.

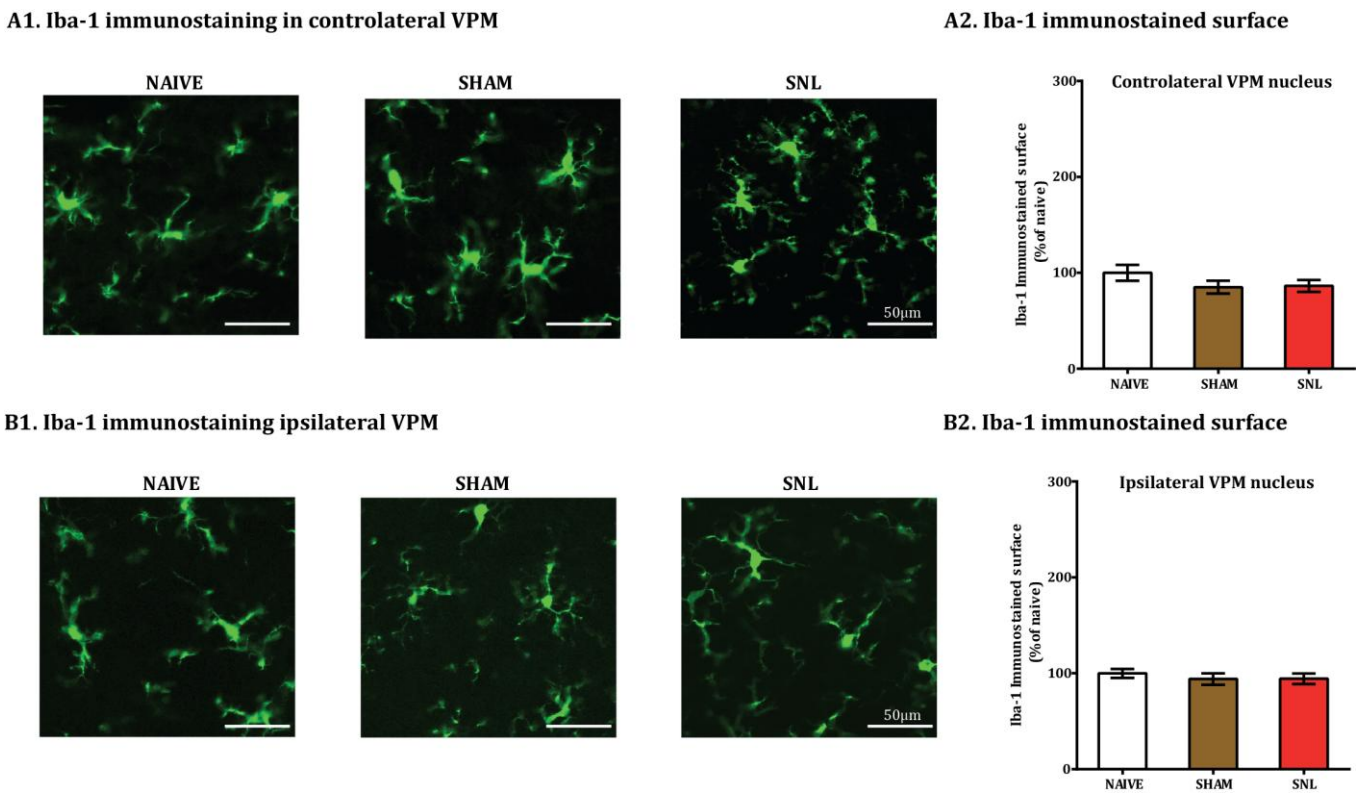


Figure 85 : Aucune différence entre les conditions expérimentales dans la surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 dans les noyaux VPM contro- et ipsilatéral à J28. L'immunomarquage Iba-1 apparait en vert (A1 et B1).. La surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 dans le noyau VPM controlatéral ne présente aucune différence significative entre les conditions expérimentales (A1 et A2). Il en est de même pour la surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 dans le VPM ipsilatéral où aucune différence entre les trois groupes expérimentaux n'a pu être mise en évidence (B1, B2). (SNL : n=5, sham : n=4, naïfs : n=5 ; *, $p<0,05$)

Dans le thalamus central à J28, les quantifications de la surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 n'ont décelé aucune différence significative entre les trois groupes expérimentaux ni dans les noyaux DM (Fig. 86, A1 et A2) ni dans les noyaux IL (Fig. 86, B1 et B2). Ainsi, comme à J14, il ne semble pas exister de modifications de l'expression neurochimique du marqueur microglial Iba-1 dans le thalamus central dans ce modèle de douleurs neuropathique SNL.

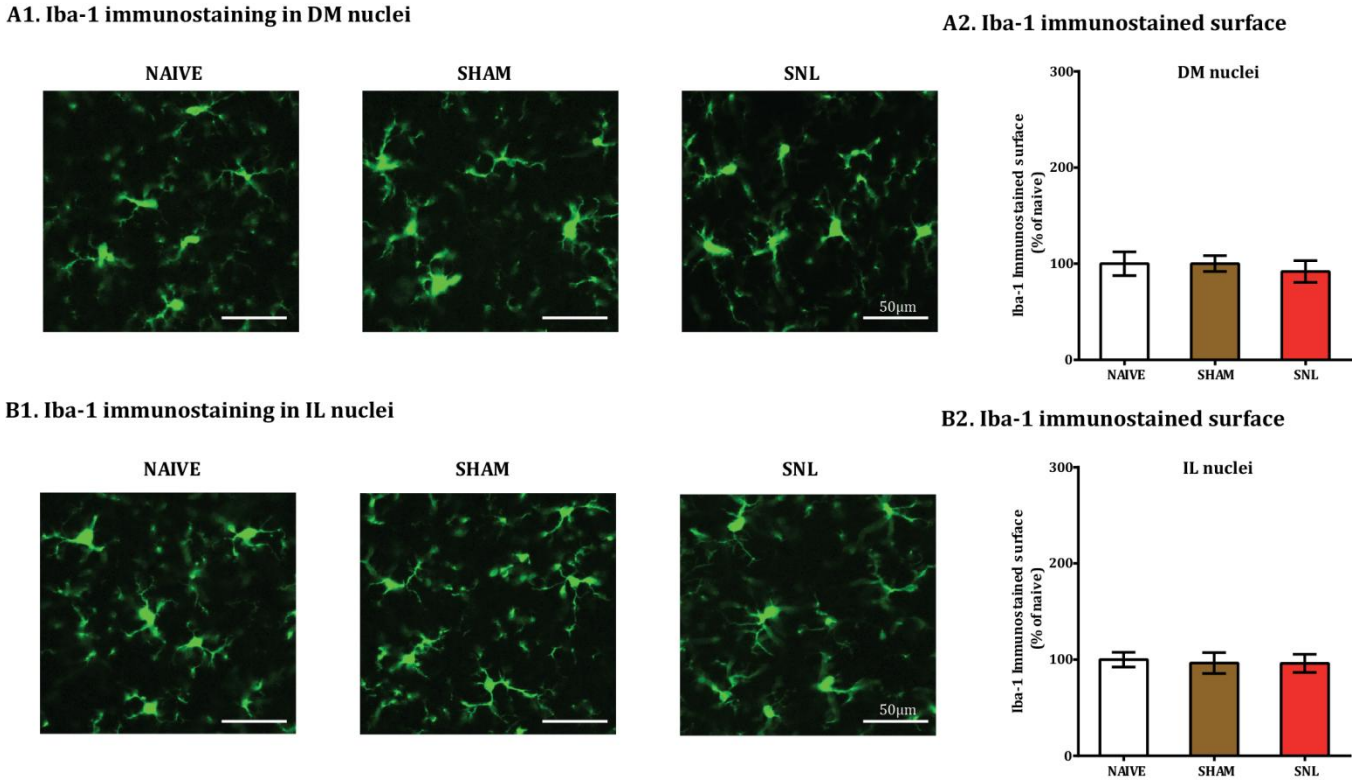
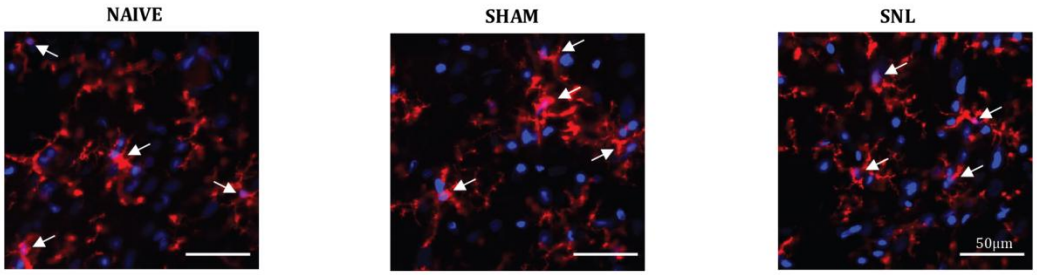


Figure 86 : Aucune différence dans la surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 dans les noyaux DM et IL entre les conditions expérimentales à J28. L'immunomarquage Iba-1 apparait en vert (A1 et B1). La surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 dans les noyaux DM ne présente aucune différence significative entre les conditions expérimentales (A1 et A2). La surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 dans les noyaux IL ne présente pas non plus de différence entre les groupes expérimentaux (B1 et B2). (SNL : n=5, sham : n=4, naïfs : n=5 ; *, $p<0,05$)

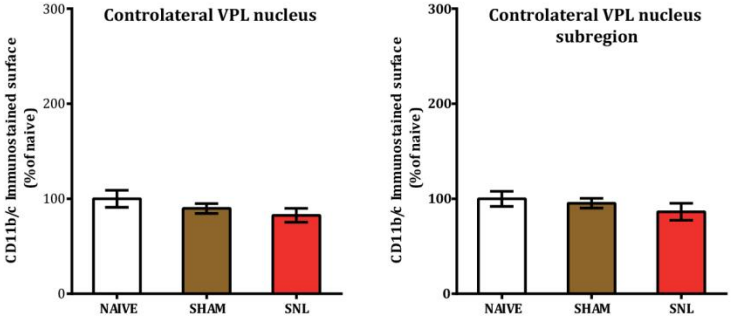
C.1.1.2 Immunomarquage de la protéine microgliale CD11b/c

Dans le noyau VPL controlatéral aussi bien qu'ipsilatéral à J28, les analyses de la surface occupée par l'immunomarquage n'ont mis en évidence aucune différence entre les trois groupes expérimentaux (Fig. 87, A1 et A2, B1 et B2). Elles n'ont pas non plus révélé de différence dans le nombre de cellules Iba-1 immunopositives dans la SSR controlatérale et ipsilatérale entre les trois conditions expérimentales (Fig. 87, A1 et A3, B1 et B3). Ainsi, la diminution du nombre de cellules CD11b/c immunopositives dans la SSR du noyau VPL controlatéral observée à J14 chez les animaux SNL n'est plus présente à J28, le phénomène était donc transitoire.

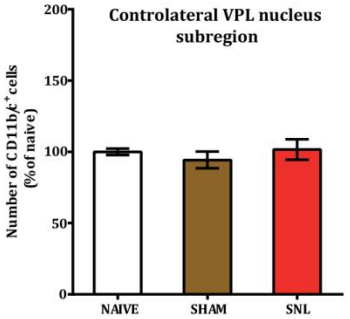
A1. CD11b/c immunostaining in controlateral VPL



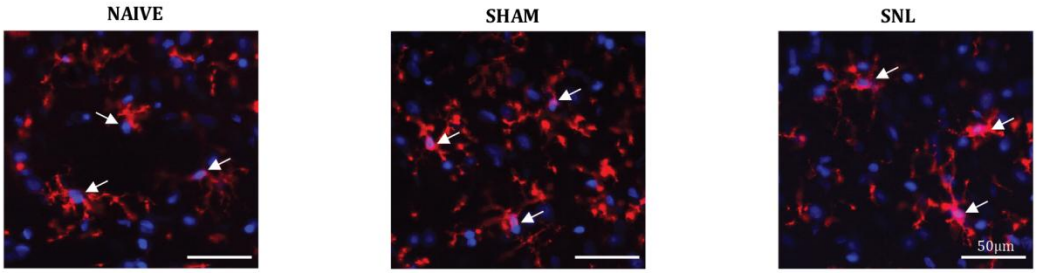
A2. CD11b/c immunostained surface



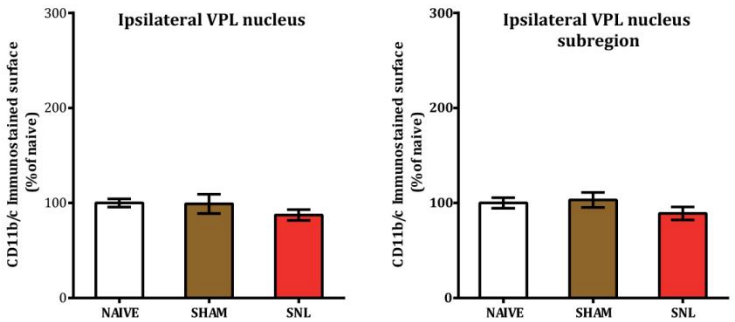
A3. CD11b/c immunopositive cell number



B1. CD11b/c immunostaining in ispilateral VPL



B2. CD11b/c immunostained surface



B3. CD11b/c immunopositive cell number

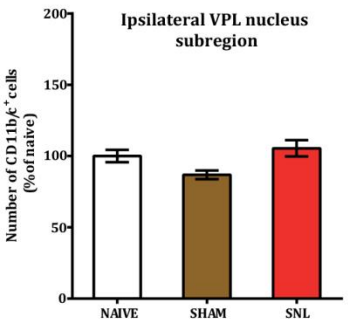


Figure 87 : Aucune différence significative entre les groupes expérimentaux dans la surface occupée par l'immunomarquage CD11b/c et le nombre de cellules CD11b/c immunopositives dans les noyaux VPL contro- et ipsilatéral à J28. Les flèches blanches pointent aux cellules qui ont été comptabilisées c'est à dire qui sont marquées pour CD11b/c (rouge) et pour le DAPI nucléaire (bleu) (A1 et B1). . La surface occupée par l'immunomarquage CD11b/c dans le noyau VPL et sa SSR du côté controlatéral ne présente aucun différence significative entre les groupes expérimentaux (A1 et A2). Dans la SSR controlatérale, le nombre de cellules CD11b/c immunopositives n'est pas non plus différent entre chacun des groupes expérimentaux (A1, A3). La surface occupée du côté ipsilatéral par l'immunomarquage CD11b/c dans le noyau VPL et sa SSR ne présente pas de différence significative entre les conditions expérimentales (B1, B2). Et il n'existe pas non plus de différence significative dans le nombre de cellules CD11b/c immunopositives au sein de la SSR ipsilatérale (B1 et B3). (SNL : n=5, sham : n=4, naïfs : n=5 ; *, $p<0,05$)

De même, la quantification de la surface occupée par l'immunomarquage CD11b/c au sein des noyaux VPM controlatéral et ipsilatéral n'a décelé aucune différence significative entre les trois groupes expérimentaux (Fig. 88, A1 et A2, B1 et B2). Ainsi, comme à J14, il ne semble pas exister de modifications de l'expression neurochimique du marqueur microglial CD11b/c dans le VPM dans ce modèle de douleurs neuropathiques SNL.

Les analyses de la surface occupée par le marqueur CD11b/c dans le thalamus central à J28 n'ont décelé aucune différence significative entre les trois groupes expérimentaux ni dans les noyaux DM (Fig. 89, A1 et A2) ni dans les noyaux IL (Fig. 89, B1 et B2). Ainsi, comme à J14, il ne semble pas exister de modifications de l'expression neurochimique du marqueur microglial CD11b/c dans le thalamus central dans ce modèle de douleurs neuropathiques SNL.

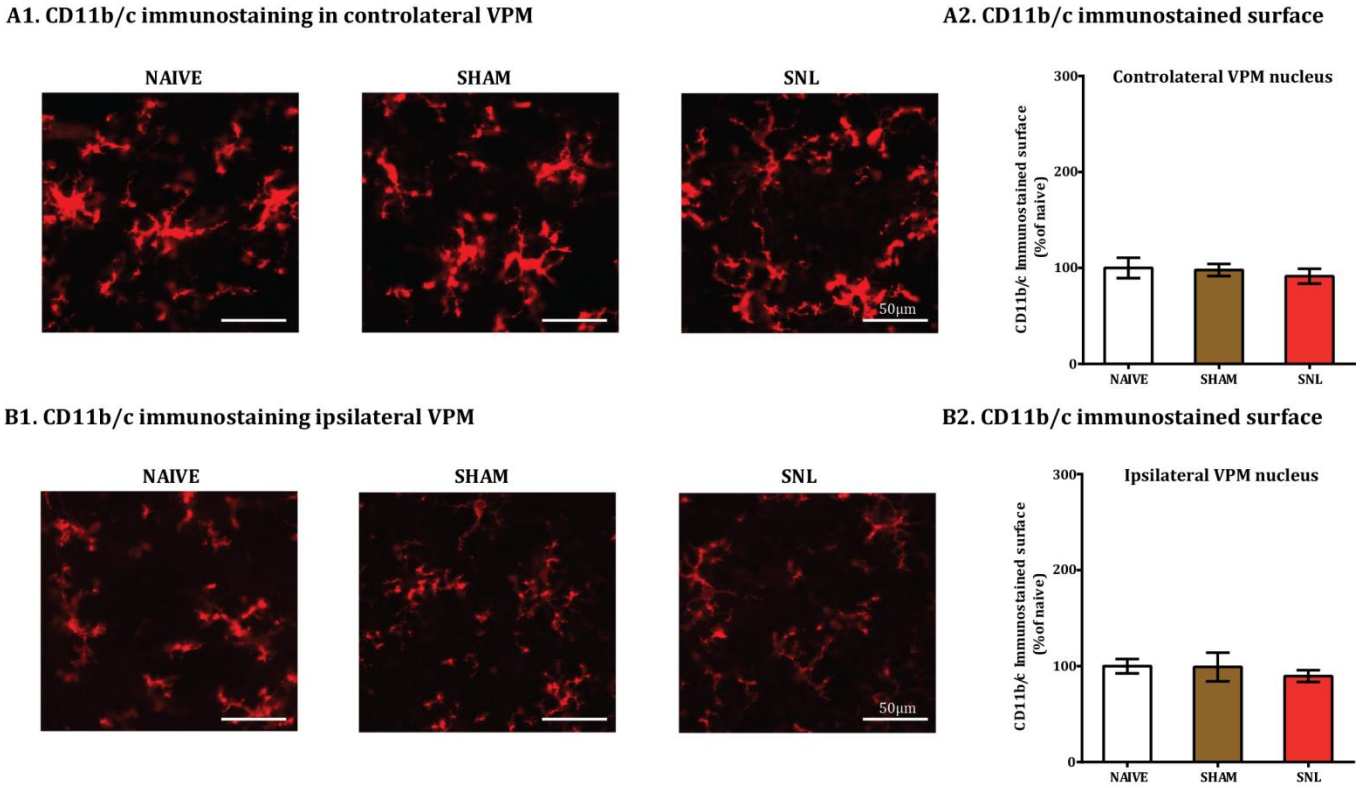


Figure 88 : Aucune différence entre les groupes expérimentaux dans la surface occupée par l'immunomarquage CD11b/c dans les noyaux VPM à J28. L'immunomarquage CD11b/c est visualisé en rouge (A1 et B1). La surface occupée par l'immunomarquage CD11b/c dans le noyau VPM controlatéral ne présente aucune différence significative entre les conditions expérimentales (A1 et A2). La surface occupée par l'immunomarquage CD11b/c dans le VPM ipsilatéral ne présente pas non plus de différence significative entre les trois groupes expérimentaux (B1, B2). (SNL : n=5, sham : n=4, naïfs : n=5 ; *, p<0,05)

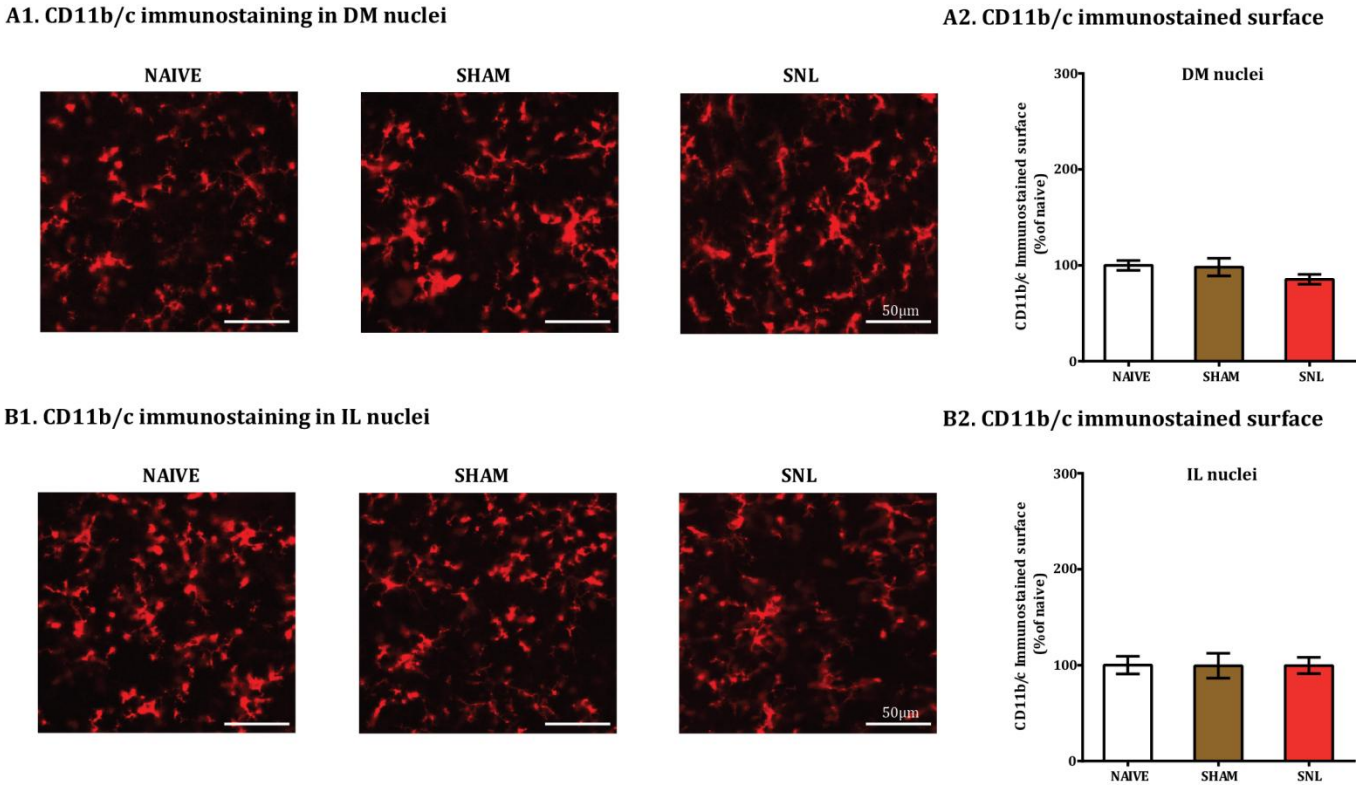
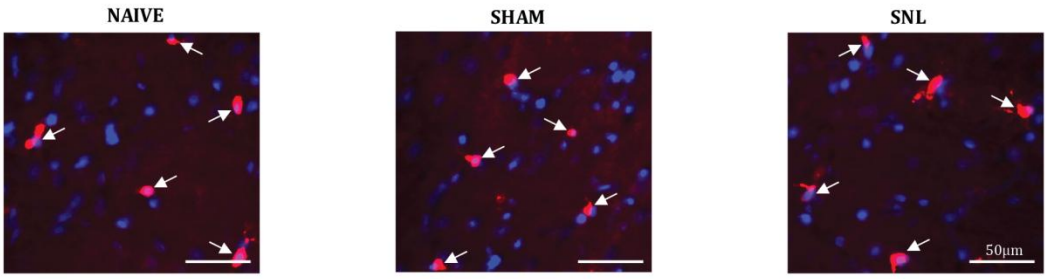


Figure 89 : Aucune différence significative entre les conditions dans la surface occupée par l'immunomarquage CD11b/c dans les noyaux DM et IL à J28. L'immunomarquage CD11b/c est visualisé en rouge (A1 et B1). La surface occupée par l'immunomarquage CD11b/c dans les noyaux DM ne présente aucune différence significative entre les conditions expérimentales (A1 et A2). La surface occupée par l'immunomarquage CD11b/c dans les noyaux IL ne présente pas non plus de différence entre les trois groupes expérimentaux (B1 et B2). (SNL : n=5, sham : n=4, naïfs : n=5 ; *, $p<0,05$)

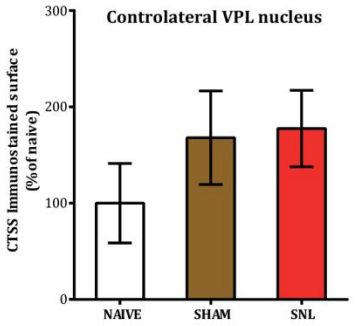
C.1.1.3 Immunomarquage de la protéine microgliale CTSS

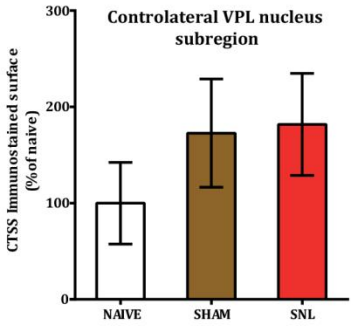
Dans le noyau VPL controlatéral et ipsilatéral, les analyses de la surface occupée par l'immunomarquage CTSS à J28 n'ont mis en évidence aucune différence significative entre les trois conditions expérimentales ni dans le noyau VPL en entier ni dans sa SSR (Fig. 90, A1 et A2 ; B1 et B2). Les analyses du nombre de cellules CTSS immunopositives n'ont pas non plus révélé de différence significative entre les groupes expérimentaux que ce soit dans la SSR controlatérale ou ipsilatérale (Fig. 90, A1 et A3, B1 et B3). On notera que, de la même manière qu'à J14, les barres d'erreur sont grandes, traduisant une grande variabilité entre les individus de chacun des trois groupes expérimentaux.

A1. CTSS immunostaining in controlateral VPL

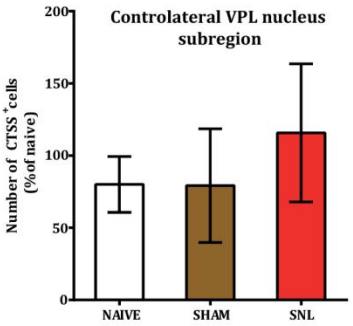


A2. CTSS immunostained surface

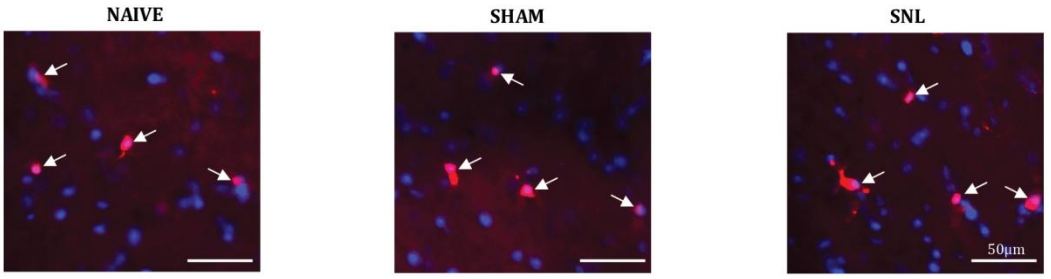




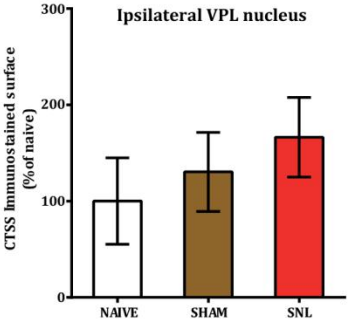
A3. CTSS immunopositive cell number

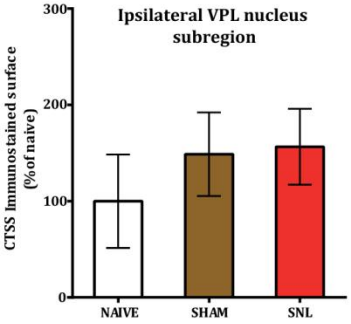


B1. CTSS immunostaining in ipsilateral VPL



B2. CTSS immunostained surface





B3. CTSS immunopositive cell number

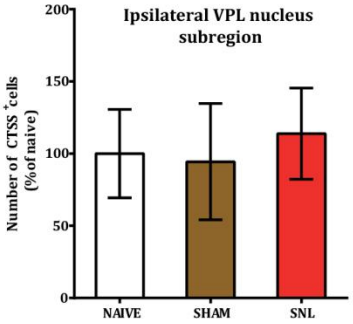


Figure 90 : Aucune différence entre les conditions expérimentales dans la surface occupée par l'immunomarquage CTSS et le nombre de cellules CTSS immunopositives dans les noyaux VPL contro- et ipsilatéral à J28. Les flèches blanches pointent les cellules comptabilisées : elles sont immunomarquées pour la CTSS (rouge) et pour le DAPI nucléaire (bleu). La surface occupée par l'immunomarquage CTSS dans le noyau VPL et sa SSR du côté controlatéral ne présente aucune différence significative entre les groupes expérimentaux (A1 et A2). Dans la SSR controlatérale, le nombre de cellules CTSS immunopositives ne révèle aucune différence non plus entre les trois groupes expérimentaux (A1, A3). La surface occupée du côté ipsilatéral par l'immunomarquage CTSS dans le noyau VPL et sa SSR ne présente pas de différence significative entre les conditions expérimentales (B1, B2). Il n'existe aucune différence dans le nombre de cellules CTSS immunopositives au sein de la SSR ipsilatérale (B1 et B3). (SNL : n=5, sham : n=4, naïfs : n=5 ; *, $p<0,05$)

Ainsi, aucune modification de l'expression neurochimique de la CTSS n'a été décelé dans les noyaux VPL contro- et ipsilatéral à J28, comme à J14. Les variabilités interindividuelles se sont révélées très importantes avec cet immunomarquage.

La quantification de la surface occupée par l'immunomarquage CTSS au sein des noyaux VPM controlatéral et ipsilatéral à J28 n'a décelé aucune différence significative entre les trois groupes expérimentaux (Fig. 91, A1 et A2, B1 et B2). Là encore, comme à J14, il existe une très forte variabilité interindividuelle dans la surface occupée par l'immunomarquage CTSS.

Ainsi, l'étude de l'expression neurochimique de la CTSS dans le thalamus latéral à J28 n'a révélé aucune modification significative entre les trois groupes expérimentaux. Il n'existe donc aucune différence dans la surface occupée par l'immunomarquage des marqueurs microgliaux ainsi que dans le nombre de cellules immunopositives pour ces marqueurs dans le thalamus latéral à J28. Même si j'ai déjà vérifié que ma méthode de quantification sur un seul plan focal permettait bien de détecter des variations du nombre de cellules microgliales, j'ai voulu m'assurer que l'absence de variations dans ce nombre n'était pas due au fait que je comptais dans un seul plan focal. J'ai donc appliqué une méthode de quantification stéréologique pour valider mes résultats.

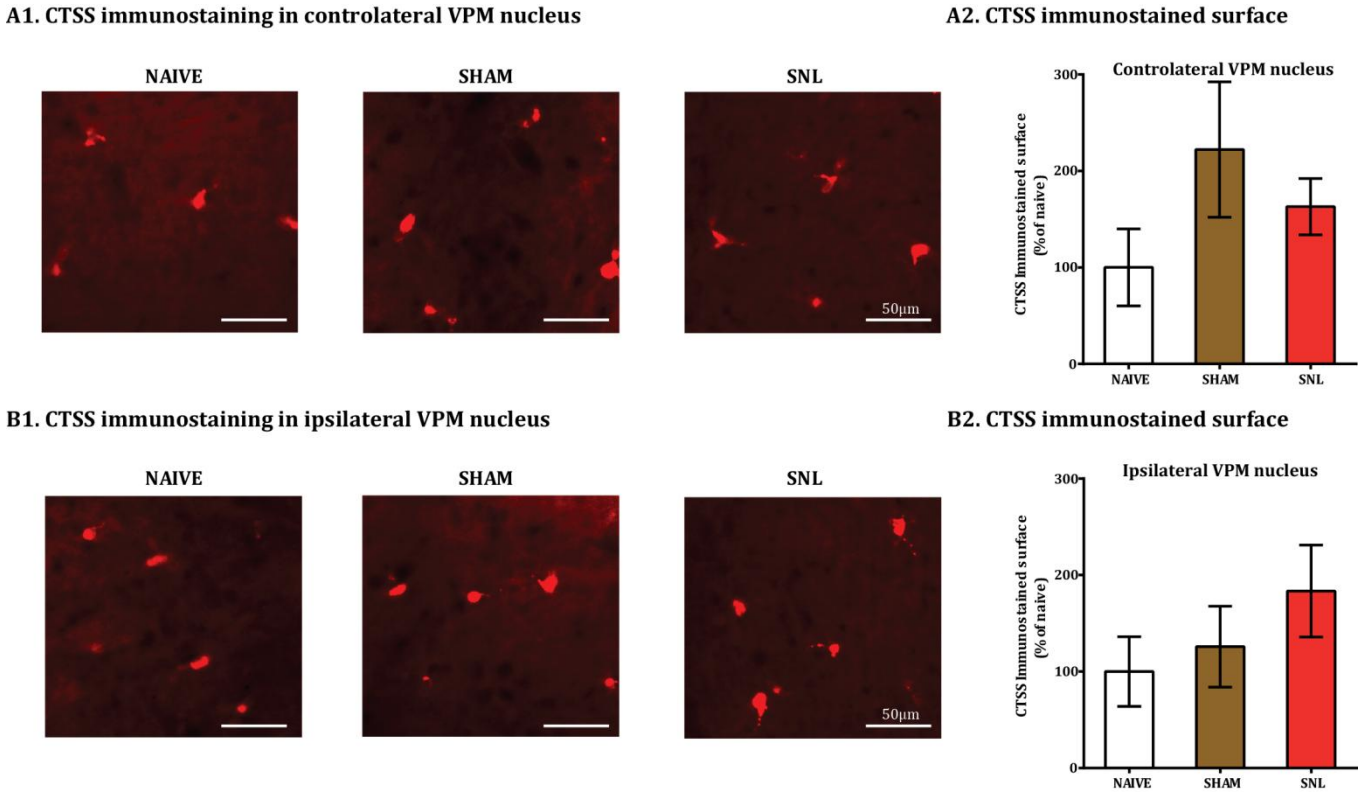


Figure 91 : Aucune différence entre les groupes expérimentaux dans la surface occupée par l'immunomarquage CTSS dans les noyaux VPM à J28. L'immunomarquage CTSS est visualisé en rouge (A1 et B1). La surface occupée par l'immunomarquage CTSS dans le noyau VPM controlatéral ne présente aucune différence significative entre les conditions expérimentales (A1 et A2). La surface occupée par l'immunomarquage CTSS dans le VPM ipsilatéral ne présente pas non plus de différence significative entre les trois groupes expérimentaux (B1, B2). (SNL : n=5, sham : n=4, naïfs : n=5 ; *, $p<0,05$)

C.1.2- Quantification stéréologique des cellules iba-1 positives

Comme à J14, j'ai utilisé la méthode du dissector optique pour comptabiliser les cellules iba-1 immunopositives dans l'ensemble du noyau VPL (ipsilatéral et controlatéral) sur des images acquises en Z (Matériels et Méthodes, parties VI. A2 et B2).

Dans le noyau VPL controlatéral aussi bien qu'ipsilatéral, la quantification stéréologique des cellules Iba-1 immunopositives a confirmé le résultat obtenu par le comptage dans un seul plan focal : le nombre de cellules Iba-1 immunopositives ne présente aucune différence entre chacune des trois conditions expérimentales à J28 (Fig. 92, A1 et A2, B1 et B2). Ainsi, là encore, les résultats obtenus par l'approche de comptage non stéréologique dans un seul plan focal ont été retrouvés pour le marqueur microglial Iba-1 grâce à cette méthode plus rigoureuse de quantification.

En conclusion, le résultat majeur de cette partie sur les marqueurs microgliaux est l'absence de modification de l'expression neurochimique des marqueurs Iba-1, CD11b/c et CTSS à J28 dans nos conditions expérimentales.

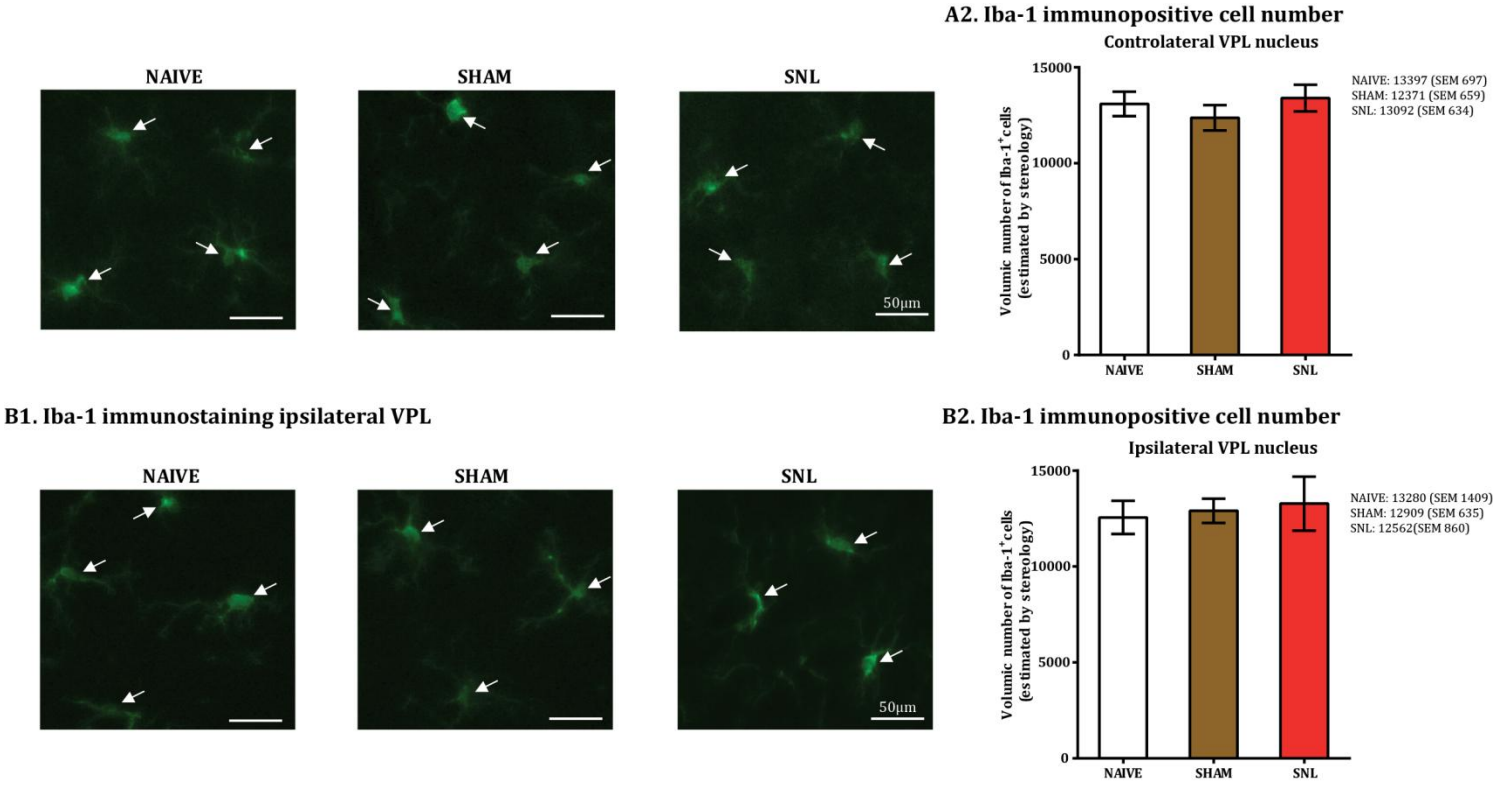


Figure 92 : Aucune différence entre les trois conditions dans le nombre de cellules Iba-1 immunopositives au sein des noyaux VPL par quantification stéréologique sur les images acquises en Z à J28. Les flèches blanches pointent aux cellules qui ont été comptabilisées, elles présentent un immunomarquage iba-1 qui est visualisé en vert (A1 et B1). Les images en A1 et B1 sont des projections en Z de chaque série d'images. On notera que l'on illustre un fort grossissement alors que les cellules ont été comptées sur l'ensemble du VPL. Le nombre de cellules Iba-1 immunopositives ne présente aucune différence statistique entre chacune des trois conditions expérimentales dans le VPL controlatéral (A1 et A2). Le nombre de cellules Iba-1 immunopositives ne révèle pas non plus de différence significative entre les trois conditions expérimentales dans le VPL ipsilatéral (B1, B2). (SNL : n=5, et sham : n=4, naïfs : n=5 ; *, $p<0,05$)

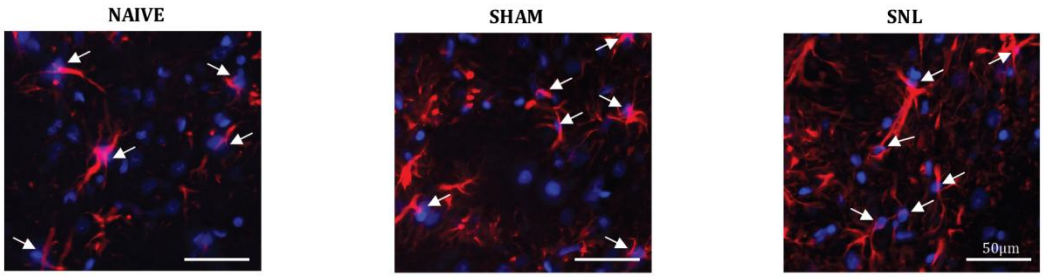
C.2- Les cellules astrocytaires : surface immunomarquée et nombre de cellules immunopositives

C.2.1- Immunomarquage de la protéine astrocytaire GFAP

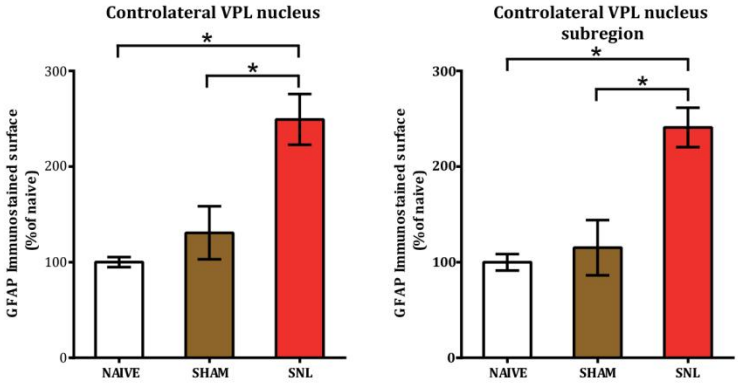
Dans le noyau VPL controlatéral, les analyses de la surface occupée par l'immunomarquage GFAP à J28 ont révélé une augmentation significative de cette surface (environ 2 à 2,5 fois plus) dans le noyau VPL et sa SSR chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs et sham (Fig. 93, A1 et A2). Par contre, le nombre de cellules GFAP immunopositives n'est pas différent entre les trois conditions (Fig. 93, A1 et A3).

Dans le noyau VPL ipsilatéral à J28 les analyses de la surface occupée par l'immunomarquage GFAP ont également mis en évidence une augmentation significative de cette surface (environ 2 fois plus) dans le noyau VPL entier des animaux SNL (Fig. 93, B1 et B2). On notera qu'il existe une tendance à l'augmentation de la surface occupée par le marqueur GFAP dans la SSR ipsilatérale des animaux SNL comparés aux animaux naïfs et sham. La quantification des cellules GFAP immunopositives dans cette SSR ipsilatérale n'a mis à jour aucune différence significative entre les groupes expérimentaux (Fig. 93, B1 et B3).

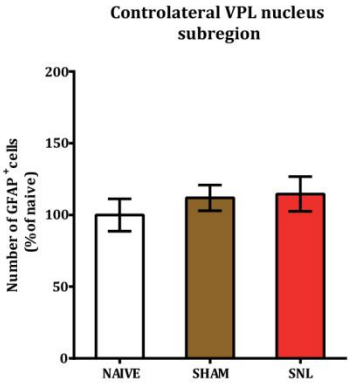
A1. GFAP immunostaining in controlateral VPL



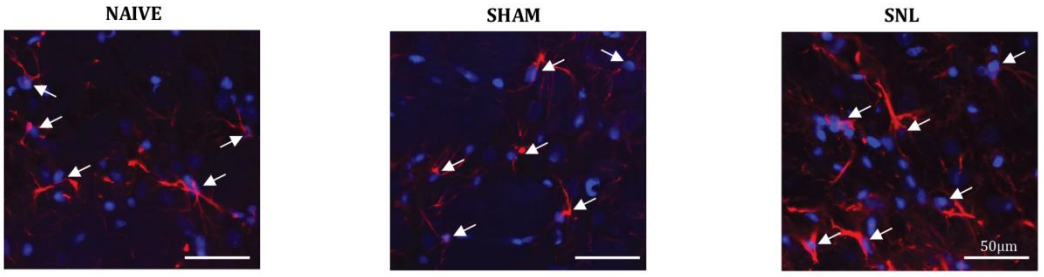
A2. GFAP immunostained surface



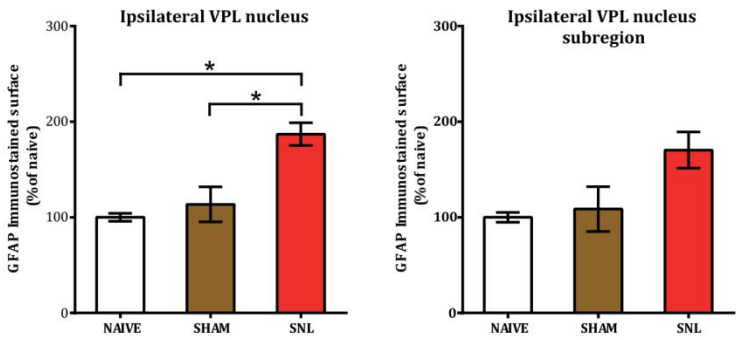
A3. GFAP immunopositive cell number



B1. GFAP immunostaining in ipsilateral VPL



B2. GFAP immunostained surface



B3. GFAP immunopositive cell number

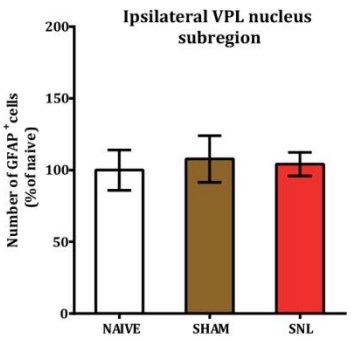


Figure 93 : Augmentation de la surface occupée par l'immunomarquage GFAP dans les VPL des animaux neuropathiques comparés aux animaux naïfs et sham à J28. Les flèches blanches pointent aux cellules qui ont été comptabilisées : elles présentent un immunomarquage GFAP au niveau d'au moins deux prolongements épais (rouge) et à proximité immédiate d'un noyau cellulaire (marqueur DAPI en bleu) (A1 et B1). La surface occupée par l'immunomarquage GFAP dans le noyau VPL et sa SSR du côté controlatéral est significativement plus élevée chez les animaux SNL que chez les animaux naïfs et sham (A1, A2). En revanche, au sein de la SSR controlatérale, le nombre de cellules GFAP immunopositives n'est pas modifié entre les trois conditions expérimentales (A1, A3). La surface occupée du côté ipsilatéral par l'immunomarquage GFAP dans le noyau VPL est également significativement plus élevée que celle occupée par la GFAP chez les animaux naïfs et sham (B1, B2). Dans la SSR ipsilatérale, il n'existe pas de différence significative de la surface occupée par le marqueur GFAP malgré une tendance à l'augmentation de la surface occupée par la GFAP chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs et sham. Le nombre de cellules GFAP immunopositives dans cette SSR ipsilatérale n'est pas non plus différent entre les trois conditions expérimentales (B1 et B3). (SNL et sham : n=6, naïfs : n=4 ; *, $p<0,05$)

Ainsi, il existe une augmentation significative de la surface occupée par le marqueur astrocytaire GFAP dans les noyaux VPL aussi bien controlatéral qu'ipsilatéral chez les animaux SNL à J28. En l'absence d'augmentation du nombre de cellules GFAP immunopositives, cela semble impliquer une modification morphologique des astrocytes GFAP positifs. Ainsi, ce résultat suggère la présence d'une réactivité astrocytaire dans le noyau VPL à J28 chez les animaux SNL. La diminution du nombre de cellules GFAP immunopositives à J14 n'est plus présente à J28, suggérant que ce phénomène était un phénomène précoce et transitoire.

A J28 dans les noyaux VPM contro- et ipsilatéral, l'analyse de la surface occupée par le marquage GFAP a révélé une augmentation significative de cette surface chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs (Fig. 94, A1 et A2, B1 et B2). On notera que cette surface est aussi significativement plus importante chez les animaux SNL que chez les animaux sham (Fig. 94, A1 et A2).

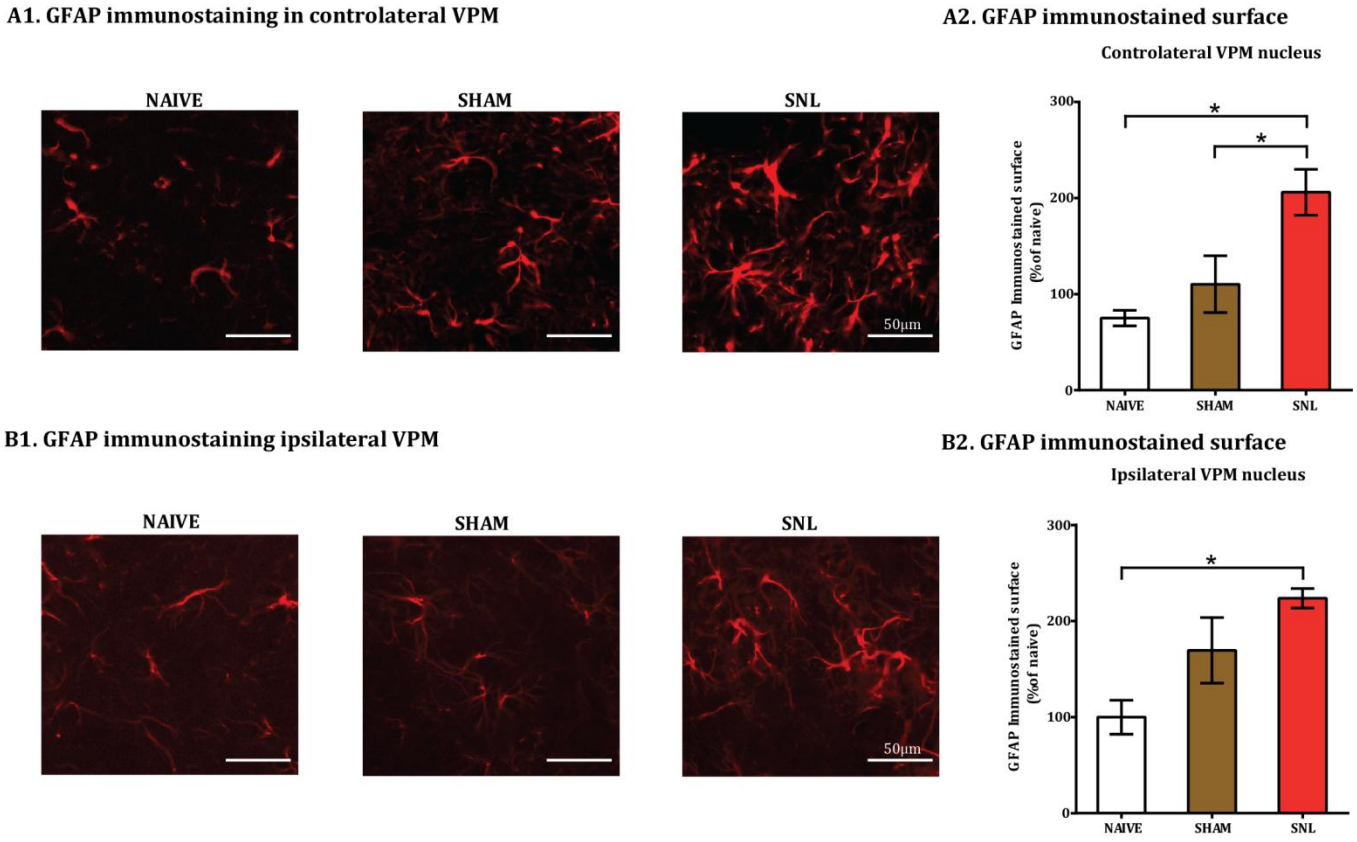


Figure 94 : Augmentation de la surface occupée par l'immunomarquage GFAP dans les noyaux VPM chez les animaux neuropathiques comparés aux animaux naïfs à J28. L'immunomarquage GFAP est visualisé (A1 et B1). La surface occupée par l'immunomarquage GFAP dans le noyau VPM controlatéral est significativement plus importante chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs et sham (A1 et A2). La surface occupée par l'immunomarquage GFAP dans le VPM ipsilatéral augmente également chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs (B1, B2). (SNL et sham : n=6, naïfs : n=4 ; *, p<0,05)

Ainsi, l'étude de l'expression neurochimique du marqueur astrocytaire GFAP dans le thalamus latéral à J28 a révélé des signes de réactivité astrocytaire : une augmentation de la surface occupée par le marqueur GFAP sans modification du nombre de cellules astrocytaires GFAP positives. Ceci laisse suggérer un épaississement des prolongements astrocytaires ou une augmentation de leur nombre. Ce phénomène est présent à la fois dans le noyau VPL controlatéral recevant les principales afférences de la patte douloureuse mais également dans le VPL ipsilatéral recevant moins de projections de la patte arrière postérieure. De plus, ce phénomène survient dans les noyaux VPM adjacents aux noyaux VPL et ne recevant théoriquement aucune afférence de la patte douloureuse.

A J28, l'étude de la surface occupée par le marquage GFAP dans le thalamus central a révélé une augmentation significative de cette surface chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs dans les noyaux DM (plus de 3 fois plus; Fig. 95, A1 et A2) et IL (près de 2 fois plus; Fig. 95, B1 et B2). Dans chacun des noyaux centraux, la surface occupée par l'immunomarquage GFAP chez les sham est intermédiaire entre celle des animaux naïfs et des animaux SNL, ces différences n'atteignant pas la significativité.

En conclusion, les études de l'expression neurochimique du marqueur GFAP réalisées à J28 sur les noyaux VPL, VPM, DM et IL ont révélé des signes de réactivité astrocytaire dans chacun de ces noyaux chez les animaux neuropathiques. Les signes de réactivité astrocytaire à J28 semblent donc être généralisés au sein du thalamus qui intègre les informations nociceptives.

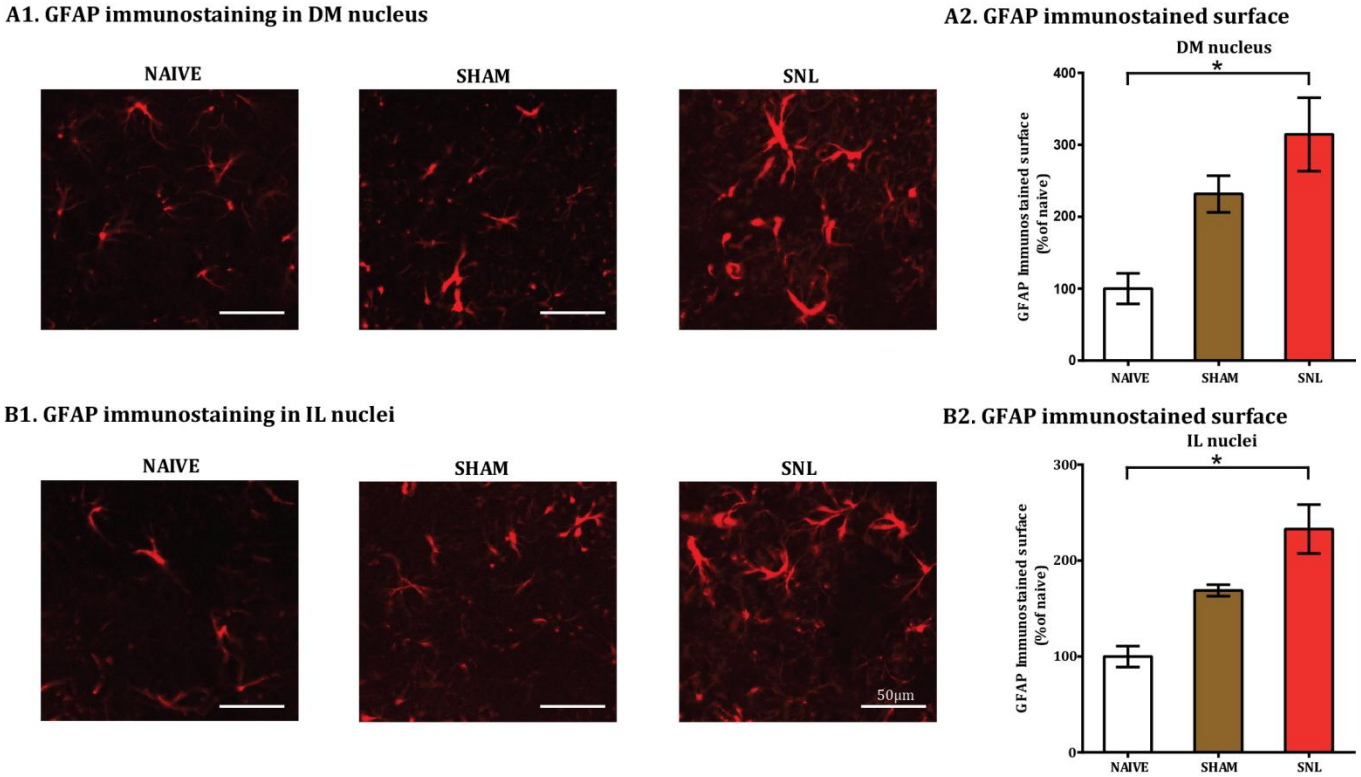


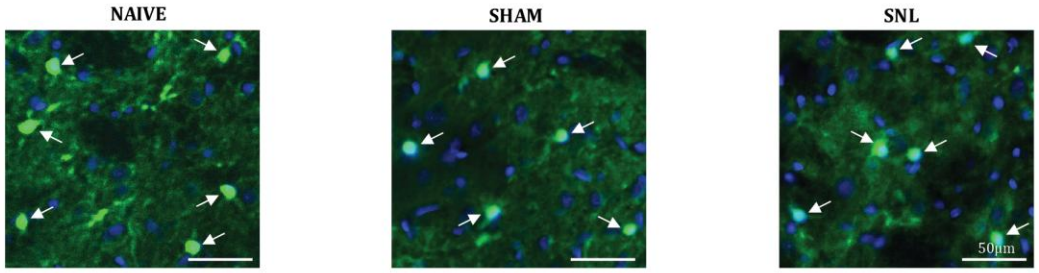
Figure 95 : Augmentation de la surface occupée par le marquage GFAP dans les noyaux DM et IL chez les animaux neuropathiques comparés aux animaux naïfs à J28. L'immunomarquage GFAP est visualisé en rouge (A1 et B1). La surface occupée par l'immunomarquage GFAP dans les noyaux DM est significativement plus élevée chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs (A1 et A2). Les animaux sham sont en position intermédiaire entre les animaux naïfs et SNL. La surface occupée par l'immunomarquage GFAP dans les noyaux IL est également significativement plus importante chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs (B1 et B2). La position intermédiaire des animaux sham est encore une fois à relever. (SNL et sham: n=6, naïfs : n=4 ; *, $p<0,05$)

C.2.2- Immunomarquage de la protéine astrocytaire S100β

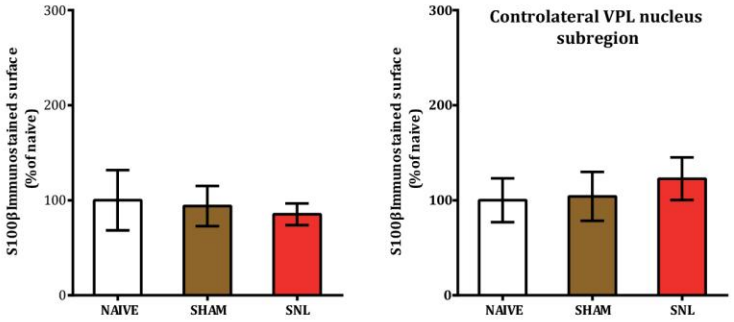
Dans le noyau VPL controlatéral et ipsilatéral à J28, les analyses de la surface occupée par l'immunomarquage S100β n'ont révélé aucune différence entre les trois groupes expérimentaux (Fig. 96, A1 et A2, B1 et B2). De même, la quantification du nombre de cellules S100β immunopositives dans la SSR controlatérale et ipsilatérale du noyau VPL ne révèle aucune différence entre les trois conditions expérimentales (Fig. 96, A1 et A3, B1 et B3).

Ainsi, l'augmentation de la surface occupée par le marqueur S100β et la diminution du nombre de cellules S100β immunopositives trouvés chez les animaux neuropathiques à J14 ne sont pas retrouvés à J28. Ces phénomènes étaient donc transitoires.

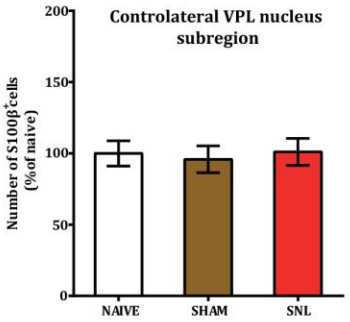
A1. S100β immunostaining in controlateral VPL



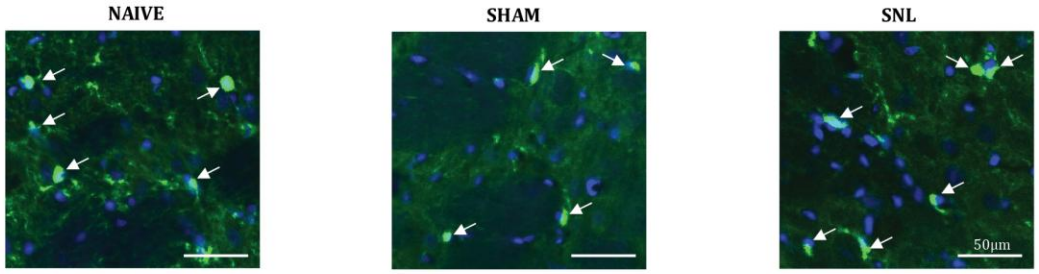
A2. S100β immunostained surface



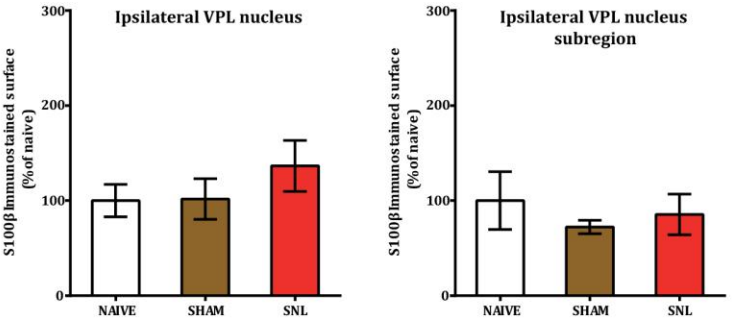
A3. S100β immunopositive cell number



B1. S100β immunostaining in ipsilateral VPL



B2. S100β immunostained surface



B3. S100β immunopositive cell number

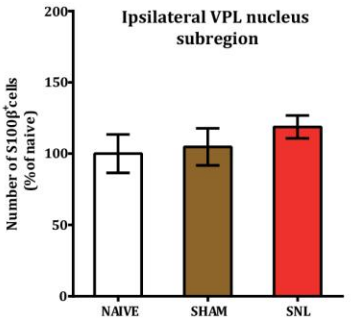


Figure 96 : Aucune différence entre les groupes expérimentaux dans la surface occupée par l'immunomarquage S100β et le nombre de cellules S100β immunopositives dans les VPL à J28. L'immunomarquage S100β est visualisé en vert et le marquage nucléaire DAPI apparait en bleu (A1 et B1). Les flèches blanches pointent aux cellules comptabilisées : elles présentent un immunomarquage S100β (vert) au niveau du corps cellulaire (marquage nucléaire bleu) ce qui se traduit par une couleur turquoise (A1, B1). La surface occupée par l'immunomarquage S100β dans le noyau VPL controlatéral et sa SSR ne présente pas de différence significative entre les conditions expérimentales (A1, A2). De même, au sein de la SSR controlatérale, le nombre de cellules S100β immunopostives ne présente aucune différence significative entre les trois groupes expérimentaux (A1, A3). La surface occupée par l'immunomarquage S100β dans le noyau VPL ipsilatéral et sa SSR ne présente pas de différence significative entre les conditions expérimentales (B1, B2). Le nombre de cellules S100β immunopositives n'est pas non plus différent dans la SSR ipsilatérale entre les trois groupes expérimentaux. (B1, B3). (SNL et sham n=6, naïfs : n=4 ; *, $p<0,05$)

La quantification de la surface occupée par l'immunomarquage S100β au sein des noyaux VPM contro- et ipsilatéral à J28 n'a décelé aucune différence significative entre les trois conditions (Fig. 97, A1 et A2, B1 et B2).

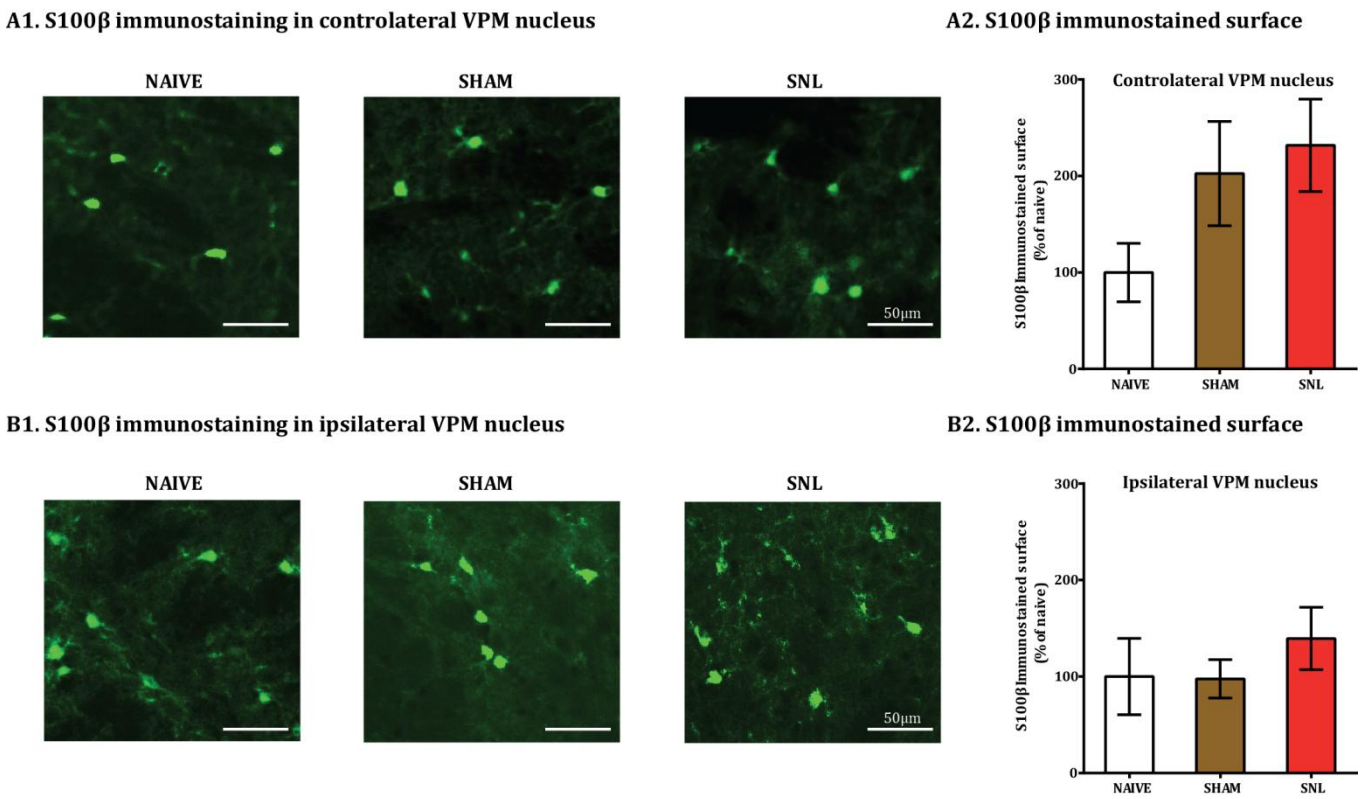


Figure 97 : Aucune différence entre les conditions expérimentales dans la surface occupée par l'immunomarquage S100β au sein des noyaux VPM à J28. L'immunomarquage S100β est visualisé en vert (A1 et B1). La surface occupée par l'immunomarquage S100β dans le noyau VPM controlatéral ne présente aucune différence significative entre les conditions expérimentales (A1 et A2). La surface occupée par l'immunomarquage S100β dans le VPM ipsilatéral ne présente pas de différence significative entre les conditions expérimentales (B1, B2). (SNL et sham: n=6, naïfs : n=4 ; *, p<0,05)

Ainsi, l'étude de l'expression neurochimique du marqueur astrocytaire S100β dans les noyaux du thalamus latéral à J28 n'a mis en évidence aucune modification entre les trois conditions expérimentales.

Dans le thalamus central à J28, et comme à J14, la quantification de la surface occupée par l'immunomarquage S100β n'a pas non plus décelé de différence significative entre les trois groupes expérimentaux ni dans les noyaux DM (Fig. 98, A1 et A2) ni IL (Fig. 98, B1 et B2).

Ainsi, il n'existe pas de modifications de l'expression neurochimique du marqueur astrocytaire S100β dans le thalamus latéral et central dans le modèle de douleurs neuropathique SNL à J28.

Les résultats obtenus en termes de surface occupée par l'immunomarquage GFAP et S100β dans le thalamus latéral sont donc différents. Seul le marqueur GFAP révèle des signes de réactivité astrocytaire thalamique à J28 chez les animaux SNL.

La figure 99 vous résume les différences significatives qui ont été mises en évidence dans le noyau VPL controlatéral entre animaux naïfs et SNL aussi bien à J14 qu'à J28.

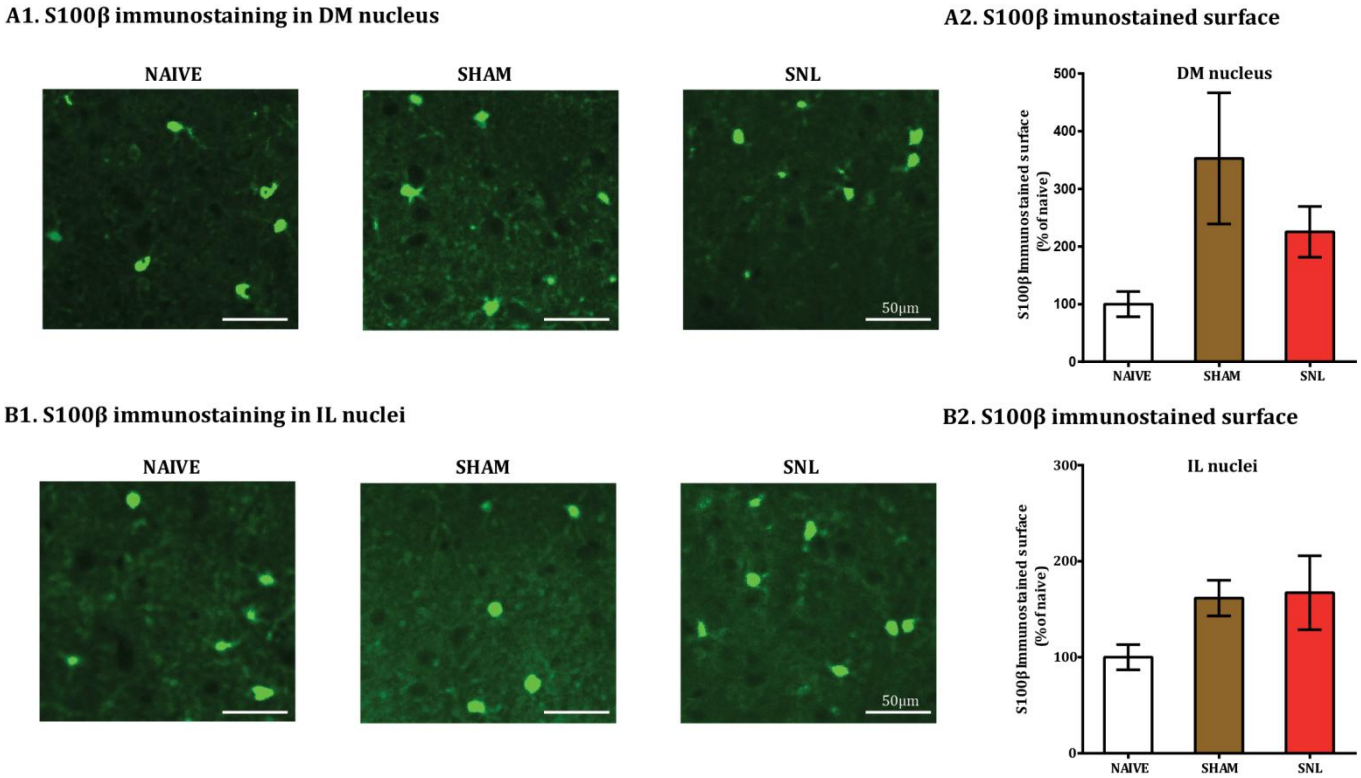


Figure 98 : Aucune différence entre les conditions expérimentales dans la surface occupée par le marquage S100β dans les noyaux DM et IL à J28. L''immunomarquage S100β est visualisé en vert (A1 et B1). La surface occupée par l'immunomarquage S100β dans les noyaux DM ne présente aucune différence significative entre les trois conditions expérimentales (A1 et A2). La surface occupée par l'immunomarquage S100β dans les noyaux IL ne présente pas de différence entre les trois groupes expérimentaux (B1 et B2). (SNL et sham : n=6, naïfs : n=4 ; *, p<0,05)

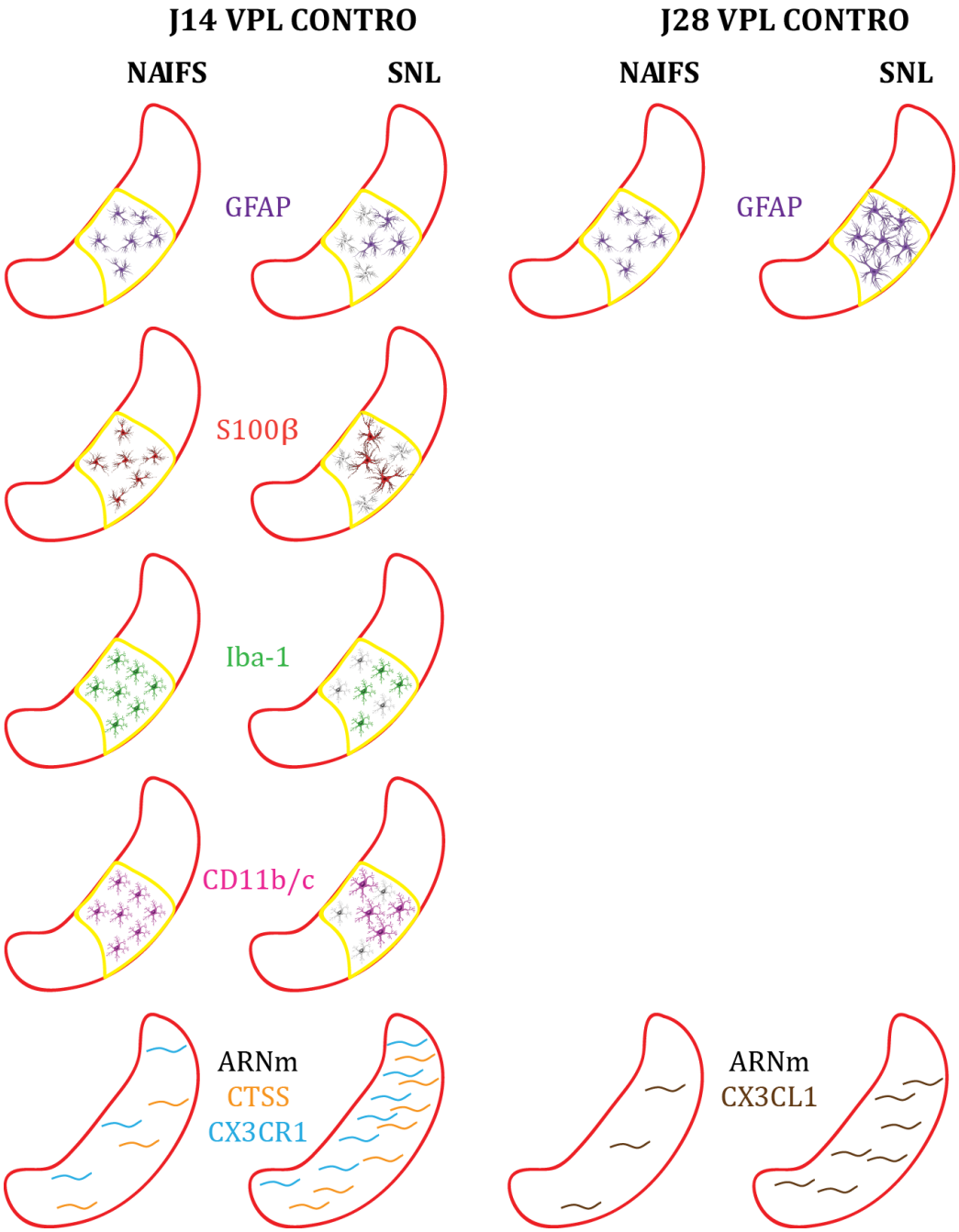


Figure 99 : Représentation schématique des différences significatives mises en évidence dans cette étude chez les animaux SNL à J14 et J28 dans le noyau VPL controlatéral comparés aux animaux naïfs. A J14, dans le noyau VPL controlatéral, il existe une diminution significative du nombre de cellules GFAP (en violet) et S100β (en rouge) immunopositives ainsi qu'une augmentation de la surface occupée par le marqueur S100β chez les animaux SNL. Le nombre de cellules microgliales Iba-1 (en vert) et CD11b/c (en rose) immunopositives diminue également à J14 chez les animaux SNL sans qu'il existe de modification de la surface occupée par ces deux marqueurs microgliaux. A J28, dans le noyau VPL controlatéral il existe une augmentation de la surface occupée par le marqueur GFAP sans modification du nombre de cellules GFAP immunopositives. En bas, à J14, il existe une augmentation de l'expression des ARNm de la CTSS (en orange) et CX3CR1 (en bleu) chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs. A J28, il existe une augmentation de l'expression de l'ARNm de CX3CL1 (en marron) dans le noyau VPL controlatéral des animaux SNL comparés aux animaux naïfs.

DISCUSSION

L'objectif de ma thèse était de caractériser le plus précisément possible le phénotype des astrocytes et des cellules microgliales dans différents noyaux thalamiques impliqués dans l'intégration de l'information nociceptive et de suivre l'évolution de ce phénotype au cours du développement des symptômes douloureux dans un modèle de douleur neuropathique, le modèle SNL. Pour réaliser cette étude j'ai utilisé différentes approches qu'il me parait bon de discuter dans un premier temps.

I- La méthodologie à l'épreuve de la réalité

A- Le plan expérimental

La mise en œuvre du modèle SNL inclut une chirurgie lourde : incision cutanée puis incision musculaire profonde, dégagement et prélèvement d'une apophyse transverse vertébrale (donc fracture osseuse), dégagement de deux nerfs spinaux dont un qui chemine sous le sacrum (donc recherche en aveugle sous le sacrum par l'utilisation d'un crochet en verre), passage d'un fil sous chacun des deux nerfs spinaux et enfin ligature serrée de ces deux nerfs spinaux. Les animaux sham sont classiquement des animaux qui subissent toutes les étapes précédentes sauf la dernière à savoir la ligature serrée. Dans l'immense majorité des études qui utilisent le modèle SNL, seuls des animaux sham et SNL sont comparés, surtout pour les études comportementales. Certes, cette comparaison permet effectivement d'objectiver l'effet des ligatures mais par contre elle n'apporte aucune information sur de possibles effets de la chirurgie qui est somme toute assez invasive. C'est dans ce contexte que j'ai décidé d'utiliser trois groupes expérimentaux : animaux naïfs (sans aucune chirurgie), animaux sham (chirurgie sans ligatures) et animaux SNL (chirurgie et ligatures).

Si seules les ligatures ont un effet alors les résultats obtenus sur les animaux naïfs et sham ne seront pas significativement différents mais ils le seront de ceux obtenus avec les animaux SNL

(Fig. 100 A). Si seule la chirurgie a un effet alors les résultats obtenus sur les animaux sham et SNL ne seront pas significativement différents mais ils le seront par rapport à ceux obtenus avec les animaux naïfs (Fig. 100, B). Enfin, si l'effet des ligatures se surajoute à un effet de la chirurgie alors chaque groupe expérimental sera significativement différent des deux autres (Fig. 100, C).

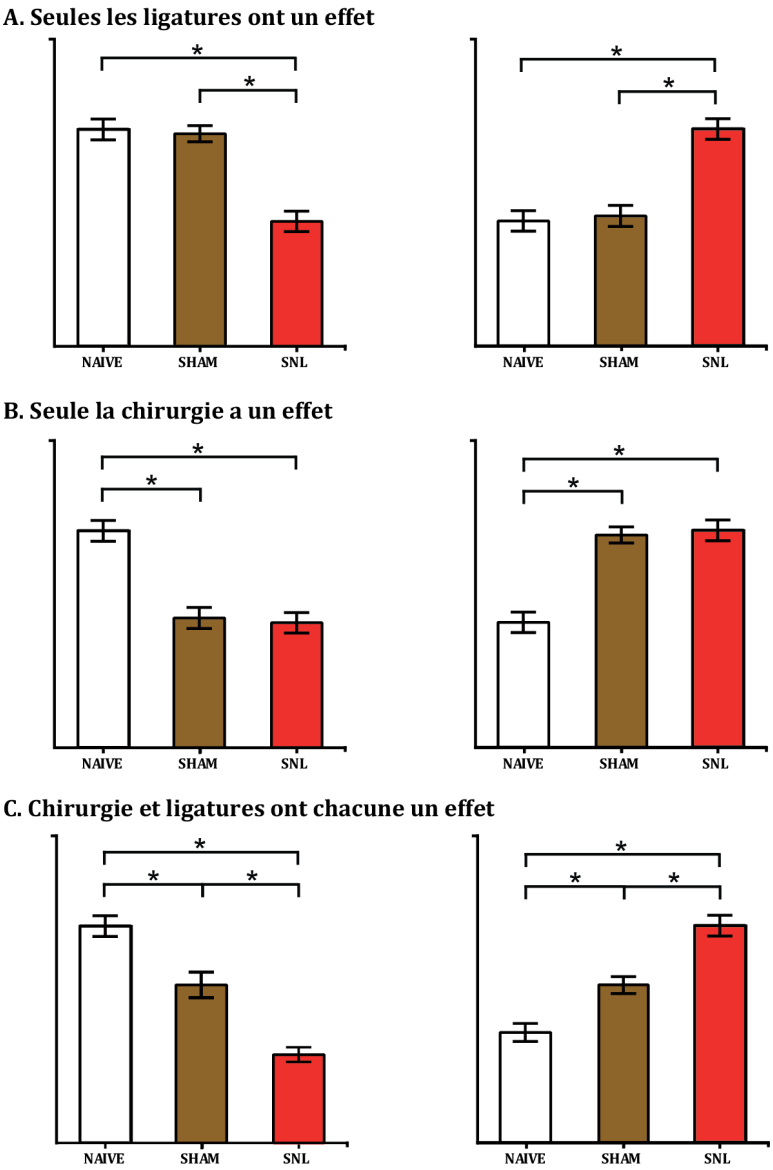


Figure 100 : Illustration des résultats théoriques possibles des effets des ligatures seules, de la chirurgie seule ou de la chirurgie et de la ligature. En A, seuls les animaux SNL présentent une diminution ou une augmentation du paramètre étudié comparés aux animaux naïfs et sham. En B, les animaux sham et SNL ont tous les deux le paramètre étudié qui peut soit diminuer soit augmenter comparés au groupe des animaux naïfs. En C, les effets de la chirurgie et de la ligature se cumulent, les animaux sham sont différents des animaux naïfs et SNL et les animaux SNL sont différents des animaux naïfs et sham.

La situation est souvent apparue plus complexe. En effet, des graphiques de type A pour les différences significatives ont pu être obtenus alors que clairement la valeur obtenue pour les animaux sham était intermédiaire entre celle des animaux naïfs et des animaux SNL évoquant alors des graphiques de type C (par exemple Fig. 61, B3). Logiquement on doit conclure à un effet pur de la chirurgie alors que visiblement on est plutôt dans une tendance à un effet cumulatif de la chirurgie et des ligatures qui n'atteint pas la significativité. Enfin, dans de très nombreux cas, je n'ai pu mettre en évidence qu'une différence significative entre les animaux naïfs et SNL, la valeur obtenue pour les animaux sham pouvant être proche de celle des animaux naïfs, ou de celle des animaux SNL ou être intermédiaire entre celles des animaux naïfs et SNL. Dans ce cas la part de l'effet chirurgie et de l'effet ligatures ne peut pas être distinguée. Ces difficultés proviennent surement du nombre d'échantillons trop faible pour aboutir à des analyses statistiques fiables.

Si on s'en tient aux effets statistiquement significatifs décrits en Fig. 100, j'ai pu constater qu'il y avait un effet qui ne serait dû qu'à la chirurgie sur un paramètre du comportement douloureux qui est un phénomène compensatoire (augmentation du poids porté par la patte arrière controlatérale à J14 chez les SNL et les sham; Fig. 36, B), sur l'expression de l'ARNm d'un marqueur astrocytaire (S100β) et d'un marqueur microglial (CD11b) dans les tissus thalamiques latéraux à J28 (Fig. 75, A1 et Fig. 76, A1) et enfin sur le nombre de cellules GFAP positives dans la SSR du VPL ipsilatéral à J14 (Fig. 62, B3). On voit donc que ces effets sont limités. Nous verrons de plus, dans la suite de cette discussion, que les résultats de qRT-PCR obtenus sur les tissus thalamiques sont sujets à caution. Enfin, le résultat obtenu sur le marqueur astrocytaire a été trouvé dans le VPM ipsilatéral qui *a priori* ne reçoit que des informations somesthésiques en provenance de la face et du crâne. Il semble donc que les effets produits seulement par la chirurgie soient peu importants. Par contre, de manière intéressante, les effets cumulatifs de la chirurgie et des ligatures ne concernent que le comportement douloureux (à J14 : Fig. 34, B et D ; à J28 : Fig. 71, A et Fig. 73, A). Enfin, un effet strictement dû aux ligatures a été trouvé aussi bien

au niveau de paramètres du comportement douloureux (à J14 : Fig. 34, C et 36, A ; à J28 : Fig. 71, B et C, Fig. 73, B, C et D) qu'au niveau des surfaces occupées par les immunomarquages gliaux (marquage microglial à J14 : Fig. 46, A2 ; marquage astrocytaire à J14 : Fig. 67, A2 ; marquage astrocytaire à J28 : Fig. 93, A2 et B2, Fig. 94, A2). Ainsi, il semble bien que la majorité des effets observés soit due aux ligatures des nerfs spinaux.

B- qRT-PCR sur prélèvements de tissus nerveux versus sur noyaux cérébraux obtenus par microdissection laser

Dans mon étude j'ai réalisé une quantification de l'expression de l'ARNm de gènes (marqueurs gliaux et marqueurs de réactivité gliale) soit sur des prélèvements de tissus thalamiques soit sur des prélèvements de noyaux thalamiques obtenus par microdissection laser. Dans le premier cas, j'ai pu tester l'expression de l'ARNm de 54 gènes (au maximum) et dans l'autre de 9 gènes (au maximum). Cette différence dans le nombre de gènes testés est inhérente à la quantité de tissus extraite dans chacun des cas. Par contre, on peut constater qu'aucune des différences observées sur tissus thalamiques n'a été retrouvée sur noyaux thalamiques obtenus par microdissection laser. Dans un cas, j'ai même obtenu des réponses inverses. Ainsi à J14 l'expression de l'ARNm de la CTSS est significativement diminuée chez les animaux SNL comparés aux naïfs dans des prélèvements thalamiques latéraux (côté controlatéral) et est significativement augmentée chez les animaux SNL comparés aux naïfs dans le VPL côté controlatéral obtenu par microdissection laser. Ainsi, même si l'approche sur prélèvements de tissus cérébraux est plus aisée (pas de coupes cryostat à réaliser et pas de course contre la montre pour garder la plus grande intégrité aux ARN pendant les processus de coupes et de légère coloration) et permet de tester l'expression d'un plus grand nombre de gènes, elle ne permet même pas d'extraire des tendances et ne semble donc pas pertinente. Ainsi, si l'on veut obtenir des informations fiables sur l'expression de l'ARNm de gènes dans des noyaux cérébraux spécifiques (et de taille limitée), seule l'approche de qRT-PCR sur tissus prélevés par microdissection laser semble appropriée. Cette information est à garder à l'esprit pour avoir une

lecture critique des nombreux articles qui tirent des conclusions sur des résultats de PCR obtenus sur de larges prélèvements de tissus cérébraux. Dans la suite de la discussion, je ne prendrai donc en compte que les résultats de qRT-PCR obtenus sur des noyaux thalamiques prélevés par microdissection laser.

Il est important de noter dans ce contexte que les variations d'expression d'ARNm que j'ai pu obtenir ont toujours été faibles. Au maximum, j'ai obtenu des variations de 34%. On peut se demander si une telle variation aura des conséquences au niveau protéique. Dans ce contexte, j'ai étudié l'expression de la protéine CTSS à J14 dans le noyau thalamique où j'avais détecté une augmentation de 33% de l'expression de son ARNm chez les animaux SNL par rapport aux animaux naïfs. Quels que soient les paramètres étudiés (surface occupée par le marquage, intensité de fluorescence du marquage, nombre de cellules CTSS immunopositives) je n'ai observé aucune différence significative entre les 3 groupes expérimentaux. Même si sans doute une approche en Western blot aurait été plus judicieuse, ces résultats tendent à montrer qu'il n'existe pas de conséquences au niveau protéique des variations d'expression de l'ARNm. Par contre, mes approches n'étaient sans doute pas adaptées au cas particulier de la CTSS qui est une protéine synthétisée, stockée et libérée par la microglie. La prise en compte du contingent libéré de la CTSS en immunohistochimie est extrêmement difficile. De plus, dans mon étude, j'ai adapté le seuillage pour me focaliser sur les corps cellulaires CTSS immunopositifs, ne prenant pratiquement pas en compte l'immunomarquage CTSS extracellulaire. Un dosage de l'activité de la CTSS sur du liquide de perfusion de coupes de thalamus provenant des animaux des 3 groupes expérimentaux aurait sans doute été plus pertinent (voir par exemple Clark et al., 2009).

C- Comptes cellulaires dans un seul plan focal versus approche stéréologique

En quantifiant le nombre de cellules immunopositives pour des marqueurs gliaux sur des images acquises dans un seul plan focal, j'ai obtenu des résultats surprenant pour les marqueurs microgliaux. En effet j'ai observé une diminution du nombre de cellules immunopositives pour des marqueurs microgliaux à J14 dans le VPL chez les animaux SNL comparés aux animaux naïfs

et sham. Une telle diminution n'a jamais été détectée dans une structure nerveuse dans un contexte de douleur. J'ai donc décidé de mettre à l'épreuve mes résultats en utilisant un comptage stéréologique qui permet des quantifications fiables dans le volume d'une structure. Cette approche stéréologique que j'ai appliqué à l'immunomarquage Iba-1 m'a permis de confirmer mes résultats obtenus dans un seul plan focal que ce soit une diminution du nombre de cellules immunopositives (à J14) ou une absence de variation du nombre de cellules immunopositives (à J28). J'ai donc considéré que l'ensemble de mes comptes réalisés sur des images acquises dans un seul plan focal étaient valides aussi bien pour les marqueurs microgliaux que les marqueurs astrocytaires.

D- Nouvelle quantification des comportements douloureux obtenus par stimulation mécanique statique

Mon approche a consisté à réaliser un test comportemental me permettant de détecter et de quantifier à la fois l'allodynie et l'hyperalgésie lors d'une stimulation mécanique statique. Ce test est adapté d'une approche développée par Vos et collaborateurs (1994). Il consiste à appliquer une gamme ascendante de rigidité de filaments de von Frey et de mesurer les réponses comportementales de l'animal en utilisant un score nociceptif. L'analyse des courbes obtenues me permet de déterminer un seuil nociceptif, un score d'allodynie mécanique et un score d'hyperalgésie mécanique. Cette nouvelle méthode a été validée sur un modèle de douleur cancéreuse osseuse (Ducourneau et al., 2014). Dans ce contexte, il a été montré que cette méthode est plus sensible que le von Frey électronique puisqu'elle permet de détecter une allodynie mécanique plus précocement (Ducourneau, 2013). De plus, par rapport à la littérature, elle permet de détecter une hyperalgésie mécanique plus précocement. Dans mon modèle SNL je n'ai pas réalisé de décours temporel précis d'apparition des symptômes douloureux. En effet à J14, les symptômes douloureux sont déjà présents chez les animaux SNL. Je ne peux donc pas affirmer qu'elle permet une détection plus précoce des comportements douloureux. Par contre, elle permet de détecter une allodynie et une hyperalgésie mécanique en ne pratiquant qu'un seul

test comportemental là où normalement il faut réaliser deux tests (von Frey et analgésiomètre de pression).

E- Le problème de la structure cérébrale contrôle

Au début de mon étude qui vise à caractériser les modifications phénotypiques des cellules gliales thalamiques dans un contexte de douleur neuropathique suite à la ligature de nerfs spinaux, j'ai décidé d'inclure le noyau VPM comme structure contrôle. En effet, le VPM reçoit des informations somesthésiques en provenance de la face et du crâne et, même s'il est impliqué dans l'intégration des informations nociceptives en provenance de ces régions du corps, il me semblait qu'il ne serait pas affecté par une ligature de nerfs spinaux lombaires. A ma grande surprise, il a présenté à J14, pour sa partie ipsilatérale, une diminution d'expression de l'ARNm de la GFAP ainsi qu'une diminution de la surface occupée par le marquage Iba-1 chez la animaux SNL comparés aux animaux naïfs. Il ne s'agit pas d'une modification généralisée à l'ensemble du thalamus et donc non spécifique car sa partie controlatérale n'est pas affectée ainsi que le DM et les IL. Par contre, je n'ai pas d'explication au fait qu'une ligature de nerfs spinaux lombaires puisse altérer l'expression d'ARNm et de protéines au niveau d'un noyau thalamique qui *a priori* ne reçoit pas d'afférences nociceptives en provenance du territoire lésé. Dans une expérience pilote, j'ai analysé la surface de l'immunomarquage Iba-1 dans le corps genouillé dorsolatéral (relais thalamique des informations visuelles) et là encore j'ai détecté des modifications pour certains marqueurs. Je n'ai donc pas poursuivi dans cette voie. Le noyau réticulaire thalamique ne m'a pas paru un bon candidat compte tenu de ses multiples interactions avec les différents noyaux thalamiques et son implication possible dans le développement des douleurs chroniques. Mon étude ne comprend donc pas de structure thalamique qui ne présente aucune modification de marqueurs gliaux dans un contexte de douleur neuropathique. Les structures extra-thalamiques présentes sur les images que j'ai acquises pour réaliser les analyses quantitatives ne m'ont pas paru non plus adéquates. Par exemple l'hippocampe, compte tenu des effets des

douleurs chroniques sur les performances mnésiques, ne m'a pas paru adapté (Cardoso-Cruz et al., 2013; Ren et al., 2011).

II- De nouvelles données sur les comportements douloureux des animaux sham et SNL

En utilisant les tests comportementaux des filaments de von Frey et du DWB sur les animaux SNL, je retrouve les symptômes douloureux classiquement décrits aussi bien à J14 qu'à J28: une allodynie mécanique, une hyperalgésie mécanique et des douleurs ambulatoires chez les animaux SNL (Kim and Chung, 1992; Kim et al., 1997). Par contre, je montre pour la première fois à ma connaissance sur un modèle SNL et en utilisant le DWB que le poids porté par la patte douloureuse est diminué et qu'il existe un report du poids du corps sur les autres pattes. De plus, je montre que ce report est progressif : à J14 sur la patte arrière controlatérale et à J28 toujours sur la patte arrière controlatérale mais aussi sur les deux pattes avant. Il est intéressant de noter que le report du poids sur la patte arrière controlatérale est aussi trouvé chez les animaux sham à J14 et que ce report est aussi important que chez les SNL. Il s'agit d'ailleurs de l'unique effet significatif du à la seule chirurgie observé au niveau comportemental. A J28 ce report n'est plus trouvé chez les animaux sham mais persiste chez les animaux SNL, il s'agit alors d'un effet du seulement aux ligatures.

Mon approche en filaments de von Frey a révélé un aspect singulier : l'existence d'un phénomène de compensation sur la patte controlatérale des animaux neuropathiques. En effet, à J14 le seuil nociceptif de la patte controlatérale des animaux SNL augmente par rapport à celui des animaux naïfs et le score d'hyperalgésie de cette même patte diminue par rapport à celui des animaux naïfs. Ainsi, les animaux neuropathiques présentent une diminution de l'expression de la douleur sur la patte opposée au côté des ligatures. Lors des expériences, l'application des filaments sous les pattes ipsi- et controlatérale ne suit pas d'ordre particulier et la première patte testée n'est pas toujours la même entre chaque filament. De plus, une latence entre chaque application d'au moins 5 secondes est observée. Il ne peut donc pas s'agir d'un biais

expérimental. Nous avons vu avec le test de DWB qu'il existe un report du poids porté par la patte arrière ipsilatérale majoritairement sur la patte arrière controlatérale. Ainsi, les animaux neuropathiques semblent développer un mécanisme adaptatif de compensation qui permettrait à la patte controlatérale, qui porte plus le poids de l'animal, d'être moins sensible aux stimuli douloureux. A J28 ce phénomène de compensation permettant à la patte arrière controlatérale d'être moins sensible aux stimuli douloureux n'est plus présent. Il s'agit donc d'un mécanisme transitoire, adaptatif à court terme. Par contre, le report du poids de l'animal sur cette patte est toujours présent. On sait que les afférences en provenance de chacune des deux pattes arrière cible majoritairement chacune un VPL différent (celui qui est situé du côté opposé). Même si cela est purement spéculatif et que le phénomène de compensation est transitoire, il est possible d'envisager qu'il puisse exister des modifications cellulaires (ARNm et protéines) à la fois dans le thalamus controlatéral (suite à la lésion des nerfs spinaux) et dans le thalamus ipsilatéral (suite à ce phénomène de compensation et/ou au report du poids).

Le second aspect très singulier mis en évidence par mon travail de thèse sur le plan comportemental est la présence de symptômes douloureux chez les animaux sham. Cette mise en évidence a été rendue possible par l'utilisation d'animaux naïfs dans mon plan expérimental, ce qui est peu pratiqué dans les études sur les modèles animaux de douleur. Je montre ainsi à J14 chez les animaux sham que le seuil nociceptif de la patte arrière ipsilatérale est significativement diminué par rapport à celui des animaux naïfs et que le score d'hyperalgésie de cette patte est significativement augmenté par rapport à celui des animaux naïfs. Donc les animaux sham développent une allodynie et une hyperalgésie mécanique au niveau de leur patte arrière ipsilatérale à J14. Nous l'avons vu, la chirurgie que subissent les animaux sham est lourde et il n'est donc pas surprenant de trouver des symptômes douloureux 14 jours après. Par contre, alors qu'à J28 je pensais que ces symptômes auraient disparu, mon étude montre que le seuil nociceptif de la patte arrière ipsilatérale des animaux sham est toujours significativement plus faible que celui des animaux naïfs. Le symptôme douloureux d'allodynie mécanique est donc

toujours présent chez les animaux qui ont seulement subi une chirurgie. De même le poids porté par la patte arrière ipsilatérale est significativement toujours plus faible chez les animaux sham que chez les animaux naïfs. Les animaux sham présentent donc toujours des douleurs ambulatoires 28 jours après leur chirurgie. Les animaux sham classiquement utilisés dans les études de douleur neuropathique sont donc des animaux douloureux et ce à long terme. En revanche, le score d'hyperalgésie de la patte arrière ipsilatérale n'est plus significativement différent de celui des naïfs. Il semble donc exister un phénomène de résolution progressif des symptômes douloureux au cours du temps chez les animaux sham. Cette résolution progressive prend un grand temps puisqu'à J28 allodynie mécanique et douleurs ambulatoires sont toujours présentes chez les animaux sham. En effet, les comportements douloureux disparaissent au bout de 4 jours dans le modèle d'incision de la patte postérieure (incision plan cutané et plan musculaire ; Wu et al., 2009) ainsi que dans le modèle de chirurgie du genou (traumatismes au niveau des tendons et de l'os en plus ; Buvanendran et al., 2008). Par contre, nos résultats sont globalement en accord avec des travaux qui montrent qu'il faut attendre 15 jours pour que les comportements douloureux reviennent à des valeurs contrôle après une laminectomie qui consiste à prélever l'apophyse transverse L6 et à dégager les ganglions L5 et L6 en attaquant la partie latérale des vertèbres L5 et L6 (Košta et al., 2009). On notera d'une part qu'ils ne mesurent que l'hyperalgésie mécanique et que d'autre part à aucun moment ils ne manipulent de structures nerveuses. En effet, dans mon cas, j'ai mesuré en plus l'allodynie mécanique ainsi que la répartition du poids de l'animal sur les différentes pattes et j'ai dégagé les nerfs spinaux et passé un fil en dessous (des microlésions nerveuses peuvent s'être produites). Ces différences pourraient expliquer notre délai plus long de résolution des comportements douloureux des animaux sham. Enfin, on soulignera que ces résultats montrent bien que le comportement douloureux observé chez les animaux SNL est dû à un effet cumulatif de la chirurgie et des ligatures tout au moins pour l'abaissement du seuil du nociceptif à J14 et J28.

III- La microglie thalamique en condition contrôle et en condition de douleurs neuropathiques

J'ai étudié la microglie thalamique par des approches de biologie moléculaire et d'immunohistofluorescence (surface d'immunomarquage, intensité d'immunomarquage et nombre de cellules immunopositives) chez des animaux naïfs, sham et SNL. Mon étude immunohistochimique quantitative apporte des informations nouvelles sur le phénotype microglial thalamique chez les animaux naïfs.

A- Le phénotype microglial dans le thalamus des animaux naïfs

La microglie thalamique présente un phénotype morphologique classique de microglie ramifiée radialement. Elle présente un corps cellulaire le plus souvent allongé d'environ 10µm de long d'où partent en général 3 prolongements (jusqu'à 5) très ramifiés. Je n'ai pas noté de différence dans la morphologie microgliale entre les différents noyaux thalamiques que j'ai étudiés. Mon étude quantitative en stéréologie m'a permis d'estimer à 11 000 le nombre de cellules microgliales présentes dans le VPL (aussi bien ipsilatéral que controlatéral), ce qui équivaut à environ 21 150 cellules microgliales par mm^3. Mes comptes sur coupes thalamiques ont abouti à la présence d'environ 270 cellules microgliales par mm^2 dans la SSR du VPL (aussi bien ipsilatérale que controlatérale). Il est connu que la densité des cellules microgliales est variable selon les régions cérébrales. En effet, Lawson et collaborateurs ont rapporté la présence d'environ 21 cellules/mm^2 dans le cervelet et environ 165 cellules/mm^2 dans le pallidum ventral (Lawson et al., 1990). Ils rapportent pour le thalamus (noyau thalamique latérodorsal et latéropostérieur) environ 100 cellules microgliales par mm^2 en utilisant un marqueur membranaire spécifique des macrophages (F4/80) chez la souris. La densité thalamique des cellules microgliales pourrait donc être plus élevée chez le rat. Comme je n'ai réalisé les comptes cellulaires que dans la SSR du VPL, je ne peux pas comparer les densités microgliales entre les différents noyaux thalamiques. Malgré tout, je n'ai pas été frappée lors de l'observation de mes coupes histologiques par des différences considérables entre les noyaux thalamiques à part

peut-être une densité microgliale plus importante et/ou une tendance à une plus grande ramification dans les IL. Comme mes comptes cellulaires ont été réalisés sur des coupes doublement immunomarquées pour CD11b/c et Iba-1 j'ai pu obtenir des résultats précis sur le phénotype neurochimique microglial thalamique. En effet, j'ai trouvé que 100% des cellules immunopositives pour CD11b/c sont aussi Iba-1 immunopositives et inversement dans la SSR du VPL. Cela a aussi été trouvé dans le cortex, l'hippocampe et la substance noire chez le rat (Ji et al, 2007). Par contre, seules 38% des cellules Iba-1 immunopositives sont CTSS immunopositives. Toutes les cellules CTSS immunopositives sont Iba-1 immunopositives. Mes travaux dressent donc un portrait phénotypique de la microglie thalamique.

B- Des signes moléculaires de réactivité microgliale thalamique en condition de douleurs neuropathiques

Par mon approche de qRT-PCR sur noyaux thalamiques prélevés par microdissection laser j'ai pu montrer que dans le VPL controlatéral des animaux SNL l'expression de l'ARNm d'une part de la CTSS et de CX3CR1 et d'autre part de CX3CL1 est augmentée à J14 et J28 respectivement. Ces augmentations ne sont retrouvées ni dans le VPL ipsilatéral ni dans les deux VPM. Ces augmentations semblent donc spécifiques au VPL controlatéral qui reçoit les informations somesthésiques en provenance de l'hémicorps où ont été réalisées les ligatures. Je n'ai malheureusement pas de preuves que ces augmentations au niveau de l'ARNm sont retrouvées au niveau protéique. J'ai testé cette corrélation pour la CTSS et n'ai pas trouvé de variations entre les différentes conditions expérimentales en termes de surface occupée par l'immunomarquage, d'intensité de l'immunomarquage et de nombre de cellules CTSS immunopositives. J'ai déjà discuté du fait que mon approche immunohistochimique était très certainement inadaptée pour tester cette hypothèse (Voir I, B). En ce qui concerne CX3CR1 j'ai mené des expériences immunohistochimiques pilotes. L'immunomarquage CX3CR1 m'est apparu extrêmement punctiforme et donc difficilement quantifiable. Sans doute une approche en Western blot aurait pu être envisageable (par exemple Lee et al., 2010). Enfin, pour CX3CL1

et notamment son fragment soluble des dosages ELISA sur le liquide de perfusion de tranches thalamiques auraient pu être envisagés (Clark et al., 2009). En tout état de cause j'ai montré que l'augmentation de l'expression de l'ARNm de la CTSS et de CX3CR1 est corrélée positivement avec l'intensité des douleurs ambulatoires. Ainsi plus l'animal a mal (moins il porte de poids sur sa patte arrière ipsilatérale) plus il exprime l'ARNm de la CTSS et de CX3CR1. De manière plus surprenante mais intéressante, l'augmentation de l'ARNm de CX3CL1 observée à J28 est corrélée positivement avec le score d'hyperalgésie obtenu à J14 : plus les animaux ont un score d'hyperalgésie élevé à J14, plus ils vont exprimer l'ARNm de CX3CL1 à J28. Il semble donc exister un continuum entre les deux temps post-chirurgicaux.

Nous avons vu en introduction que les partenaires CX3CL1-CTSS-CX3CR1 sont intimement liés dans la moelle épinière dans une boucle d'amplification de l'information nociceptive. Dans la moelle épinière, les neurones de la corne dorsale ainsi que les terminaisons sensorielles expriment CX3CL1 (Clark et al., 2007; Lindia et al., 2005; Verge et al., 2004) qui est une chémokine. De plus, il existe une forme soluble, résultant du clivage de la CX3CL1 membranaire par la CTSS, qui est exprimée et libérée par la microglie (Clark et al., 2007). Enfin, la microglie exprime spécifiquement le récepteur de la CX3CL1 soluble, le récepteur CX3CR1 (Lindia et al., 2005; Verge et al., 2004). En conditions neuropathiques, la microglie réactive sur-exprime la CTSS (Clark et al., 2007) ainsi que le récepteur CX3CR1 (Lindia et al., 2005; Verge et al., 2004) et les taux de fractalkine soluble augmentent (Clark et al., 2009). Ainsi lors d'une lésion nerveuse, la microglie libère la CTSS qui scinde la CX3CL1 neuronale en CX3CL1 soluble qui en retour agit sur la microglie via les récepteurs CX3CR1. La stimulation de ces récepteurs va, via la voie p38MAPK (Clark et al., 2007; Zhuang et al., 2007), augmenter la libération de molécules pro-inflammatoires comme IL-1, IL-6 et NO (Milligan et al., 2005) qui à leur tour vont pouvoir agir sur la microglie elle-même mais aussi sur les neurones et les astrocytes. Même si à l'heure actuelle dans mon modèle SNL et dans le thalamus seule l'expression de l'ARNm de quelques pièces du puzzle de cette boucle d'amplification est augmentée, un tel scénario bien décrit au

niveau d'entrée des afférences sensorielles pourrait aussi exister au niveau du relais thalamique. Au-delà de la mesure des taux de CX3CL1 soluble et de l'activité de la CTSS dans le thalamus des animaux neuropathiques, l'injection intra-VPL de l'inhibiteur fonctionnel de la CTSS, le morpholinurea-leucine-homophenylalanine-vinyl phenyl sulfone, devrait être testée. Ainsi, si cette injection diminue ou abolit le comportement douloureux des animaux dont les nerfs spinaux ont été ligaturés, alors cette boucle d'amplification neuro-gliale pourrait jouer un rôle au niveau thalamique dans le maintien des douleurs neuropathiques.

C- Une étonnante diminution transitoire du nombre de cellules thalamiques exprimant des marqueurs microgliaux en condition de douleurs neuropathiques

Contre toute attente, après l'observation de signes moléculaires (ARNm) de réactivité microgliale, mon approche en immunohistofluorescence a montré que le nombre de cellules microgliales CD11b/c et Iba-1 immunopositives ainsi que la surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 dans la SSR du VPL controlatéral sont diminués chez les animaux neuropathiques à J14. Ces diminutions ne sont pas observées dans le thalamus central (DM et IL). Seule la surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 est diminuée dans les VPL et VPM ipsilatéraux des animaux neuropathiques. La ligature des nerfs spinaux semblent donc bien capables d'entraîner des altérations neurochimiques dans le thalamus ipsilatéral aux ligatures. Nous savons que des projections thalamiques bilatérales ont été mises en évidence : lors d'hémisections unilatérales de la moelle épinière thoracique, des bouffées de potentiels d'action des neurones nociceptifs ont été enregistrés dans les noyaux VPL ipsi- et controlatéral à la lésion (Liang et Mendell, 2013).

Comme j'ai montré que 100% des cellules CD11 b/c immunopositives sont Iba-1 positives dans le VPL, il est surprenant de constater que seule la surface occupée par l'immunomarquage Iba-1 diminue alors que le nombre de cellules doublement marquées diminue chez les animaux neuropathiques. Comme CD11b/c est une protéine membranaire on peut envisager que des

altérations fines de la morphologie microgliale soit responsable de cette absence de modification de l'immunomarquage alors que le nombre de cellules est diminué. Dans cette perspective j'ai essayé de réaliser une étude de la morphologie des cellules microgliales marquées en fluorescence en utilisant un poste Neurolucida. Mes essais m'ont montré que la fluorescence disparaissait avant d'avoir reconstruit la totalité de la cellule microgliale. Ainsi soit il faudra que je réalise des acquisitions confocales de mes coupes soit il faudra que je réalise une immunodétection des marqueurs microgliaux en utilisant une visualisation enzymatique avec de la diaminobenzidine comme chromogène.

De manière encore plus surprenante cette diminution du nombre de cellules thalamiques exprimant des marqueurs microgliaux observée à J14 chez les animaux neuropathiques n'est plus présente à J28. Il s'agit donc d'un phénomène précoce et transitoire. Ceci tend à faire penser qu'il ne s'agit pas d'une disparition par apoptose de cellules microgliales. De manière préliminaire, j'ai réalisé un immunomarquage de la caspase 3, marqueur d'apoptose (pour revue Ceccatelli, 2004) sur des coupes thalamiques (Fig. 101). Cette expérience pilote n'a révélé aucune différence visible dans le nombre de noyaux immunopositifs pour la caspase 3 entre le VPL des animaux sham et SNL, suggérant l'absence de phénomènes apoptotiques. Par contre, cette approche me semble trop lourde à mettre en œuvre de manière rigoureuse car cet immunomarquage caspase 3 devrait être réalisé à différents temps avant le 14ème jour. En effet, c'est au 14ème jour que j'observe moins de cellules microgliales immunomarquées, elles devraient donc avoir subi le phénomène d'apoptose avant. Ces expériences impliqueraient donc de faire de nouveaux temps post-chirurgicaux.

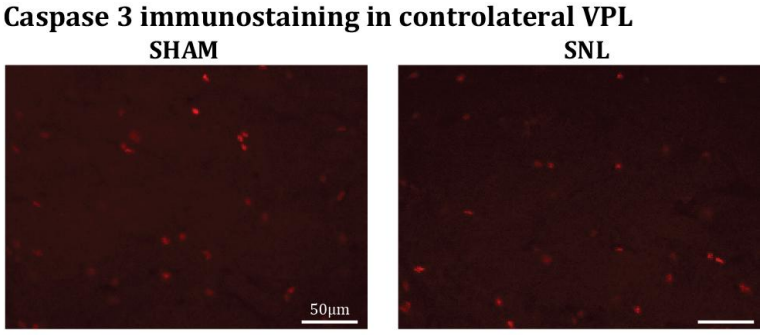


Figure 101 : Microphotographies de l'immunomarquage de la caspase 3 dans le noyau VPL controlatéral chez les animaux SNL et sham. On ne remarque aucune différence significative entre ces deux conditions.

La diminution du nombre de cellules microgliales immunomarquées ne nécessite pas forcément des phénomènes apoptotiques. En effet on peut envisager une migration des cellules microgliales vers d'autres zones thalamiques (même si ces migrations sont surtout observées vers des zones lésées ; Wake et al., 2013) ou une une diminution de l'expression des marqueurs microgliaux (qui passerait alors sous le seuil de détectabilité en immunohistochimie) au sein d'une cellule qui pourrait les ré-exprimer ultérieurement. Dans la dernière hypothèse il est surprenant de ne pas avoir observé de diminution de l'expression de l'ARNm de CD11b et/ou Iba-1 dans le VPL prélevé par microdissection laser.

Cette diminution du nombre de cellules microgliales thalamiques immunomarquées en condition de douleur neuropathique est extrêmement surprenante. En effet, les rares études portant sur la glie thalamique en condition de douleur neuropathique ont toutes rapporté une réactivité microgliale à l'exception d'une (Marcello et al., 2013). Ainsi après lésion de la moelle épinière, il a été montré que la surface occupée par l'immunomarquage CD11b/c est augmentée dans le VPL controlatéral 14 et jusqu'à 28 jours après la lésion (Zhao et al., 2007). Dans ce même modèle, le nombre de cellules Iba-1 immunopositives ainsi que l'expression de la protéine Iba-1 sont augmentés dans le VPL controlatéral respectivement 7 jours (Wu et al., 2013) et 28 jours (Saghaei et al., 2013) après la lésion. Quatorze jours après transsection du nerf sciatique et 7 jours après constriction du nerf sciatique, l'intensité du marquage Iba-1 et CD11b/c respectivement sont augmentées dans le VPL controlatéral (LeBlanc et al., 2011; Mòdol et al.,

2014). Il semble donc exister un consensus sur la présence d'une réactivité microgliale dans le VPL controlatéral en condition de douleur neuropathique et cette réactivité microgliale est précoce (7 jours après lésion nerveuse). Le modèle SNL semble donc faire exception. Je n'ai pas d'explication à ce phénomène.

IV- Les astrocytes thalamiques en condition contrôle et en condition de douleurs neuropathiques

J'ai étudié les astrocytes thalamiques par des approches de biologie moléculaire et d'immunohistofluorescence (surface d'immunomarquage, intensité d'immunomarquage et nombre de cellules immunopositives) chez des animaux naïfs, sham et SNL. Mon étude immunohistochimique quantitative apporte des informations nouvelles sur le phénotype astrocytaire thalamique chez les animaux naïfs.

A- Le phénotype astrocytaire dans le thalamus des animaux naïfs

Les astrocytes thalamiques présentent un phénotype morphologique classique d'astrocytes protoplasmiques avec de nombreux prolongements épais (en général 6). Je n'ai pas noté de différence dans la morphologie astrocytaire entre les différents noyaux thalamiques que j'ai étudiés. Mes comptes sur coupes thalamiques ont abouti à la présence d'environ 180 astrocytes GFAP positifs par mm^2 et d'environ 160 astrocytes S100β positifs dans la SSR du VPL (aussi bien ipsilatérale que controlatérale). Ces résultats sont en accord avec la littérature puisque chez le rat environ 150 astrocytes GFAP positifs par mm^2 ont été trouvés dans le thalamus latéral (van Landeghem et al., 2001) et environ 240 astrocytes S100β positifs par mm^2 ont été trouvés dans le thalamus (Savchenko et al., 2000). Il est généralement admis que le nombre d'astrocytes GFAP positifs est égal à un tiers de celui des astrocytes S100β positifs dans le cerveau adulte de rat (Savchenko et al., 2000). Le thalamus semble donc faire exception. Dans mon étude, je trouve même une densité d'astrocytes GFAP positifs très proche ou légèrement supérieure à celle des astrocytes S100β positifs. Comme je n'ai réalisé les comptes cellulaires que dans la SSR du VPL, je ne peux pas comparer les densités astrocytaires entre les différents noyaux thalamiques.

Malgré tout, je n'ai pas été frappée lors de l'observation de mes coupes histologiques par des différences considérables entre les différents noyaux thalamiques. Comme mes comptes cellulaires ont été réalisés sur des coupes doublement immunomarquées pour GFAP et S100β j'ai pu obtenir des résultats précis sur le phénotype neurochimique astroglial thalamique. En effet, j'ai trouvé qu'environ 70% des cellules immunopositives pour GFAP sont aussi S100β immunopositives et qu'environ 80% des cellules S100β immunopositives sont aussi GFAP immunopositives dans la SSR du VPL. Ainsi tous les astrocytes GFAP positifs ne sont pas S100β positifs et tous les astrocytes S100β positifs ne sont pas GFAP positifs. Dans l'hippocampe de souris il a été montré que 80% des cellules immunoréactives pour S100β sont aussi immunoréactives pour la GFAP alors que toutes les cellules GFAP positives étaient aussi S100β positives (Ogata et Kosaka, 2002). Mes travaux dressent donc un portrait phénotypique des astrocytes thalamiques.

B- Une étonnante diminution transitoire du nombre de cellules thalamiques exprimant des marqueurs astrocytaires en condition de douleurs neuropathiques

A J14, je montre que le nombre d'astrocytes GFAP positifs et S100β positifs est diminué dans le VPL controlatéral des animaux neuropathiques. Cette diminution ne s'accompagne d'aucune variation de la surface occupée par l'immunomarquage GFAP et d'une augmentation de la surface occupée par l'immunomarquage S100β. La diminution du nombre d'astrocytes GFAP positifs sans variation de la surface occupée par l'immunomarquage GFAP implique une modification de la morphologie des prolongements astrocytaires. En effet, la GFAP est majoritairement exprimée au niveau des prolongements astrocytaires. Ils pourraient donc être plus nombreux et/ou plus épais. La diminution du nombre d'astrocytes S100β positifs qui s'accompagne d'une augmentation de la surface occupée par l'immunomarquage S100β implique une modification de la morphologie du corps cellulaire et/ou de la partie proximale des prolongements. En effet S100β est majoritairement exprimée au niveau du corps cellulaire et de la zone d'émergence des prolongements astrocytaires. Le corps cellulaire pourrait donc être plus

large et la partie proximale des prolongements astrocytaires plus épais. Je n'ai pas observé de signes évidents de telles modifications lors de l'observation microscopique de mes immunomarquages GFAP et S100β. Je n'ai malheureusement pas réalisé de quantification de la morphologie fine des astrocytes GFAP et S100β positifs pour confirmer ou infirmer une telle hypothèse d'altération morphologique. Pour l'augmentation de la surface immunomarquée pour S100β, on peut aussi penser à une augmentation de la libération de S100β puisque cette protéine peut être libérée dans le milieu extracellulaire (Shashoua et al., 1984). Enfin, on notera que je n'ai pas détecté de diminution significative de l'expression de l'ARNm de la GFAP dans le VPL mais que cette diminution existe dans le VPM ipsilatéral.

A ma connaissance une telle diminution précoce de marqueurs astrocytaires n'a jamais été décrite dans un modèle de douleur neuropathique. Par contre, dans l'encéphalopathie de Wernicke, il existe une diminution de l'expression de la GFAP, notamment dans le thalamus médian (Hazell et al., 2010) et dans les troubles bipolaires et la dépression sévère il existe une diminution du nombre de cellules gliales ainsi que de l'expression de la protéine GFAP (Bowley et al., 2002; Rajkowska et al., 1999 ; pour revue Rajkowska and Miguel-Hidalgo, 2007). Dans ces dernières pathologies, notamment la dépression sévère, deux phénomènes sont très intéressants. Tout d'abord il existe une perte des neurones chez les patients ainsi qu'une diminution du volume des structures impliquées (cortex préfrontal, hippocampe, amygdale). Or, il semble que chez les patients atteints de douleurs neuropathiques, il existe également un phénomène d'atrophie du thalamus (Apkarian et al., 2004b; Gustin et al., 2011; Henderson et al., 2013) et une perte neuronale (Gustin et al., 2011; Pattany et al., 2002). Ma thèse étant focalisée sur les cellules gliales, je n'ai pas exploré le versant neuronal (à part l'expression de quelques canaux et récepteurs neuronaux sur mes prélèvements de tissus thalamiques et pour lesquels je n'ai trouvé aucune modification ; résultats non montrés). Par contre j'ai compté le nombre de cellules DAPI positives sur mes coupes acquises dans un plan focal et je n'ai trouvé aucune modification de ce nombre aussi bien dans le VPL que dans le VPM (résultats non montrés). Ce

résultat semble plaider pour une absence de perte neuronale massive chez mes animaux neuropathiques. Concernant le volume du VPL, j'ai réalisé une série d'expériences pour reconstruire sous Imaris la totalité du VPL sur des coupes sériées traitées histochimiquement pour la visualisation de l'AChE. Je n'ai malheureusement pas pu terminer à temps ces expériences. Les acquisitions des coupes ont été réalisées et il me reste à reconstruire les VPL sous Imaris et à quantifier leur volume.

La diminution du nombre d'astrocytes GFAP et S100β dans le VPL des animaux neuropathiques n'est plus observée à J28. Le caractère transitoire d'une telle diminution limite donc certainement son impact et ses rôles.

C- Des signes plus tardifs de réactivité astrocytaire thalamique en condition de douleurs neuropathiques

Mon étude montre qu'à J28 la surface immunomarquée pour la GFAP est augmentée dans tous les noyaux thalamiques étudiés en condition de douleur neuropathique sans modification du nombre de cellules GFAP immunopositives. Cette augmentation n'est pas observée quand on utilise le marqueur S100β. Effectivement, la protéine S100β est présente au niveau du corps cellulaire et de la partie très proximale des prolongements astrocytaires. Ainsi, une augmentation du nombre de prolongements astrocytaires et/ou leur épaississement pourrait ne pas avoir de conséquence sur la surface occupée par l'immunomarquage S100β. L'observation de mes coupes immunomarquées pour la GFAP semble effectivement montrer que les astrocytes présentent plus de prolongements GFAP positifs et que certains pourraient être plus épais chez les animaux neuropathiques que chez les animaux naïfs (on peut par exemple comparer les naïfs et SNL dans les Fig. 94 et 95). Je n'ai malheureusement pas réalisé d'analyse morphologique des astrocytes GFAP positifs pour objectiver et quantifier de telles modifications. On soulignera que l'absence de marquage GFAP au niveau du corps cellulaire devrait rendre les reconstructions sous Neurolucida plus difficiles puisque normalement il faut dessiner les contours du corps cellulaire et suivre les prolongements à partir de ce corps cellulaire.

Une augmentation de la surface occupée par l'immunomarquage GFAP sans modification du nombre d'astrocytes GFAP positifs est interprétée comme un signe de réactivité astrocytaire puisqu'elle signe l'hypertrophie astrocytaire (Sofroniew et Vinters, 2010). Par contre, la réactivité astrocytaire se caractérise aussi par une sur-expression de la GFAP (Sofroniew et Vinters, 2010). Or de manière surprenante l'expression de l'ARNm de la GFAP n'est pas augmentée dans le VPL ni le VPM des animaux neuropathiques, et j'ai même, à l'opposé, constaté une diminution d'expression de l'ARNm de S100β dans le VPL ipsilatéral des animaux neuropathiques. Ainsi l'absence de sur-expression de la GFAP ainsi que le phénotype astrocytaire qui est loin de présenter une hypertrophie massive (se référer par exemple à la Fig. 3) laissent à penser que l'on serait au début d'une réactivité astrocytaire modérée (Fig. 4B). Le délai post-chirurgical pourrait ne pas être suffisant pour observer toutes les caractéristiques d'une réactivité astrocytaire.

Même si cette réactivité astrocytaire est modérée on constate qu'elle est présente dans le VPL, le VPM, le DM et les IL, c'est-à-dire des noyaux thalamiques impliqués dans l'intégration de l'information nociceptive. Je n'explique toujours pas comment une ligature des nerfs spinaux peut altérer le noyau thalamique qui reçoit des informations somesthésiques en provenance de la face et du crâne. Par contre, une étude où la moelle épinière a été lésée au niveau de T10 a déjà rapporté des modifications d'un marqueur microglial au niveau du VPM (Wu et al., 2013). Une altération du VPM peut donc être observée sans qu'il y ait eu de lésions nerveuses dans la sphère oro-faciale. Le fait d'observer une réactivité astrocytaire dans les noyaux VPL et VPM aussi bien ipsilatéraux que controlatéraux corrobore un nombre grandissant d'études qui étayent l'existence de projections bilatérales somesthésiques au niveau thalamique (Casey et al., 1994, 1996; Coghill et al., 1999; Liang et Mendell, 2013).

Chez des patients souffrant de douleurs neuropathiques des signes d'activation gliale ont été mis en évidence par des techniques d'imagerie cérébrale dans le thalamus controlatéral (ou bilatéralement si la lésion concerne les deux côtés ; Banati et al., 2001; Loggia et al., 2015). Par

contre, ces techniques reposent sur l'utilisation d'un ligand du récepteur périphérique aux benzodiazépines qui ne permet pas de distinguer entre une activation astrocytaire ou microgliale. Les études menées sur des modèles animaux de douleurs neuropathiques ne rapportent aucun signe de réactivité astrocytaire au niveau thalamique. Ainsi, même s'ils n'illustrent pas leur résultats, ils signalent qu'aucun signe de réactivité astrocytaire thalamique n'est observé 28 jours ou plus après une lésion de la moelle épinière (Wu et al., 2013; Zhao et al., 2007). Dans des modèles CCI et SNI aucun signe de réactivité astrocytaire n'a été mis en évidence dans le thalamus en utilisant le marqueur astrocytaire GFAP (LeBlanc et al., 2011; Marcello et al., 2013). Le modèle SNL semble là encore faire exception.

V- Microglie et astrocytes thalamiques : un rôle dans le développement et le maintien de la douleur neuropathique ?

Après mes travaux réalisés sur la microglie et les astrocytes spinaux en condition de douleur neuropathique (Ducourneau et al, 2014 ; voir article fourni en annexe), je suis partie confiante à la recherche de signes forts de réactivité gliale thalamique dans ce même modèle, avec bien sûr dans l'idée de pouvoir agir sur cette réactivité gliale et d'observer les effets sur le comportement douloureux.

Contre toute attente, je montre dans le thalamus en condition de douleur neuropathique une diminution précoce et transitoire de l'expression neurochimique des quatre marqueurs principalement utilisés pour étudier la glie : Iba-1 et CD11b/c pour la microglie et GFAP et S100β pour les astrocytes. Si effectivement les astrocytes qui n'expriment plus leurs marqueurs typiques voient leurs propriétés physiologiques altérées, les conséquences de la diminution des astrocytes immunomarqués pourraient être importantes. En effet, les astrocytes jouent un rôle majeur dans le métabolisme énergétique des neurones (McKenna et al., 1996; Pellerin et Magistretti, 1994; Sibson et al., 1998) et l'homéostasie des neurotransmetteurs (Amiry-Moghaddam et al., 2003; Manley et al., 2004; Newman, 1996; Pellerin et Magistretti, 1994; Sibson et al., 1998). De plus, plus récemment, il a été montré qu'ils font partie de la synapse

tripartite et jouent un rôle actif dans la transmission synaptique (Nedergaard, 1994; Parpura et al., 1994 ; Kozlov et al., 2006; Newman, 2003b; Panatier et al., 2006; Jourdain et al., 2007 ; Perea et Araque, 2007). La transmission synaptique pourrait donc être altérée de manière précoce et transitoire dans le thalamus en condition de douleur neuropathique et cette hypothèse pourrait être rapprochée des signes d'hypoactivité thalamique observés chez les patients neuropathiques (Hsieh et al., 1995; Iadarola et al., 1995 ; Cahana et al., 2004 ; Gustin et al., 2014).

Dans le même temps et plus tardivement la voie CTSS/CX3CR1/CX3CL1 semble être activée puisque l'ARNm de ces marqueurs augmente dans le thalamus des animaux neuropathiques et ce de manière corrélée avec l'intensité des symptômes douloureux. Nous avons vu que cette voie pourrait participer à un phénomène de sensibilisation centrale au niveau thalamique et donc jouer un rôle dans le développement des douleurs neuropathiques. De plus, je montre des signes de réactivité astrocytaire modérée à J28. De très nombreuses études ont montré le rôle majeur joué par la réactivité astrocytaire spinale dans le maintien des douleurs neuropathiques (Milligan et Watkins, 2009). Elle pourrait donc être aussi impliquée au niveau thalamique.

Bien sûr mon étude n'a en aucun cas testé les rôles possibles des altérations gliales observées et n'apporte aucune information sur l'éternel dilemme entre : les altérations gliales sont la cause ou la conséquence des douleurs. Toute discussion sur l'impact des altérations gliales observées est donc purement spéculative.

Enfin, l'ambivalence des altérations gliales observée (une diminution précoce des marqueurs gliaux suivie d'une réactivité astrocytaire plus tardive) m'a beaucoup intriguée. Elle souligne une fois de plus l'importance des délais chirurgicaux lors de la recherche d'altérations phénotypiques. Par contre, cette ambivalence n'est pas sans rappeler celle observée par Fukumoto et collaborateurs sur des patients neuropathiques : avec une hyperactivité thalamique précoce (de 3 à 7 mois) suivie d'une hypoactivité thalamique (plus de 2 ans de symptômes) (Fukumoto et al., 1999).

BIBLIOGRAPHIE

A

Abudara, V., Roux, L., Dallérac, G., Matias, I., Dulong, J., Mothet, J.P., Rouach, N., and Giaume, C. (2015). Activated microglia impairs neuroglial interaction by opening Cx43 hemichannels in hippocampal astrocytes. Glia.

Adami, C., Sorci, G., Blasi, E., Agneletti, A.L., Bistoni, F., and Donato, R. (2001). S100B expression in and effects on microglia. Glia *33*, 131–142.

Akiyama, H., and McGeer, P.L. (1990a). Brain microglia constitutively express beta-2 integrins. J. Neuroimmunol. *30*, 81–93.

Akiyama, H., and McGeer, P.L. (1990b). Brain microglia constitutively express beta-2 integrins. J. Neuroimmunol. *30*, 81–93.

Akundi, R.S., Candelario-Jalil, E., Hess, S., Hüll, M., Lieb, K., Gebicke-Haerter, P.J., and Fiebich, B.L. (2005). Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-activated primary rat microglia. Glia *51*, 199–208.

Alliot, F., Godin, I., and Pessac, B. (1999). Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. Brain Res. Dev. Brain Res. *117*, 145–152.

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

Ben-Ami Bartal, I., Decety, J., and Mason, P. (2011). Empathy and pro-social behavior in rats. Science *334*, 1427–1430.

Amir, R., and Devor, M. (1996). Chemically mediated cross-excitation in rat dorsal root ganglia. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *16*, 4733–4741.

Amiry-Moghaddam, M., Otsuka, T., Hurn, P.D., Traystman, R.J., Haug, F.-M., Froehner, S.C., Adams, M.E., Neely, J.D., Agre, P., Ottersen, O.P., et al. (2003). An alpha-syntrophin-dependent pool of AQP4 in astroglial end-feet confers bidirectional water flow between blood and brain. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 2106–2111.

Anderová, M., Antonova, T., Petrík, D., Neprasová, H., Chvátal, A., and Syková, E. (2004). Voltage-dependent potassium currents in hypertrophied rat astrocytes after a cortical stab wound. Glia *48*, 311–326.

Andersen, R.A., Essick, G.K., and Siegel, R.M. (1987). Neurons of area 7 activated by both visual stimuli and oculomotor behavior. Exp. Brain Res. *67*, 316–322.

Aoki, C. (1992). Beta-adrenergic receptors: astrocytic localization in the adult visual cortex and their relation to catecholamine axon terminals as revealed by electron microscopic immunocytochemistry. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *12*, 781–792.

Apkarian, A.V., and Shi, T. (1994). Squirrel monkey lateral thalamus. I. Somatic nociresponsive neurons and their relation to spinothalamic terminals. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *14*, 6779–6795.

Apkarian, A.V., Darbar, A., Krauss, B.R., Gelnar, P.A., and Szeverenyi, N.M. (1999). Differentiating cortical areas related to pain perception from stimulus identification: temporal analysis of fMRI activity. J. Neurophysiol. *81*, 2956–2963.

Apkarian, A.V., Sosa, Y., Krauss, B.R., Thomas, P.S., Fredrickson, B.E., Levy, R.E., Harden, R.N., and Chialvo, D.R. (2004a). Chronic pain patients are impaired on an emotional decision-making task. Pain *108*, 129–136.

Apkarian, A.V., Sosa, Y., Sonty, S., Levy, R.M., Harden, R.N., Parrish, T.B., and Gitelman, D.R. (2004b). Chronic back pain is associated with decreased prefrontal and thalamic gray matter density. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *24*, 10410–10415.

Araque, A., Li, N., Doyle, R.T., and Haydon, P.G. (2000). SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *20*, 666–673.

Attal, N., Cruccu, G., Baron, R., Haanpää, M., Hansson, P., Jensen, T.S., Nurmikko, T., and European Federation of Neurological Societies (2010). EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. Eur. J. Neurol. Off. J. Eur. Fed. Neurol. Soc. *17*, 1113–e88.

Avignone, E., Ulmann, L., Levavasseur, F., Rassendren, F., and Audinat, E. (2008). Status epilepticus induces a particular microglial activation state characterized by enhanced purinergic signaling. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *28*, 9133–9144.

Azevedo, F.A.C., Carvalho, L.R.B., Grinberg, L.T., Farfel, J.M., Ferretti, R.E.L., Leite, R.E.P., Filho, W.J., Lent, R., and Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. J. Comp. Neurol. *513*, 532–541.

B

Backonja, M.-M., and Stacey, B. (2004). Neuropathic pain symptoms relative to overall pain rating. J. Pain Off. J. Am. Pain Soc. *5*, 491–497.

Bajetto, A., Bonavia, R., Barbero, S., Piccioli, P., Costa, A., Florio, T., and Schettini, G. (1999). Glial and neuronal cells express functional chemokine receptor CXCR4 and its natural ligand stromal cell-derived factor 1. J. Neurochem. *73*, 2348–2357.

Balasingam, V., Tejada-Berges, T., Wright, E., Bouckova, R., and Yong, V.W. (1994). Reactive astrogliosis in the neonatal mouse brain and its modulation by cytokines. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *14*, 846–856.

Baliki, M.N., Geha, P.Y., and Apkarian, A.V. (2009). Parsing pain perception between nociceptive representation and magnitude estimation. J. Neurophysiol. *101*, 875–887.

Banati, R.B., Myers, R., and Kreutzberg, G.W. (1997). PK ('peripheral benzodiazepine')--binding sites in the CNS indicate early and discrete brain lesions: microautoradiographic detection of [3H]PK11195 binding to activated microglia. J. Neurocytol. *26*, 77–82.

Banati, R.B., Cagnin, A., Brooks, D.J., Gunn, R.N., Myers, R., Jones, T., Birch, R., and Anand, P. (2001). Long-term trans-synaptic glial responses in the human thalamus after peripheral nerve injury. Neuroreport *12*, 3439–3442.

Bantick, S.J. (2002). Imaging how attention modulates pain in humans using functional MRI. Brain *125*, 310–319.

Bastuji, H., Mazza, S., Perchet, C., Frot, M., Mauguière, F., Magnin, M., and Garcia-Larrea, L. (2012). Filtering the reality: functional dissociation of lateral and medial pain systems during sleep in humans. Hum. Brain Mapp. *33*, 2638–2649.

Bay, H.H., and Cavdar, S. (2013). Regional connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat. J. Integr. Neurosci. *12*, 201–219.

Bayet, S., Bushnell, M.C., and Schweinhardt, P. (2014). Emotional faces alter pain perception: Emotional faces and pain. Eur. J. Pain *18*, 712–720.

Beattie, E.C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J.C., Ha, B.K., Von Zastrow, M., Beattie, M.S., and Malenka, R.C. (2002). Control of synaptic strength by glial TNFalpha. Science *295*, 2282–2285.

Beggs, S., and Salter, M.W. (2007). Stereological and somatotopic analysis of the spinal microglial response to peripheral nerve injury. Brain. Behav. Immun. *21*, 624–633.

Bélanger, M., Allaman, I., and Magistretti, P.J. (2011). Differential effects of pro- and anti-inflammatory cytokines alone or in combinations on the metabolic profile of astrocytes: Cytokines alter the metabolic profile of astrocytes. J. Neurochem. *116*, 564–576.

Bennett, G.J., and Xie, Y.K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. Pain *33*, 87–107.

Bessou, P., and Perl, E.R. (1969). Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. J. Neurophysiol. *32*, 1025–1043.

Bester, H., Matsumoto, N., Besson, J.M., and Bernard, J.F. (1997). Further evidence for the involvement of the spinoparabrachial pathway in nociceptive processes: a c-Fos study in the rat. J. Comp. Neurol. *383*, 439–458.

Bester, H., Bourgeais, L., Villanueva, L., Besson, J.M., and Bernard, J.F. (1999). Differential projections to the intralaminar and gustatory thalamus from the parabrachial area: a PHA-L study in the rat. J. Comp. Neurol. *405*, 421–449.

Bevan, S., Chiu, S.Y., Gray, P.T., and Ritchie, J.M. (1985). The presence of voltage-gated sodium, potassium and chloride channels in rat cultured astrocytes. Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Contain. Pap. Biol. Character R. Soc. G. B. *225*, 299–313.

Bianchi, R., Giambanco, I., and Donato, R. (2010). S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF-kappaB and AP-1 Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1beta and TNF-alpha. Neurobiol. Aging *31*, 665–677.

Binns, B.C., Huang, Y., Goettl, V.M., Hackshaw, K.V., and Stephens, R.L. (2005). Glutamate uptake is attenuated in spinal deep dorsal and ventral horn in the rat spinal nerve ligation model. Brain Res. *1041*, 38–47.

Black, J.A., Liu, S., and Waxman, S.G. (2009). Sodium channel activity modulates multiple functions in microglia. Glia *57*, 1072–1081.

Blomqvist, A., Flink, R., Westman, J., and Wiberg, M. (1985). Synaptic terminals in the ventroposterolateral nucleus of the thalamus from neurons in the dorsal column and lateral cervical nuclei: an electron microscopic study in the cat. J. Neurocytol. *14*, 869–886.

Blomqvist, A., Zhang, E.T., and Craig, A.D. (2000). Cytoarchitectonic and immunohistochemical characterization of a specific pain and temperature relay, the posterior portion of the ventral medial nucleus, in the human thalamus. Brain J. Neurol. *123 Pt 3*, 601–619.

Blomstrand, F., Venance, L., Sirén, A.-L., Ezan, P., Hanse, E., Glowinski, J., Ehrenreich, H., and Giaume, C. (2004). Endothelins regulate astrocyte gap junctions in rat hippocampal slices. Eur. J. Neurosci. *19*, 1005–1015.

Bogousslavsky, J., Regli, F., and Uske, A. (1988). Thalamic infarcts: clinical syndromes, etiology, and prognosis. Neurology *38*, 837–848.

Boje, K.M., and Arora, P.K. (1992). Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. Brain Res. *587*, 250–256.

Bolego, C., Ceruti, S., Brambilla, R., Puglisi, L., Cattabeni, F., Burnstock, G., and Abbracchio, M.P. (1997). Characterization of the signalling pathways involved in ATP and basic fibroblast growth factor-induced astrogliosis. Br. J. Pharmacol. *121*, 1692–1699.

Bolin, L.M., Verity, A.N., Silver, J.E., Shooter, E.M., and Abrams, J.S. (1995). Interleukin-6 production by Schwann cells and induction in sciatic nerve injury. J. Neurochem. *64*, 850–858.

Boly, M., Faymonville, M.-E., Schnakers, C., Peigneux, P., Lambermont, B., Phillips, C., Lancellotti, P., Luxen, A., Lamy, M., Moonen, G., et al. (2008). Perception of pain in the minimally conscious state with PET activation: an observational study. Lancet Neurol. *7*, 1013–1020.

Bonansco, C., Couve, A., Perea, G., Ferradas, C.Á., Roncagliolo, M., and Fuenzalida, M. (2011). Glutamate released spontaneously from astrocytes sets the threshold for synaptic plasticity. Eur. J. Neurosci. *33*, 1483–1492.

Bordey, A., and Sontheimer, H. (2000). Ion channel expression by astrocytes in situ: comparison of different CNS regions. Glia *30*, 27–38.

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

Bowley, M.P., Drevets, W.C., Ongür, D., and Price, J.L. (2002). Low glial numbers in the amygdala in major depressive disorder. Biol. Psychiatry *52*, 404–412.

Bowman, C.L., and Kimelberg, H.K. (1984). Excitatory amino acids directly depolarize rat brain astrocytes in primary culture. Nature *311*, 656–659.

Brand-Schieber, E., Werner, P., Iacobas, D.A., Iacobas, S., Beelitz, M., Lowery, S.L., Spray, D.C., and Scemes, E. (2005). Connexin43, the major gap junction protein of astrocytes, is down-regulated in inflamed white matter in an animal model of multiple sclerosis. J. Neurosci. Res. *80*, 798–808.

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

Le Breton, D. (2006). Anthropologie de la douleur (Paris: Éditions Métailié).

Broderick, C., Hoek, R.M., Forrester, J.V., Liversidge, J., Sedgwick, J.D., and Dick, A.D. (2002). Constitutive retinal CD200 expression regulates resident microglia and activation state of inflammatory cells during experimental autoimmune uveoretinitis. Am. J. Pathol. *161*, 1669–1677.

Brown, K.J., and Grunberg, N.E. (1995). Effects of housing on male and female rats: crowding stresses male but calm females. Physiol. Behav. *58*, 1085–1089.

Brozzi, F., Arcuri, C., Giambanco, I., and Donato, R. (2009). S100B Protein Regulates Astrocyte Shape and Migration via Interaction with Src Kinase: IMPLICATIONS FOR ASTROCYTE DEVELOPMENT, ACTIVATION, AND TUMOR GROWTH. J. Biol. Chem. *284*, 8797–8811.

Brüggemann, J., Shi, T., and Apkarian, A.V. (1994). Squirrel monkey lateral thalamus. II. Viscerosomatic convergent representation of urinary bladder, colon, and esophagus. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *14*, 6796–6814.

Büchel, C., Bornhovd, K., Quante, M., Glauche, V., Bromm, B., and Weiller, C. (2002). Dissociable neural responses related to pain intensity, stimulus intensity, and stimulus awareness within the anterior cingulate cortex: a parametric single-trial laser functional magnetic resonance imaging study. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *22*, 970–976.

Burgess, P.R., and Perl, E.R. (1967). Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. J. Physiol. *190*, 541–562.

Burstein, R., Dado, R.J., and Giesler, G.J. (1990). The cells of origin of the spinothalamic tract of the rat: a quantitative reexamination. Brain Res. *511*, 329–337.

Bush, T.G., Puvanachandra, N., Horner, C.H., Polito, A., Ostenfeld, T., Svendsen, C.N., Mucke, L., Johnson, M.H., and Sofroniew, M.V. (1999). Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. Neuron *23*, 297–308.

Bushnell, M.C., Duncan, G.H., and Tremblay, N. (1993). Thalamic VPM nucleus in the behaving monkey. I. Multimodal and discriminative properties of thermosensitive neurons. J. Neurophysiol. *69*, 739–752.

Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z., and Ellisman, M.H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *22*, 183–192.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin. Chem. *55*, 611–622.

Buvanendran, A., Kroin, J.S., Kari, M.R., and Tuman, K.J. (2008). A New Knee Surgery Model in Rats to Evaluate Functional Measures of Postoperative Pain: Anesth. Analg. *107*, 300–308.

C

Cahana, A., Carota, A., Montadon, M.-L., and Annoni, J.M. (2004). The long-term effect of repeated intravenous lidocaine on central pain and possible correlation in positron emission tomography measurements. Anesth. Analg. *98*, 1581–1584, table of contents.

Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg, P.A., Krupenko, S.A., et al. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *28*, 264–278.

Calvo, J.L., Carbonell, A.L., and Boya, J. (1991). Co-expression of glial fibrillary acidic protein and vimentin in reactive astrocytes following brain injury in rats. Brain Res. *566*, 333–336.

Caraceni, A., and Portenoy, R.K. (1999). An international survey of cancer pain characteristics and syndromes. IASP Task Force on Cancer Pain. International Association for the Study of Pain. Pain *82*, 263–274.

Cardoso-Cruz, H., Lima, D., and Galhardo, V. (2013). Impaired spatial memory performance in a rat model of neuropathic pain is associated with reduced hippocampus-prefrontal cortex connectivity. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *33*, 2465–2480.

Do Carmo Cunha, J., de Freitas Azevedo Levy, B., de Luca, B.A., de Andrade, M.S.R., Gomide, V.C., and Chadi, G. (2007). Responses of reactive astrocytes containing S100beta protein and fibroblast growth factor-2 in the border and in the adjacent preserved tissue after a contusion injury of the spinal cord in rats: implications for wound repair and neuroregeneration. Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc. *15*, 134–146.

Casey, K.L., Minoshima, S., Berger, K.L., Koeppe, R.A., Morrow, T.J., and Frey, K.A. (1994). Positron emission tomographic analysis of cerebral structures activated specifically by repetitive noxious heat stimuli. J. Neurophysiol. *71*, 802–807.

Casey, K.L., Minoshima, S., Morrow, T.J., and Koeppe, R.A. (1996). Comparison of human cerebral activation pattern during cutaneous warmth, heat pain, and deep cold pain. J. Neurophysiol. *76*, 571–581.

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

Cavaliere, F., Dinkel, K., and Reymann, K. (2005). Microglia response and P2 receptor participation in oxygen/glucose deprivation-induced cortical damage. Neuroscience *136*, 615–623.

Ceccatelli, S. (2004). Neural stem cells and cell death. Toxicol. Lett. *149*, 59–66.

Cerutti, S.M., and Chadi, G. (2000). S100 immunoreactivity is increased in reactive astrocytes of the visual pathways following a mechanical lesion of the rat occipital cortex. Cell Biol. Int. *24*, 35–49.

Cervero, F., and Laird, J.M. (1996). Mechanisms of allodynia: interactions between sensitive mechanoreceptors and nociceptors. Neuroreport *7*, 526–528.

Chadi, G., and Gomide, V.C. (2004). FGF-2 and S100beta immunoreactivities increase in reactive astrocytes, but not in microglia, in ascending dopamine pathways following a striatal 6-OHDA-induced partial lesion of the nigrostriatal system. Cell Biol. Int. *28*, 849–861.

Al-Chaer, E.D., Westlund, K.N., and Willis, W.D. (1997). Sensitization of postsynaptic dorsal column neuronal responses by colon inflammation. Neuroreport *8*, 3267–3273.

Al-Chaer, E.D., Feng, Y., and Willis, W.D. (1998). A role for the dorsal column in nociceptive visceral input into the thalamus of primates. J. Neurophysiol. *79*, 3143–3150.

Charles, K.J., Deuchars, J., Davies, C.H., and Pangalos, M.N. (2003). GABA B receptor subunit expression in glia. Mol. Cell. Neurosci. *24*, 214–223.

Chesler, E.J., Wilson, S.G., Lariviere, W.R., Rodriguez-Zas, S.L., and Mogil, J.S. (2002). Identification and ranking of genetic and laboratory environment factors influencing a behavioral trait, thermal nociception, via computational analysis of a large data archive. Neurosci. Biobehav. Rev. *26*, 907–923.

Chiang, C.S., Stalder, A., Samimi, A., and Campbell, I.L. (1994). Reactive gliosis as a consequence of interleukin-6 expression in the brain: studies in transgenic mice. Dev. Neurosci. *16*, 212–221.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. *162*, 156–159.

Choucair-Jaafar, N., Laporte, V., Levy, R., Poindron, P., Lombard, Y., and Gies, J.-P. (2011). Complement receptor 3 (CD11b/CD18) is implicated in the elimination of β-amyloid peptides. Fundam. Clin. Pharmacol. *25*, 115–122.

Christopherson, K.S., Ullian, E.M., Stokes, C.C.A., Mullowney, C.E., Hell, J.W., Agah, A., Lawler, J., Mosher, D.F., Bornstein, P., and Barres, B.A. (2005). Thrombospondins Are Astrocyte-Secreted Proteins that Promote CNS Synaptogenesis. Cell *120*, 421–433.

Chuang, H.H., Prescott, E.D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S.E., Basbaum, A.I., Chao, M.V., and Julius, D. (2001). Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. Nature *411*, 957–962.

Chung, W.-S., Clarke, L.E., Wang, G.X., Stafford, B.K., Sher, A., Chakraborty, C., Joung, J., Foo, L.C., Thompson, A., Chen, C., et al. (2013). Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. Nature *504*, 394–400.

Clark, A.K., and Malcangio, M. (2012). Microglial signalling mechanisms: Cathepsin S and Fractalkine. Exp. Neurol. *234*, 283–292.

Clark, A.K., Yip, P.K., Grist, J., Gentry, C., Staniland, A.A., Marchand, F., Dehvari, M., Wotherspoon, G., Winter, J., Ullah, J., et al. (2007). Inhibition of spinal microglial cathepsin S for the reversal of neuropathic pain. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 10655–10660.

Clark, A.K., Yip, P.K., and Malcangio, M. (2009). The liberation of fractalkine in the dorsal horn requires microglial cathepsin S. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *29*, 6945–6954.

Cliffer, K.D., Burstein, R., and Giesler, G.J. (1991). Distributions of spinothalamic, spinohypothalamic, and spinotelencephalic fibers revealed by anterograde transport of PHA-L in rats. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *11*, 852–868.

Coco, S., Calegari, F., Pravettoni, E., Pozzi, D., Taverna, E., Rosa, P., Matteoli, M., and Verderio, C. (2003). Storage and Release of ATP from Astrocytes in Culture. J. Biol. Chem. *278*, 1354–1362.

Codeluppi, S., Svensson, C.I., Hefferan, M.P., Valencia, F., Silldorff, M.D., Oshiro, M., Marsala, M., and Pasquale, E.B. (2009). The Rheb-mTOR pathway is upregulated in reactive astrocytes of the injured spinal cord. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *29*, 1093–1104.

Coffield, J.A., Bowen, K.K., and Miletic, V. (1992). Retrograde tracing of projections between the nucleus submedius, the ventrolateral orbital cortex, and the midbrain in the rat. J. Comp. Neurol. *321*, 488–499.

Coghill, R.C., Talbot, J.D., Evans, A.C., Meyer, E., Gjedde, A., Bushnell, M.C., and Duncan, G.H. (1994). Distributed processing of pain and vibration by the human brain. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *14*, 4095–4108.

Coghill, R.C., Sang, C.N., Maisog, J.M., and Iadarola, M.J. (1999). Pain intensity processing within the human brain: a bilateral, distributed mechanism. J. Neurophysiol. *82*, 1934–1943.

Colburn, R.W., Rickman, A.J., and DeLeo, J.A. (1999). The effect of site and type of nerve injury on spinal glial activation and neuropathic pain behavior. Exp. Neurol. *157*, 289–304.

Corbi, A.L., Larson, R.S., Kishimoto, T.K., Springer, T.A., and Morton, C.C. (1988a). Chromosomal location of the genes encoding the leukocyte adhesion receptors LFA-1, Mac-1 and p150,95. Identification of a gene cluster involved in cell adhesion. J. Exp. Med. *167*, 1597–1607.

Corbi, A.L., Kishimoto, T.K., Miller, L.J., and Springer, T.A. (1988b). The human leukocyte adhesion glycoprotein Mac-1 (complement receptor type 3, CD11b) alpha subunit. Cloning, primary structure, and relation to the integrins, von Willebrand factor and factor B. J. Biol. Chem. *263*, 12403–12411.

Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, M.S., and Smith, S.J. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. Science *247*, 470–473.

La Cour, P., and Petersen, M. (2014). Effects of Mindfulness Meditation on Chronic Pain: A Randomized Controlled Trial. Pain Med. Malden Mass.

Craig, A.D.' B.' (2006). Retrograde analyses of spinothalamic projections in the macaque monkey: input to ventral posterior nuclei. J. Comp. Neurol. *499*, 965–978.

Craig, A.D.B. (2014). Topographically organized projection to posterior insular cortex from the posterior portion of the ventral medial nucleus in the long-tailed macaque monkey. J. Comp. Neurol. *522*, 36–63.

Craig, A.D. "Bud," and Zhang, E.-T. (2006). Retrograde analyses of spinothalamic projections in the macaque monkey: input to posterolateral thalamus. J. Comp. Neurol. *499*, 953–964.

Cramer, H., Lauche, R., Haller, H., Langhorst, J., Dobos, G., and Berger, B. (2013). "I'm more in balance": a qualitative study of yoga for patients with chronic neck pain. J. Altern. Complement. Med. N. Y. N *19*, 536–542.

D

Dado, R.J., Katter, J.T., and Giesler, G.J. (1994). Spinothalamic and spinohypothalamic tract neurons in the cervical enlargement of rats. I. Locations of antidromically identified axons in the thalamus and hypothalamus. J. Neurophysiol. *71*, 959–980.

D'Ambrosio, R., Wenzel, J., Schwartzkroin, P.A., McKhann, G.M., and Janigro, D. (1998). Functional specialization and topographic segregation of hippocampal astrocytes. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *18*, 4425–4438.

D'Antoni, S., Berretta, A., Bonaccorso, C.M., Bruno, V., Aronica, E., Nicoletti, F., and Catania, M.V. (2008). Metabotropic glutamate receptors in glial cells. Neurochem. Res. *33*, 2436–2443.

Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., and Gan, W.-B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. Nat. Neurosci. *8*, 752–758.

Davis, K.D., Kiss, Z.H., Tasker, R.R., and Dostrovsky, J.O. (1996). Thalamic stimulation-evoked sensations in chronic pain patients and in nonpain (movement disorder) patients. J. Neurophysiol. *75*, 1026–1037.

Davis, K.D., Taylor, S.J., Crawley, A.P., Wood, M.L., and Mikulis, D.J. (1997). Functional MRI of pain- and attention-related activations in the human cingulate cortex. J. Neurophysiol. *77*, 3370–3380.

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

Dehaene, S., Naccache, L., Cohen, L., Bihan, D.L., Mangin, J.F., Poline, J.B., and Rivière, D. (2001). Cerebral mechanisms of word masking and unconscious repetition priming. Nat. Neurosci. *4*, 752–758.

Dehaene, S., Changeux, J.-P., Naccache, L., Sackur, J., and Sergent, C. (2006). Conscious, preconscious, and subliminal processing: a testable taxonomy. Trends Cogn. Sci. *10*, 204–211.

Deiber, M.P., Passingham, R.E., Colebatch, J.G., Friston, K.J., Nixon, P.D., and Frackowiak, R.S. (1991). Cortical areas and the selection of movement: a study with positron emission tomography. Exp. Brain Res. *84*, 393–402.

Déjerine J. et Roussy G. Le syndrome thalamique. Rev. Neurol. (Paris) 1906, *14*: 521-32

Dermietzel, R., Hertberg, E.L., Kessler, J.A., and Spray, D.C. (1991). Gap junctions between cultured astrocytes: immunocytochemical, molecular, and electrophysiological analysis. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *11*, 1421–1432.

Van Der Zee, E.A., De Jong, G.I., Strosberg, A.D., and Luiten, P.G. (1993). Muscarinic acetylcholine receptor-expression in astrocytes in the cortex of young and aged rats. Glia *8*, 42–50.

Desouza, D.D., Moayedi, M., Chen, D.Q., Davis, K.D., and Hodaie, M. (2013). Sensorimotor and Pain Modulation Brain Abnormalities in Trigeminal Neuralgia: A Paroxysmal, Sensory-Triggered Neuropathic Pain. PloS One *8*, e66340.

Detloff, M.R., Fisher, L.C., McGaughy, V., Longbrake, E.E., Popovich, P.G., and Basso, D.M. (2008). Remote activation of microglia and pro-inflammatory cytokines predict the onset and severity of below-level neuropathic pain after spinal cord injury in rats. Exp. Neurol. *212*, 337–347.

Dinh, M.L., Koppel, S.J., Korn, M.J., and Cramer, K.S. (2014). Distribution of glial cells in the auditory brainstem: Normal development and effects of unilateral lesion. Neuroscience *278*, 237–252.

Domercq, M., Brambilla, L., Pilati, E., Marchaland, J., Volterra, A., and Bezzi, P. (2006). P2Y1 receptor-evoked glutamate exocytosis from astrocytes: control by tumor necrosis factor-alpha and prostaglandins. J. Biol. Chem. *281*, 30684–30696.

Domercq, M., Sanchez-Gomez, M.V., Sherwin, C., Etxebarria, E., Fern, R., and Matute, C. (2007). System xc- and Glutamate Transporter Inhibition Mediates Microglial Toxicity to Oligodendrocytes. J. Immunol. *178*, 6549–6556.

Dong, W.K., Ryu, H., and Wagman, I.H. (1978). Nociceptive responses of neurons in medial thalamus and their relationship to spinothalamic pathways. J. Neurophysiol. *41*, 1592–1613.

Ducourneau V., " Réactivité gliale et transmission glutamatergique/glycinergique spinale dans un modèle de douleur cancéreuse osseuse chez le rat : approches comportementale, immunohistochimique, moléculaire et biochimique", Doctorat en biologie, option neurosciences sous la direction du professeur Fenelon V., Bordeaux, Université Bordeaux II, 2013.

Ducourneau, V.R.R., Dolique, T., Hachem-Delaunay, S., Miraucourt, L.S., Amadio, A., Blaszczyk, L., Jacquot, F., Ly, J., Devoize, L., Oliet, S.H.R., et al. (2014). Cancer pain is not necessarily correlated with spinal overexpression of reactive glia markers. Pain *155*, 275–291.

Duggal, N., Schmidt-Kastner, R., and Hakim, A.M. (1997). Nestin expression in reactive astrocytes following focal cerebral ischemia in rats. Brain Res. *768*, 1–9.

Duncan, G.H., Kupers, R.C., Marchand, S., Villemure, J.G., Gybels, J.M., and Bushnell, M.C. (1998). Stimulation of human thalamus for pain relief: possible modulatory circuits revealed by positron emission tomography. J. Neurophysiol. *80*, 3326–3330.

E

Ebisu, T., Rooney, W.D., Graham, S.H., Weiner, M.W., and Maudsley, A.A. (1994). N-acetylaspartate as an in vivo marker of neuronal viability in kainate-induced status epilepticus: 1H magnetic resonance spectroscopic imaging. J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab. *14*, 373–382.

Edwards, M.M., and Robinson, S.R. (2006). TNF alpha affects the expression of GFAP and S100B: implications for Alzheimer's disease. J. Neural Transm. Vienna Austria 1996 *113*, 1709–1715.

Eichhoff, G., Brawek, B., and Garaschuk, O. (2011). Microglial calcium signal acts as a rapid sensor of single neuron damage in vivo. Biochim. Biophys. Acta *1813*, 1014–1024.

Eickhoff, S.B., Schleicher, A., Zilles, K., and Amunts, K. (2006). The human parietal operculum. I. Cytoarchitectonic mapping of subdivisions. Cereb. Cortex N. Y. N 1991 *16*, 254–267.

Ekdahl, C.T., Claasen, J.-H., Bonde, S., Kokaia, Z., and Lindvall, O. (2003). Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 13632–13637.

Van Eldik, L.J., Christie-Pope, B., Bolin, L.M., Shooter, E.M., and Whetsell, W.O. (1991). Neurotrophic activity of S-100 beta in cultures of dorsal root ganglia from embryonic chick and fetal rat. Brain Res. *542*, 280–285.

Eng, L.F., Vanderhaeghen, J.J., Bignami, A., and Gerstl, B. (1971). An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. Brain Res. *28*, 351–354.

Etkin, A., Egner, T., and Kalisch, R. (2011). Emotional processing in anterior cingulate and medial prefrontal cortex. Trends Cogn. Sci. *15*, 85–93.

F

Faff, L., Ohlemeyer, C., and Kettenmann, H. (1996). Intracellular pH regulation in cultured microglial cells from mouse brain. J. Neurosci. Res. *46*, 294–304.

Faulkner, J.R. (2004). Reactive Astrocytes Protect Tissue and Preserve Function after Spinal Cord Injury. J. Neurosci. *24*, 2143–2155.

Favereaux, A., Thoumine, O., Bouali-Benazzouz, R., Roques, V., Papon, M.-A., Salam, S.A., Drutel, G., Léger, C., Calas, A., Nagy, F., et al. (2011). Bidirectional integrative regulation of Cav1.2 calcium channel by microRNA miR-103: role in pain. EMBO J. *30*, 3830–3841.

Flaherty, S.F., Golenbock, D.T., Milham, F.H., and Ingalls, R.R. (1997). CD11/CD18 Leukocyte Integrins: New Signaling Receptors for Bacterial Endotoxin. J. Surg. Res. *73*, 85–89.

Fonnum, F., Johnsen, A., and Hassel, B. (1997). Use of fluorocitrate and fluoroacetate in the study of brain metabolism. Glia *21*, 106–113.

Fonseca, C.G., Green, C.R., and Nicholson, L.F.B. (2002). Upregulation in astrocytic connexin 43 gap junction levels may exacerbate generalized seizures in mesial temporal lobe epilepsy. Brain Res. *929*, 105–116.

Fossat, P., Dobremez, E., Bouali-Benazzouz, R., Favereaux, A., Bertrand, S.S., Kilk, K., Léger, C., Cazalets, J.-R., Langel, U., Landry, M., et al. (2010). Knockdown of L calcium channel subtypes: differential effects in neuropathic pain. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *30*, 1073–1085.

Frade, J.M., and Barde, Y.A. (1998). Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. Neuron *20*, 35–41.

Francis, J.T., Xu, S., and Chapin, J.K. (2008). Proprioceptive and cutaneous representations in the rat ventral posterolateral thalamus. J. Neurophysiol. *99*, 2291–2304.

Franke, H., Grosche, J., Schädlich, H., Krügel, U., Allgaier, C., and Illes, P. (2001). P2X receptor expression on astrocytes in the nucleus accumbens of rats. Neuroscience *108*, 421–429.

Freilich, R.W., Woodbury, M.E., and Ikezu, T. (2013). Integrated expression profiles of mRNA and miRNA in polarized primary murine microglia. PloS One *8*, e79416.

Friedman, W.J., Black, I.B., and Kaplan, D.R. (1998). Distribution of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/5 in the postnatal rat brain: an immunocytochemical study. Neuroscience *84*, 101–114.

Frisén, J., Risling, M., and Fried, K. (1993). Distribution and axonal relations of macrophages in a neuroma. Neuroscience *55*, 1003–1013.

Fukumoto, M., Ushida, T., Zinchuk, V.S., Yamamoto, H., and Yoshida, S. (1999). Contralateral thalamic perfusion in patients with reflex sympathetic dystrophy syndrome. Lancet *354*, 1790–1791.

Fukushima, T., and Kerr, F.W. (1979). Organization of trigeminothalamic tracts and other thalamic afferent systems of the brainstem in the rat: presence of gelatinosa neurons with thalamic connections. J. Comp. Neurol. *183*, 169–184.

G

Galan, A., Laird, J.M.A., and Cervero, F. (2004). In vivo recruitment by painful stimuli of AMPA receptor subunits to the plasma membrane of spinal cord neurons: Pain *112*, 315–323.

Gallo, V., Suergiu, R., and Levi, G. (1986). Kainic acid stimulates GABA release from a subpopulation of cerebellar astrocytes. Eur. J. Pharmacol. *132*, 319–322.

Gao, Y.-J., Zhang, L., Samad, O.A., Suter, M.R., Yasuhiko, K., Xu, Z.-Z., Park, J.-Y., Lind, A.-L., Ma, Q., and Ji, R.-R. (2009). JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *29*, 4096–4108.

Gao, Y.-J., Zhang, L., and Ji, R.-R. (2010). Spinal injection of TNF-α-activated astrocytes produces persistent pain symptom mechanical allodynia by releasing monocyte chemoattractant protein-1. Glia *58*, 1871–1880.

Garcia-Larrea, L. (2012). The posterior insular-opercular region and the search of a primary cortex for pain. Neurophysiol. Clin. Neurophysiol. *42*, 299–313.

García-Larrea, L., Peyron, R., Mertens, P., Gregoire, M.C., Lavenne, F., Le Bars, D., Convers, P., Mauguière, F., Sindou, M., and Laurent, B. (1999). Electrical stimulation of motor cortex for pain control: a combined PET-scan and electrophysiological study. Pain *83*, 259–273.

Gard, T., Holzel, B.K., Sack, A.T., Hempel, H., Lazar, S.W., Vaitl, D., and Ott, U. (2012). Pain Attenuation through Mindfulness is Associated with Decreased Cognitive Control and Increased Sensory Processing in the Brain. Cereb. Cortex *22*, 2692–2702.

Garrison, C.J., Dougherty, P.M., Kajander, K.C., and Carlton, S.M. (1991). Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. Brain Res. *565*, 1–7.

Gauriau, C., and Bernard, J.-F. (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.

Gautron, M., Jazat, F., Ratinahirana, H., Hauw, J.J., and Guilbaud, G. (1990). Alterations in myelinated fibres in the sciatic nerve of rats after constriction: possible relationships between the presence of abnormal small myelinated fibres and pain-related behaviour. Neurosci. Lett. *111*, 28–33.

Gerke, M.B., Duggan, A.W., Xu, L., and Siddall, P.J. (2003). Thalamic neuronal activity in rats with mechanical allodynia following contusive spinal cord injury. Neuroscience *117*, 715–722.

Giaume, C., Koulakoff, A., Roux, L., Holcman, D., and Rouach, N. (2010). Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. Nat. Rev. Neurosci. *11*, 87–99.

Giesler, G.J., Menétrey, D., Guilbaud, G., and Besson, J.M. (1976). Lumbar cord neurons at the origin of the spinothalamic tract in the rat. Brain Res. *118*, 320–324.

Giesler, G.J., Menétrey, D., and Basbaum, A.I. (1979). Differential origins of spinothalamic tract projections to medial and lateral thalamus in the rat. J. Comp. Neurol. *184*, 107–126.

Giesler, G.J., Spiel, H.R., and Willis, W.D. (1981). Organization of spinothalamic tract axons within the rat spinal cord. J. Comp. Neurol. *195*, 243–252.

Giesler, G.J., Nahin, R.L., and Madsen, A.M. (1984). Postsynaptic dorsal column pathway of the rat. I. Anatomical studies. J. Neurophysiol. *51*, 260–275.

Giesler, G.J., Björkeland, M., Xu, Q., and Grant, G. (1988). Organization of the spinocervicothalamic pathway in the rat. J. Comp. Neurol. *268*, 223–233.

Giesler, G.J., Katter, J.T., and Dado, R.J. (1994). Direct spinal pathways to the limbic system for nociceptive information. Trends Neurosci. *17*, 244–250.

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. Science *330*, 841–845.

Godinho, F., Magnin, M., Frot, M., Perchet, C., and Garcia-Larrea, L. (2006). Emotional modulation of pain: is it the sensation or what we recall? J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *26*, 11454–11461.

Godinho, F., Frot, M., Perchet, C., Magnin, M., and Garcia-Larrea, L. (2008). Pain influences hedonic assessment of visual inputs. Eur. J. Neurosci. *27*, 2219–2228.

Godinho, F., Faillenot, I., Perchet, C., Frot, M., Magnin, M., and Garcia-Larrea, L. (2012). How the pain of others enhances our pain: searching the cerebral correlates of "compassional hyperalgesia." Eur. J. Pain Lond. Engl. *16*, 748–759.

Gold, M.S., Reichling, D.B., Shuster, M.J., and Levine, J.D. (1996). Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na+ current in nociceptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *93*, 1108–1112.

Goldshmit, Y., Galea, M.P., Wise, G., Bartlett, P.F., and Turnley, A.M. (2004). Axonal regeneration and lack of astrocytic gliosis in EphA4-deficient mice. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *24*, 10064–10073.

Graeber, M.B., Streit, W.J., and Kreutzberg, G.W. (1988a). Axotomy of the rat facial nerve leads to increased CR3 complement receptor expression by activated microglial cells. J. Neurosci. Res. *21*, 18–24.

Graeber, M.B., Tetzlaff, W., Streit, W.J., and Kreutzberg, G.W. (1988b). Microglial cells but not astrocytes undergo mitosis following rat facial nerve axotomy. Neurosci. Lett. *85*, 317–321.

Grafton, S.T., Mazziotta, J.C., Woods, R.P., and Phelps, M.E. (1992). Human functional anatomy of visually guided finger movements. Brain J. Neurol. *115 (Pt 2)*, 565–587.

Grant, J.A., and Rainville, P. (2009). Pain sensitivity and analgesic effects of mindful states in Zen meditators: a cross-sectional study. Psychosom. Med. *71*, 106–114.

Grant, J.A., Courtemanche, J., Duerden, E.G., Duncan, G.H., and Rainville, P. (2010). Cortical thickness and pain sensitivity in zen meditators. Emot. Wash. DC *10*, 43–53.

Grant, J.A., Courtemanche, J., and Rainville, P. (2011). A non-elaborative mental stance and decoupling of executive and pain-related cortices predicts low pain sensitivity in Zen meditators: Pain *152*, 150–156.

Greenspan, J.D., Lee, R.R., and Lenz, F.A. (1999). Pain sensitivity alterations as a function of lesion location in the parasylvian cortex. Pain *81*, 273–282.

Gruner, J.A. (1992). A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. J. Neurotrauma *9*, 123–126; discussion 126–128.

Guilbaud, G., Peschanski, M., Gautron, M., and Binder, D. (1980). Neurones responding to noxious stimulation in VB complex and caudal adjacent regions in the thalamus of the rat. Pain *8*, 303–318.

Guilbaud, G., Benoist, J.M., Jazat, F., and Gautron, M. (1990). Neuronal responsiveness in the ventrobasal thalamic complex of rats with an experimental peripheral mononeuropathy. J. Neurophysiol. *64*, 1537–1554.

Guilbaud, G., Benoist, J.M., Levante, A., Gautron, M., and Willer, J.C. (1992). Primary somatosensory cortex in rats with pain-related behaviours due to a peripheral mononeuropathy after moderate ligation of one sciatic nerve: neuronal responsivity to somatic stimulation. Exp. Brain Res. *92*, 227–245.

Guillery, R.W., Feig, S.L., and Lozsádi, D.A. (1998). Paying attention to the thalamic reticular nucleus. Trends Neurosci. *21*, 28–32.

Gustin, S.M., Peck, C.C., Wilcox, S.L., Nash, P.G., Murray, G.M., and Henderson, L.A. (2011). Different pain, different brain: thalamic anatomy in neuropathic and non-neuropathic chronic pain syndromes. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *31*, 5956–5964.

Gustin, S.M., Wrigley, P.J., Youssef, A.M., McIndoe, L., Wilcox, S.L., Rae, C.D., Edden, R.A.E., Siddall, P.J., and Henderson, L.A. (2014). Thalamic activity and biochemical changes in individuals with neuropathic pain after spinal cord injury: Pain *155*, 1027–1036.

Guthrie, P.B., Knappenberger, J., Segal, M., Bennett, M.V., Charles, A.C., and Kater, S.B. (1999). ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *19*, 520–528.

Gybels, J.M., and Sweet, W.H. (1989). Neurosurgical treatment of persistent pain. Physiological and pathological mechanisms of human pain. Pain Headache *11*, 1–402.

H

Hachem, S., Aguirre, A., Vives, V., Marks, A., Gallo, V., and Legraverend, C. (2005). Spatial and temporal expression of S100B in cells of oligodendrocyte lineage. Glia *51*, 81–97.

Hagino, Y., Kariura, Y., Manago, Y., Amano, T., Wang, B., Sekiguchi, M., Nishikawa, K., Aoki, S., Wada, K., and Noda, M. (2004). Heterogeneity and potentiation of AMPA type of glutamate receptors in rat cultured microglia. Glia *47*, 68–77.

Haglid, K.G., Hamberger, A., Hansson, H.A., Hydén, H., Persson, L., and Rönnbäck, L. (1976). Cellular and subcellular distribution of the S-100 protein in rabbit and rat central nervous system. J. Neurosci. Res. *2*, 175–191.

Hains, B.C., Saab, C.Y., and Waxman, S.G. (2005). Changes in electrophysiological properties and sodium channel Nav1.3 expression in thalamic neurons after spinal cord injury. Brain J. Neurol. *128*, 2359–2371.

Hains, B.C., Saab, C.Y., and Waxman, S.G. (2006). Alterations in burst firing of thalamic VPL neurons and reversal by Na(v)1.3 antisense after spinal cord injury. J. Neurophysiol. *95*, 3343–3352.

Dib-Hajj, S.D., Cummins, T.R., Black, J.A., and Waxman, S.G. (2007). From genes to pain: Na v 1.7 and human pain disorders. Trends Neurosci. *30*, 555–563.

Halassa, M.M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J.-H., and Haydon, P.G. (2007). Synaptic Islands Defined by the Territory of a Single Astrocyte. J. Neurosci. *27*, 6473–6477.

Hald, A., Nedergaard, S., Hansen, R.R., Ding, M., and Heegaard, A.-M. (2009). Differential activation of spinal cord glial cells in murine models of neuropathic and cancer pain. Eur. J. Pain *13*, 138–145.

Hanisch, U.-K. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. Glia *40*, 140–155.

Hanisch, U.-K., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nat. Neurosci. *10*, 1387–1394.

Haque, T., Yamamoto, S., Masuda, Y., Kato, T., Sato, F., Uchino, K., Oka, A., Nakamura, M., Takeda, R., Ono, T., et al. (2010). Thalamic afferent and efferent connectivity to cerebral cortical areas with direct projections to identified subgroups of trigeminal premotoneurons in the rat. Brain Res. *1346*, 69–82.

Harrison, J.K., Jiang, Y., Chen, S., Xia, Y., Maciejewski, D., McNamara, R.K., Streit, W.J., Salafranca, M.N., Adhikari, S., Thompson, D.A., et al. (1998). Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *95*, 10896–10901.

Hassel, B., Paulsen, R.E., Johnsen, A., and Fonnum, F. (1992). Selective inhibition of glial cell metabolism in vivo by fluorocitrate. Brain Res. *576*, 120–124.

Haupt, C., Witte, O.W., and Frahm, C. (2007). Up-regulation of Connexin43 in the glial scar following photothrombotic ischemic injury. Mol. Cell. Neurosci. *35*, 89–99.

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

Hazell, A.S., Sheedy, D., Oanea, R., Aghourian, M., Sun, S., Jung, J.Y., Wang, D., and Wang, C. (2010). Loss of astrocytic glutamate transporters in Wernicke encephalopathy. Glia *58*, 148–156.

Van der Heiden, L., Scherpiet, S., Konicar, L., Birbaumer, N., and Veit, R. (2013). Inter-individual differences in successful perspective taking during pain perception mediates emotional responsiveness in self and others: An fMRI study. NeuroImage *65*, 387–394.

Henderson, L.A., Peck, C.C., Petersen, E.T., Rae, C.D., Youssef, A.M., Reeves, J.M., Wilcox, S.L., Akhter, R., Murray, G.M., and Gustin, S.M. (2013). Chronic pain: lost inhibition? J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *33*, 7574–7582.

Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S.H.R., and Rusakov, D.A. (2010). Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. Nature *463*, 232–236.

Herculano-Houzel, S., and Lent, R. (2005). Isotropic fractionator: a simple, rapid method for the quantification of total cell and neuron numbers in the brain. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *25*, 2518–2521.

Herzog, H., Lele, V.R., Kuwert, T., Langen, K.J., Rota Kops, E., and Feinendegen, L.E. (1990). Changed pattern of regional glucose metabolism during yoga meditative relaxation. Neuropsychobiology *23*, 182–187.

Hesketh, J., and Baudier, J. (1986). Evidence that S100 proteins regulate microtubule assembly and stability in rat brain extracts. Int. J. Biochem. *18*, 691–695.

Hide, I., Tanaka, M., Inoue, A., Nakajima, K., Kohsaka, S., Inoue, K., and Nakata, Y. (2000). Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor-alpha release from rat microglia. J. Neurochem. *75*, 965–972.

Hirasawa, T., Ohsawa, K., Imai, Y., Ondo, Y., Akazawa, C., Uchino, S., and Kohsaka, S. (2005). Visualization of microglia in living tissues using Iba1-EGFP transgenic mice. J. Neurosci. Res. *81*, 357–362.

Hirato, M., Watanabe, K., Takahashi, A., Hayase, N., Horikoshi, S., Shibasaki, T., and Ohye, C. (1994). Pathophysiology of central (thalamic) pain: combined change of sensory thalamus with cerebral cortex around central sulcus. Stereotact. Funct. Neurosurg. *62*, 300–303.

Hirayama, T., Dostrovsky, J.O., Gorecki, J., Tasker, R.R., and Lenz, F.A. (1989). Recordings of abnormal activity in patients with deafferentation and central pain. Stereotact. Funct. Neurosurg. *52*, 120–126.

Hirshberg, R.M., Al-Chaer, E.D., Lawand, N.B., Westlund, K.N., and Willis, W.D. (1996). Is there a pathway in the posterior funiculus that signals visceral pain? Pain *67*, 291–305.

Hofstetter, C.P., Schweinhardt, P., Klason, T., Olson, L., and Spenger, C. (2003). Numb rats walk - a behavioural and fMRI comparison of mild and moderate spinal cord injury. Eur. J. Neurosci. *18*, 3061–3068.

Hölzel, B.K., Ott, U., Hempel, H., Hackl, A., Wolf, K., Stark, R., and Vaitl, D. (2007). Differential engagement of anterior cingulate and adjacent medial frontal cortex in adept meditators and non-meditators. Neurosci. Lett. *421*, 16–21.

Hölzel, B.K., Carmody, J., Vangel, M., Congleton, C., Yerramsetti, S.M., Gard, T., and Lazar, S.W. (2011). Mindfulness practice leads to increases in regional brain gray matter density. Psychiatry Res. *191*, 36–43.

Honore, P., Rogers, S.D., Schwei, M.J., Salak-Johnson, J.L., Luger, N.M., Sabino, M.C., Clohisy, D.R., and Mantyh, P.W. (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.

Hoover, W.B., and Vertes, R.P. (2007). Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. Brain Struct. Funct. *212*, 149–179.

Horie, H., Sakai, I., Akahori, Y., and Kadoya, T. (1997). IL-1 beta enhances neurite regeneration from transected-nerve terminals of adult rat DRG. Neuroreport *8*, 1955–1959.

Hoshi, A., Yamamoto, T., Shimizu, K., Sugiura, Y., and Ugawa, Y. (2011). Chemical preconditioning-induced reactive astrocytosis contributes to the reduction of post-ischemic edema through aquaporin-4 downregulation. Exp. Neurol. *227*, 89–95.

Hösli, E., and Hösli, L. (1984). Autoradiographic localization of binding sites for [3H]histamine and H1- and H2-antagonists on cultured neurones and glial cells. Neuroscience *13*, 863–870.

Hosobuchi, Y. (1986). Subcortical electrical stimulation for control of intractable pain in humans. Report of 122 cases (1970-1984). J. Neurosurg. *64*, 543–553.

Houades, V., Koulakoff, A., Ezan, P., Seif, I., and Giaume, C. (2008). Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *28*, 5207–5217.

Houghton, A.K., Wang, C.C., and Westlund, K.N. (2001). Do nociceptive signals from the pancreas travel in the dorsal column? Pain *89*, 207–220.

Hsieh, J.C., Hägermark, O., Ståhle-Bäckdahl, M., Ericson, K., Eriksson, L., Stone-Elander, S., and Ingvar, M. (1994). Urge to scratch represented in the human cerebral cortex during itch. J. Neurophysiol. *72*, 3004–3008.

Hsieh, J.C., Belfrage, M., Stone-Elander, S., Hansson, P., and Ingvar, M. (1995). Central representation of chronic ongoing neuropathic pain studied by positron emission tomography. Pain *63*, 225–236.

Hu, J., and Van Eldik, L.J. (1996). S100 beta induces apoptotic cell death in cultured astrocytes via a nitric oxide-dependent pathway. Biochim. Biophys. Acta *1313*, 239–245.

Hu, J., and Van Eldik, L.J. (1999). Glial-derived proteins activate cultured astrocytes and enhance beta amyloid-induced glial activation. Brain Res. *842*, 46–54.

Hu, J., Castets, F., Guevara, J.L., and Van Eldik, L.J. (1996). S100 beta stimulates inducible nitric oxide synthase activity and mRNA levels in rat cortical astrocytes. J. Biol. Chem. *271*, 2543–2547.

Hu, J., Ferreira, A., and Van Eldik, L.J. (1997). S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. J. Neurochem. *69*, 2294–2301.

Hubbard, C.S., Khan, S.A., Xu, S., Cha, M., Masri, R., and Seminowicz, D.A. (2015). Behavioral, metabolic and functional brain changes in a rat model of chronic neuropathic pain: A longitudinal MRI study. NeuroImage *107*, 333–344.

Huttunen, H.J., Kuja-Panula, J., Sorci, G., Agneletti, A.L., Donato, R., and Rauvala, H. (2000). Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. J. Biol. Chem. *275*, 40096–40105.

I

Iadarola, M.J., Max, M.B., Berman, K.F., Byas-Smith, M.G., Coghill, R.C., Gracely, R.H., and Bennett, G.J. (1995). Unilateral decrease in thalamic activity observed with positron emission tomography in patients with chronic neuropathic pain. Pain *63*, 55–64.

Imai, Y., Ibata, I., Ito, D., Ohsawa, K., and Kohsaka, S. (1996). A novel gene iba1 in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. Biochem. Biophys. Res. Commun. *224*, 855–862.

Inoue, K. (2006). The function of microglia through purinergic receptors: neuropathic pain and cytokine release. Pharmacol. Ther. *109*, 210–226.

Inquimbert, P., Bartels, K., Babaniyi, O.B., Barrett, L.B., Tegeder, I., and Scholz, J. (2012). Peripheral nerve injury produces a sustained shift in the balance between glutamate release and uptake in the dorsal horn of the spinal cord. Pain *153*, 2422–2431.

Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., and Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. Brain Res. Mol. Brain Res. *57*, 1–9.

Ives-Deliperi, V.L., Solms, M., and Meintjes, E.M. (2011). The neural substrates of mindfulness: an fMRI investigation. Soc. Neurosci. *6*, 231–242.

Iwama, S., Sugimura, Y., Suzuki, H., Suzuki, H., Murase, T., Ozaki, N., Nagasaki, H., Arima, H., Murata, Y., Sawada, M., et al. (2011). Time-dependent changes in proinflammatory and neurotrophic responses of microglia and astrocytes in a rat model of osmotic demyelination syndrome. Glia *59*, 452–462.

Iwata, K., Kenshalo, D.R., Dubner, R., and Nahin, R.L. (1992). Diencephalic projections from the superficial and deep laminae of the medullary dorsal horn in the rat. J. Comp. Neurol. *321*, 404–420.

Iwata, M., LeBlanc, B.W., Kadasi, L.M., Zerah, M.L., Cosgrove, R.G., and Saab, C.Y. (2011). High-frequency stimulation in the ventral posterolateral thalamus reverses electrophysiologic changes and hyperalgesia in a rat model of peripheral neuropathic pain. Pain *152*, 2505–2513.

J

Jack, C.S., Arbour, N., Manusow, J., Montgrain, V., Blain, M., McCrea, E., Shapiro, A., and Antel, J.P. (2005). TLR Signaling Tailors Innate Immune Responses in Human Microglia and Astrocytes. J. Immunol. *175*, 4320–4330.

Jeanmonod, D., Magnin, M., and Morel, A. (1993). Thalamus and neurogenic pain: physiological, anatomical and clinical data. Neuroreport *4*, 475–478.

Jeanmonod, D., Magnin, M., and Morel, A. (1994). Chronic neurogenic pain and the medial thalamotomy. Schweiz. Rundsch. Für Med. Prax. Rev. Suisse Médecine Prax. *83*, 702–707.

Jeanmonod, D., Magnin, M., and Morel, A. (1996). Low-threshold calcium spike bursts in the human thalamus. Common physiopathology for sensory, motor and limbic positive symptoms. Brain J. Neurol. *119 (Pt 2)*, 363–375.

Jeanmonod, D., Werner, B., Morel, A., Michels, L., Zadicario, E., Schiff, G., and Martin, E. (2012). Transcranial magnetic resonance imaging-guided focused ultrasound: noninvasive central lateral thalamotomy for chronic neuropathic pain. Neurosurg. Focus *32*, E1.

Ji, R.-R., Samad, T.A., Jin, S.-X., Schmoll, R., and Woolf, C.J. (2002). p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. Neuron *36*, 57–68.

Jiang, H., Fang, D., Kong, L.-Y., Jin, Z.-R., Cai, J., Kang, X.-J., Wan, Y., and Xing, G.-G. (2014). Sensitization of neurons in the central nucleus of the amygdala via the decreased GABAergic inhibition contributes to the development of neuropathic pain-related anxiety-like behaviors in rats. Mol. Brain *7*, 72.

Jones, E.G., and Pons, T.P. (1998). Thalamic and brainstem contributions to large-scale plasticity of primate somatosensory cortex. Science *282*, 1121–1125.

Jones, A.K., Brown, W.D., Friston, K.J., Qi, L.Y., and Frackowiak, R.S. (1991). Cortical and subcortical localization of response to pain in man using positron emission tomography. Proc. Biol. Sci. *244*, 39–44.

Jourdain, P., Bergersen, L.H., Bhaukaurally, K., Bezzi, P., Santello, M., Domercq, M., Matute, C., Tonello, F., Gundersen, V., and Volterra, A. (2007). Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. Nat. Neurosci. *10*, 331–339.

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

Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M.J., Kreutzberg, G.W., Sher, A., and Littman, D.R. (2000). Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. Mol. Cell. Biol. *20*, 4106–4114.

K

Kajander, K.C., and Bennett, G.J. (1992). Onset of a painful peripheral neuropathy in rat: a partial and differential deafferentation and spontaneous discharge in A beta and A delta primary afferent neurons. J. Neurophysiol. *68*, 734–744.

Kakigi, R., Nakata, H., Inui, K., Hiroe, N., Nagata, O., Honda, M., Tanaka, S., Sadato, N., and Kawakami, M. (2005). Intracerebral pain processing in a Yoga Master who claims not to feel pain during meditation. Eur. J. Pain Lond. Engl. *9*, 581–589.

Kang, J., Jiang, L., Goldman, S.A., and Nedergaard, M. (1998). Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. Nat. Neurosci. *1*, 683–692.

Kanpolat, Y., Deda, H., Akyar, S., and Bilgiç, S. (1989). CT-guided percutaneous cordotomy. Acta Neurochir. Suppl. (Wien) *46*, 67–68.

Kassubek, J., Juengling, F.D., Els, T., Spreer, J., Herpers, M., Krause, T., Moser, E., and Lücking, C.H. (2003). Activation of a residual cortical network during painful stimulation in long-term postanoxic vegetative state: a 15O-H2O PET study. J. Neurol. Sci. *212*, 85–91.

Katayama, Y., Fukaya, C., and Yamamoto, T. (1998). Poststroke pain control by chronic motor cortex stimulation: neurological characteristics predicting a favorable response. J. Neurosurg. *89*, 585–591.

Kawamata, M., and Omote, K. (1996). Involvement of increased excitatory amino acids and intracellular Ca2+ concentration in the spinal dorsal horn in an animal model of neuropathic pain. Pain *68*, 85–96.

Kenshalo, D.R., Giesler, G.J., Leonard, R.B., and Willis, W.D. (1980). Responses of neurons in primate ventral posterior lateral nucleus to noxious stimuli. J. Neurophysiol. *43*, 1594–1614.

Kenshalo, D.R., Chudler, E.H., Anton, F., and Dubner, R. (1988). SI nociceptive neurons participate in the encoding process by which monkeys perceive the intensity of noxious thermal stimulation. Brain Res. *454*, 378–382.

Keogh, E., and Denford, S. (2009). Sex differences in perceptions of pain coping strategy usage. Eur. J. Pain Lond. Engl. *13*, 629–634.

Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., and Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. Physiol. Rev. *91*, 461–553.

Al-Khater, K.M., Kerr, R., and Todd, A.J. (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.

Khurgel, M., Koo, A.C., and Ivy, G.O. (1996). Selective ablation of astrocytes by intracerebral injections of alpha-aminoadipate. Glia *16*, 351–358.

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

Kim, S.K., and Nabekura, J. (2011). Rapid synaptic remodeling in the adult somatosensory cortex following peripheral nerve injury and its association with neuropathic pain. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *31*, 5477–5482.

Kim, S.U., and de Vellis, J. (2005). Microglia in health and disease. J. Neurosci. Res. *81*, 302–313.

Kim, D., Kim, M.A., Cho, I.-H., Kim, M.S., Lee, S., Jo, E.-K., Choi, S.-Y., Park, K., Kim, J.S., Akira, S., et al. (2007). A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity. J. Biol. Chem. *282*, 14975–14983.

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

Kim, S.H., Smith, C.J., and Van Eldik, L.J. (2004). Importance of MAPK pathways for microglial pro-inflammatory cytokine IL-1 beta production. Neurobiol. Aging *25*, 431–439.

Klein, M.A., Möller, J.C., Jones, L.L., Bluethmann, H., Kreutzberg, G.W., and Raivich, G. (1997). Impaired neuroglial activation in interleukin-6 deficient mice. Glia *19*, 227–233.

Klusáková, I., and Dubový, P. (2009). Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries - an anatomical perspective. Ann. Anat. Anat. Anz. Off. Organ Anat. Ges. *191*, 248–259.

Kong, J., Gollub, R.L., Rosman, I.S., Webb, J.M., Vangel, M.G., Kirsch, I., and Kaptchuk, T.J. (2006). Brain activity associated with expectancy-enhanced placebo analgesia as measured by functional magnetic resonance imaging. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *26*, 381–388.

Konietzko, U., and Müller, C.M. (1994). Astrocytic dye coupling in rat hippocampus: topography, developmental onset, and modulation by protein kinase C. Hippocampus *4*, 297–306.

Košta, V., Kojundžić, S.L., Sapunar, L.C., and Sapunar, D. (2009). The extent of laminectomy affects pain-related behavior in a rat model of neuropathic pain. Eur. J. Pain *13*, 243–248.

Kozlov, A.S., Angulo, M.C., Audinat, E., and Charpak, S. (2006). Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 10058–10063.

Krahé, C., Springer, A., Weinman, J.A., and Fotopoulou, A. (2013). The Social Modulation of Pain: Others as Predictive Signals of Salience – a Systematic Review. Front. Hum. Neurosci. *7*.

Krettek, J.E., and Price, J.L. (1977). The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. J. Comp. Neurol. *171*, 157–191.

Krout, K.E., and Loewy, A.D. (2000). Periaqueductal gray matter projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. J. Comp. Neurol. *424*, 111–141.

Krout, K.E., Belzer, R.E., and Loewy, A.D. (2002). Brainstem projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. J. Comp. Neurol. *448*, 53–101.

Kumar, K., Toth, C., and Nath, R.K. (1997). Deep brain stimulation for intractable pain: a 15-year experience. Neurosurgery *40*, 736–746; discussion 746–747.

Kupers, R.C., Gybels, J.M., and Gjedde, A. (2000). Positron emission tomography study of a chronic pain patient successfully treated with somatosensory thalamic stimulation. Pain *87*, 295–302.

Kurejova, M., Nattenmüller, U., Hildebrandt, U., Selvaraj, D., Stösser, S., and Kuner, R. (2010). An improved behavioural assay demonstrates that ultrasound vocalizations constitute a reliable indicator of chronic cancer pain and neuropathic pain. Mol. Pain *6*, 18.

L

Lalancette-Hebert, M., Gowing, G., Simard, A., Weng, Y.C., and Kriz, J. (2007). Selective Ablation of Proliferating Microglial Cells Exacerbates Ischemic Injury in the Brain. J. Neurosci. *27*, 2596–2605.

Lam, A.G., Koppal, T., Akama, K.T., Guo, L., Craft, J.M., Samy, B., Schavocky, J.P., Watterson, D.M., and Van Eldik, L.J. (2001). Mechanism of glial activation by S100B: involvement of the transcription factor NFkappaB. Neurobiol. Aging *22*, 765–772.

Van Landeghem, F.K., Stover, J.F., Bechmann, I., Brück, W., Unterberg, A., Bührer, C., and von Deimling, A. (2001). Early expression of glutamate transporter proteins in ramified microglia after controlled cortical impact injury in the rat. Glia *35*, 167–179.

Langford, D.J., Crager, S.E., Shehzad, Z., Smith, S.B., Sotocinal, S.G., Levenstadt, J.S., Chanda, M.L., Levitin, D.J., and Mogil, J.S. (2006). Social modulation of pain as evidence for empathy in mice. Science *312*, 1967–1970.

Langford, D.J., Bailey, A.L., Chanda, M.L., Clarke, S.E., Drummond, T.E., Echols, S., Glick, S., Ingrao, J., Klassen-Ross, T., Lacroix-Fralish, M.L., et al. (2010). Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. Nat. Methods *7*, 447–449.

Laterre, E.C., De Volder, A.G., and Goffinet, A.M. (1988). Brain glucose metabolism in thalamic syndrome. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry *51*, 427–428.

Lawson, L.J., Perry, V.H., Dri, P., and Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. Neuroscience *39*, 151–170.

LeBlanc, B.W., Zerah, M.L., Kadasi, L.M., Chai, N., and Saab, C.Y. (2011). Minocycline injection in the ventral posterolateral thalamus reverses microglial reactivity and thermal hyperalgesia secondary to sciatic neuropathy. Neurosci. Lett. *498*, 138–142.

Lee, K.-M., Jeon, S.-M., and Cho, H.-J. (2010). Interleukin-6 induces microglial CX3CR1 expression in the spinal cord after peripheral nerve injury through the activation of p38 MAPK. Eur. J. Pain Lond. Engl. *14*, 682.e1–e12.

Lee, S.C., Liu, W., Roth, P., Dickson, D.W., Berman, J.W., and Brosnan, C.F. (1993). Macrophage colony-stimulating factor in human fetal astrocytes and microglia. Differential regulation by cytokines and lipopolysaccharide, and modulation of class II MHC on microglia. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *150*, 594–604.

Lee, Y.B., Nagai, A., and Kim, S.U. (2002). Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia. J. Neurosci. Res. *69*, 94–103.

Lehnardt, S., Lachance, C., Patrizi, S., Lefebvre, S., Follett, P.L., Jensen, F.E., Rosenberg, P.A., Volpe, J.J., and Vartanian, T. (2002). The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *22*, 2478–2486.

Leknes, S., Berna, C., Lee, M.C., Snyder, G.D., Biele, G., and Tracey, I. (2013). The importance of context: when relative relief renders pain pleasant. Pain *154*, 402–410.

Lendahl, U., Zimmerman, L.B., and McKay, R.D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. Cell *60*, 585–595.

Lenz, F.A., Tasker, R.R., Dostrovsky, J.O., Kwan, H.C., Gorecki, J., Hirayama, T., and Murphy, J.T. (1987). Abnormal single-unit activity recorded in the somatosensory thalamus of a quadriplegic patient with central pain. Pain *31*, 225–236.

Lenz, F.A., Kwan, H.C., Dostrovsky, J.O., and Tasker, R.R. (1989). Characteristics of the bursting pattern of action potentials that occurs in the thalamus of patients with central pain. Brain Res. *496*, 357–360.

Lenz, F.A., Seike, M., Richardson, R.T., Lin, Y.C., Baker, F.H., Khoja, I., Jaeger, C.J., and Gracely, R.H. (1993). Thermal and pain sensations evoked by microstimulation in the area of human ventrocaudal nucleus. J. Neurophysiol. *70*, 200–212.

Lenz, F.A., Kwan, H.C., Martin, R., Tasker, R., Richardson, R.T., and Dostrovsky, J.O. (1994). Characteristics of somatotopic organization and spontaneous neuronal activity in the region of the thalamic principal sensory nucleus in patients with spinal cord transection. J. Neurophysiol. *72*, 1570–1587.

Lenz, F.A., Garonzik, I.M., Zirh, T.A., and Dougherty, P.M. (1998). Neuronal activity in the region of the thalamic principal sensory nucleus (ventralis caudalis) in patients with pain following amputations. Neuroscience *86*, 1065–1081.

Leonard, C.M. (1972). The connections of the dorsomedial nuclei. Brain. Behav. Evol. *6*, 524–541.

Lepekhin, E.A., Eliasson, C., Berthold, C.H., Berezin, V., Bock, E., and Pekny, M. (2001). Intermediate filaments regulate astrocyte motility. J. Neurochem. *79*, 617–625.

Lewis, S.A., Balcarek, J.M., Krek, V., Shelanski, M., and Cowan, N.J. (1984). Sequence of a cDNA clone encoding mouse glial fibrillary acidic protein: structural conservation of intermediate filaments. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *81*, 2743–2746.

Li, H., Guo, Y., Teng, J., Ding, M., Yu, A.C.H., and Chen, J. (2006). 14-3-3gamma affects dynamics and integrity of glial filaments by binding to phosphorylated GFAP. J. Cell Sci. *119*, 4452–4461.

Liang, L., and Mendell, L.M. (2013). Bilateral transient changes in thalamic nucleus ventroposterior lateralis after thoracic hemisection in the rat. J. Neurophysiol. *110*, 942–951.

Light, A.R., Wu, Y., Hughen, R.W., and Guthrie, P.B. (2006). Purinergic receptors activating rapid intracellular Ca increases in microglia. Neuron Glia Biol. *2*, 125–138.

Linderoth, B., and Meyerson, B.A. (2000). Spinal cord stimulation in limb ischemia--time for revival? Eur. J. Pain Lond. Engl. *4*, 317–319.

Lindholm, D., Heumann, R., Meyer, M., and Thoenen, H. (1987). Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. Nature *330*, 658–659.

Lindia, J.A., McGowan, E., Jochnowitz, N., and Abbadie, C. (2005). Induction of CX3CL1 expression in astrocytes and CX3CR1 in microglia in the spinal cord of a rat model of neuropathic pain. J. Pain Off. J. Am. Pain Soc. *6*, 434–438.

Liu, Z., Fan, Y., Won, S.J., Neumann, M., Hu, D., Zhou, L., Weinstein, P.R., and Liu, J. (2007). Chronic Treatment With Minocycline Preserves Adult New Neurons and Reduces Functional Impairment After Focal Cerebral Ischemia. Stroke *38*, 146–152.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods San Diego Calif *25*, 402–408.

Llinás, R., and Jahnsen, H. (1982). Electrophysiology of mammalian thalamic neurones in vitro. Nature *297*, 406–408.

Llinás, R.R., Ribary, U., Jeanmonod, D., Kronberg, E., and Mitra, P.P. (1999). Thalamocortical dysrhythmia: A neurological and neuropsychiatric syndrome characterized by magnetoencephalography. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 15222–15227.

Lo, F.-S., Zhao, S., and Erzurumlu, R.S. (2011). Astrocytes promote peripheral nerve injury-induced reactive synaptogenesis in the neonatal CNS. J. Neurophysiol. *106*, 2876–2887.

Loggia, M.L., Chonde, D.B., Akeju, O., Arabasz, G., Catana, C., Edwards, R.R., Hill, E., Hsu, S., Izquierdo-Garcia, D., Ji, R.-R., et al. (2015). Evidence for brain glial activation in chronic pain patients. Brain *138*, 604–615.

López-Redondo, F., Nakajima, K., Honda, S., and Kohsaka, S. (2000). Glutamate transporter GLT-1 is highly expressed in activated microglia following facial nerve axotomy. Brain Res. Mol. Brain Res. *76*, 429–435.

Lorenzo, L.-E., Magnussen, C., Bailey, A.L., St Louis, M., De Koninck, Y., and Ribeiro-da-Silva, A. (2014). Spatial and temporal pattern of changes in the number of GAD65-immunoreactive inhibitory terminals in the rat superficial dorsal horn following peripheral nerve injury. Mol. Pain *10*, 57.

Lou, H.C., Kjaer, T.W., Friberg, L., Wildschiodtz, G., Holm, S., and Nowak, M. (1999). A 15O-H2O PET study of meditation and the resting state of normal consciousness. Hum. Brain Mapp. *7*, 98–105.

Lovatt, D., Sonnewald, U., Waagepetersen, H.S., Schousboe, A., He, W., Lin, J.H.-C., Han, X., Takano, T., Wang, S., Sim, F.J., et al. (2007). The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *27*, 12255–12266.

Ludwin, S.K., Kosek, J.C., and Eng, L.F. (1976). The topographical distribution of S-100 and GFA proteins in the adult rat brain: an immunohistochemical study using horseradish peroxidase-labelled antibodies. J. Comp. Neurol. *165*, 197–207.

Luerding, R., Weigand, T., Bogdahn, U., and Schmidt-Wilcke, T. (2008). Working memory performance is correlated with local brain morphology in the medial frontal and anterior cingulate cortex in fibromyalgia patients: structural correlates of pain-cognition interaction. Brain J. Neurol. *131*, 3222–3231.

Luna, G., Lewis, G.P., Banna, C.D., Skalli, O., and Fisher, S.K. (2010). Expression profiles of nestin and synemin in reactive astrocytes and Müller cells following retinal injury: a comparison with glial fibrillar acidic protein and vimentin. Mol. Vis. *16*, 2511–2523.

M

Ma, W., Peschanski, M., and Ralston, H.J. (1987). The differential synaptic organization of the spinal and lemniscal projections to the ventrobasal complex of the rat thalamus. Evidence for convergence of the two systems upon single thalamic neurons. Neuroscience *22*, 925–934.

Maciejewski-Lenoir, D., Chen, S., Feng, L., Maki, R., and Bacon, K.B. (1999). Characterization of fractalkine in rat brain cells: migratory and activation signals for CX3CR-1-expressing microglia. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *163*, 1628–1635.

MacVicar, B.A., Tse, F.W., Crichton, S.A., and Kettenmann, H. (1989). GABA-activated Cl- channels in astrocytes of hippocampal slices. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *9*, 3577–3583.

Maezawa, I., Zimin, P.I., Wulff, H., and Jin, L.-W. (2011). Amyloid-beta protein oligomer at low nanomolar concentrations activates microglia and induces microglial neurotoxicity. J. Biol. Chem. *286*, 3693–3706.

Manley, G.T., Binder, D.K., Papadopoulos, M.C., and Verkman, A.S. (2004). New insights into water transport and edema in the central nervous system from phenotype analysis of aquaporin-4 null mice. Neuroscience *129*, 981–989.

Manna, A., Raffone, A., Perrucci, M.G., Nardo, D., Ferretti, A., Tartaro, A., Londei, A., Del Gratta, C., Belardinelli, M.O., and Romani, G.L. (2010). Neural correlates of focused attention and cognitive monitoring in meditation. Brain Res. Bull. *82*, 46–56.

Marcello, L., Cavaliere, C., Colangelo, A.M., Bianco, M.R., Cirillo, G., Alberghina, L., and Papa, M. (2013). Remodelling of supraspinal neuroglial network in neuropathic pain is featured by a reactive gliosis of the nociceptive amygdala. Eur. J. Pain Lond. Engl. *17*, 799–810.

Marín-Teva, J.L., Dusart, I., Colin, C., Gervais, A., van Rooijen, N., and Mallat, M. (2004). Microglia promote the death of developing Purkinje cells. Neuron *41*, 535–547.

Martin, L.J., Hathaway, G., Isbester, K., Mirali, S., Acland, E.L., Niederstrasser, N., Slepian, P.M., Trost, Z., Bartz, J.A., Sapolsky, R.M., et al. (2015). Reducing social stress elicits emotional contagion of pain in mouse and human strangers. Curr. Biol. CB *25*, 326–332.

Matute, C., and Miledi, R. (1993). Neurotransmitter receptors and voltage-dependent Ca2+ channels encoded by mRNA from the adult corpus callosum. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *90*, 3270–3274.

Mazars, G., Mérienne, L., and Ciolocca, C. (1973). [Intermittent analgesic thalamic stimulation. Preliminary note]. Rev. Neurol. (Paris) *128*, 273–279.

Mazars, G., Merienne, L., and Cioloca, C. (1974). [Treatment of certain types of pain with implantable thalamic stimulators]. Neurochirurgie. *20*, 117–124.

Mazars, G., Mérienne, L., and Cioloca, C. (1975). [Use of thalamic stimulators in the treatment of various types of pain]. Ann. Médecine Interne *126*, 869–871.

Mazzola, L., Isnard, J., and Mauguière, F. (2006). Somatosensory and pain responses to stimulation of the second somatosensory area (SII) in humans. A comparison with SI and insular responses. Cereb. Cortex N. Y. N 1991 *16*, 960–968.

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

McKenna, M.C., Sonnewald, U., Huang, X., Stevenson, J., and Zielke, H.R. (1996). Exogenous glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. J. Neurochem. *66*, 386–393.

McMahon, S.B., Cafferty, W.B.J., and Marchand, F. (2005). Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. Exp. Neurol. *192*, 444–462.

McWilliams, L.A., Goodwin, R.D., and Cox, B.J. (2004). Depression and anxiety associated with three pain conditions: results from a nationally representative sample. Pain *111*, 77–83.

Meda, L., Cassatella, M.A., Szendrei, G.I., Otvos, L., Baron, P., Villalba, M., Ferrari, D., and Rossi, F. (1995). Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. Nature *374*, 647–650.

Melzack, R. (1990). Phantom limbs and the concept of a neuromatrix. Trends Neurosci. *13*, 88–92.

Melzack, R., and Wall, P.D. (1965). Pain mechanisms: a new theory. Science *150*, 971–979.

Même, W., Calvo, C.-F., Froger, N., Ezan, P., Amigou, E., Koulakoff, A., and Giaume, C. (2006). Proinflammatory cytokines released from microglia inhibit gap junctions in astrocytes: potentiation by beta-amyloid. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *20*, 494–496.

Menet, V., Prieto, M., Privat, A., and Giménez y Ribotta, M. (2003). Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 8999–9004.

Meyerson, B.A., and Linderoth, B. (2000). Mechanisms of spinal cord stimulation in neuropathic pain. Neurol. Res. *22*, 285–292.

Meyerson, B.A., Lindblom, U., Linderoth, B., Lind, G., and Herregodts, P. (1993). Motor cortex stimulation as treatment of trigeminal neuropathic pain. Acta Neurochir. Suppl. (Wien) *58*, 150–153.

Michaelis, M., Vogel, C., Blenk, K.H., and Jänig, W. (1997). Algesics excite axotomised afferent nerve fibres within the first hours following nerve transection in rats. Pain *72*, 347–354.

Mika, J., Zychowska, M., Popiolek-Barczyk, K., Rojewska, E., and Przewlocka, B. (2013). Importance of glial activation in neuropathic pain. Eur. J. Pharmacol. *716*, 106–119.

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

Milligan, E., Zapata, V., Schoeniger, D., Chacur, M., Green, P., Poole, S., Martin, D., Maier, S.F., and Watkins, L.R. (2005). An initial investigation of spinal mechanisms underlying pain enhancement induced by fractalkine, a neuronally released chemokine. Eur. J. Neurosci. *22*, 2775–2782.

Milligan, E.D., Twining, C., Chacur, M., Biedenkapp, J., O'Connor, K., Poole, S., Tracey, K., Martin, D., Maier, S.F., and Watkins, L.R. (2003). Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *23*, 1026–1040.

Milligan, E.D., Zapata, V., Chacur, M., Schoeniger, D., Biedenkapp, J., O'Connor, K.A., Verge, G.M., Chapman, G., Green, P., Foster, A.C., et al. (2004). Evidence that exogenous and endogenous fractalkine can induce spinal nociceptive facilitation in rats. Eur. J. Neurosci. *20*, 2294–2302.

Millward, T.A., Heizmann, C.W., Schäfer, B.W., and Hemmings, B.A. (1998). Calcium regulation of Ndr protein kinase mediated by S100 calcium-binding proteins. EMBO J. *17*, 5913–5922.

Minderhoud, J.M. (1971). An anatomical study of the efferent connections of the thalamic reticular nucleus. Exp. Brain Res. *112*, 435–446.

Miraucourt, L.S., Dallel, R., and Voisin, D.L. (2007). Glycine Inhibitory Dysfunction Turns Touch into Pain through PKCgamma Interneurons. PLoS ONE *2*, e1116.

Mittelbronn, M., Dietz, K., Schluesener, H.J., and Meyermann, R. (2001). Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. Acta Neuropathol. (Berl.) *101*, 249–255.

Miyake, T., Okada, M., and Kitamura, T. (1992). Reactive proliferation of astrocytes studied by immunohistochemistry for proliferating cell nuclear antigen. Brain Res. *590*, 300–302.

Miyazaki, I., Asanuma, M., Diaz-Corrales, F.J., Miyoshi, K., and Ogawa, N. (2004). Direct evidence for expression of dopamine receptors in astrocytes from basal ganglia. Brain Res. *1029*, 120–123.

Mizoguchi, Y., Monji, A., Kato, T., Seki, Y., Gotoh, L., Horikawa, H., Suzuki, S.O., Iwaki, T., Yonaha, M., Hashioka, S., et al. (2009). Brain-derived neurotrophic factor induces sustained elevation of intracellular Ca2+ in rodent microglia. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *183*, 7778–7786.

Mòdol, L., Cobianchi, S., and Navarro, X. (2014). Prevention of NKCC1 phosphorylation avoids downregulation of KCC2 in central sensory pathways and reduces neuropathic pain after peripheral nerve injury: Pain *155*, 1577–1590.

Mogil, J.S., and Chanda, M.L. (2005). The case for the inclusion of female subjects in basic science studies of pain. Pain *117*, 1–5.

Mogil, J.S., and Crager, S.E. (2004). What should we be measuring in behavioral studies of chronic pain in animals? Pain *112*, 12–15.

Mongin, A.A., and Kimelberg, H.K. (2002). ATP potently modulates anion channel-mediated excitatory amino acid release from cultured astrocytes. Am. J. Physiol. Cell Physiol. *283*, C569–C578.

Monier, A., Adle-Biassette, H., Delezoide, A.-L., Evrard, P., Gressens, P., and Verney, C. (2007). Entry and distribution of microglial cells in human embryonic and fetal cerebral cortex. J. Neuropathol. Exp. Neurol. *66*, 372–382.

Moore, K.A., Kohno, T., Karchewski, L.A., Scholz, J., Baba, H., and Woolf, C.J. (2002). Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *22*, 6724–6731.

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

Morone, N.E., Greco, C.M., and Weiner, D.K. (2008). Mindfulness meditation for the treatment of chronic low back pain in older adults: A randomized controlled pilot study☆: Pain *134*, 310–319.

Mosconi, T., and Kruger, L. (1996). Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. Pain *64*, 37–57.

Mothet, J.P., Parent, A.T., Wolosker, H., Brady, R.O., Linden, D.J., Ferris, C.D., Rogawski, M.A., and Snyder, S.H. (2000). D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 4926–4931.

Munger, B.L., Bennett, G.J., and Kajander, K.C. (1992). An experimental painful peripheral neuropathy due to nerve constriction. I. Axonal pathology in the sciatic nerve. Exp. Neurol. *118*, 204–214.

Murphy, P.G., Grondin, J., Altares, M., and Richardson, P.M. (1995). Induction of interleukin-6 in axotomized sensory neurons. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *15*, 5130–5138.

Mutschler, I., Reinbold, C., Wankerl, J., Seifritz, E., and Ball, T. (2013). Structural basis of empathy and the domain general region in the anterior insular cortex. Front. Hum. Neurosci. *7*.

Myer, D.J., Gurkoff, G.G., Lee, S.M., Hovda, D.A., and Sofroniew, M.V. (2006). Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. Brain J. Neurol. *129*, 2761–2772.

N

Nagai, T., McGeer, P.L., and McGeer, E.G. (1983). Distribution of GABA-T-intensive neurons in the rat forebrain and midbrain. J. Comp. Neurol. *218*, 220–238.

Nagano, T., Kawasaki, Y., Baba, A., Takemura, M., and Matsuda, T. (2004). Up-regulation of Na+-Ca2+ exchange activity by interferon-gamma in cultured rat microglia. J. Neurochem. *90*, 784–791.

Nagaro, T., Adachi, N., Tabo, E., Kimura, S., Arai, T., and Dote, K. (2001). New pain following cordotomy: clinical features, mechanisms, and clinical importance. J. Neurosurg. *95*, 425–431.

Nagata, K., Ogawa, T., Omosu, M., Fujimoto, K., and Hayashi, S. (1985). In vitro and in vivo inhibitory effects of propentofylline on cyclic AMP phosphodiesterase activity. Arzneimittelforschung. *35*, 1034–1036.

Nakamura, Y., Otake, K., and Tokuno, H. (2006). The parafascicular nucleus relays spinal inputs to the striatum: an electron microscope study in the rat. Neurosci. Res. *56*, 73–79.

Nakashima, M., Uemura, M., Yasui, K., Ozaki, H.S., Tabata, S., and Taen, A. (2000). An anterograde and retrograde tract-tracing study on the projections from the thalamic gustatory area in the rat: distribution of neurons projecting to the insular cortex and amygdaloid complex. Neurosci. Res. *36*, 297–309.

Narita, M., Yoshida, T., Nakajima, M., Narita, M., Miyatake, M., Takagi, T., Yajima, Y., and Suzuki, T. (2006a). Direct evidence for spinal cord microglia in the development of a neuropathic pain-like state in mice. J. Neurochem. *97*, 1337–1348.

Narita, M., Kuzumaki, N., Narita, M., Kaneko, C., Hareyama, N., Miyatake, M., Shindo, K., Miyoshi, K., Nakajima, M., Nagumo, Y., et al. (2006b). Chronic pain-induced emotional dysfunction is associated with astrogliosis due to cortical delta-opioid receptor dysfunction. J. Neurochem. *97*, 1369–1378.

Navarrete, M., and Araque, A. (2008). Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. Neuron *57*, 883–893.

Nawashiro, H., Messing, A., Azzam, N., and Brenner, M. (1998). Mice lacking GFAP are hypersensitive to traumatic cerebrospinal injury. Neuroreport *9*, 1691–1696.

Nawashiro, H., Brenner, M., Fukui, S., Shima, K., and Hallenbeck, J.M. (2000). High susceptibility to cerebral ischemia in GFAP-null mice. J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab. *20*, 1040–1044.

Neary, J.T., Baker, L., Jorgensen, S.L., and Norenberg, M.D. (1994). Extracellular ATP induces stellation and increases glial fibrillary acidic protein content and DNA synthesis in primary astrocyte cultures. Acta Neuropathol. (Berl.) *87*, 8–13.

Nedergaard, M. (1994). Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. Science *263*, 1768–1771.

Neumann, J. (2006). Microglia provide neuroprotection after ischemia. FASEB J.

Newman, E.A. (1996). Acid efflux from retinal glial cells generated by sodium bicarbonate cotransport. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *16*, 159–168.

Newman, E.A. (2003a). New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. Trends Neurosci. *26*, 536–542.

Newman, E.A. (2003b). Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *23*, 1659–1666.

Nielsen, S., Nagelhus, E.A., Amiry-Moghaddam, M., Bourque, C., Agre, P., and Ottersen, O.P. (1997). Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *17*, 171–180.

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science *308*, 1314–1318.

Nishikawa, Y., Yoshimoto, H., Mori, A., Mukunoki, S., Kakudo, K., and Yoshida, Y. (1999). Functional properties of nociceptive neurons in the nucleus centralis lateralis of the cat thalamus. J. Osaka Dent. Univ. *33*, 65–73.

Noda, M., Nakanishi, H., Nabekura, J., and Akaike, N. (2000). AMPA-kainate subtypes of glutamate receptor in rat cerebral microglia. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *20*, 251–258.

Norenberg, M.D., and Martinez-Hernandez, A. (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. Brain Res. *161*, 303–310.

O

Oberheim, N.A., Wang, X., Goldman, S., and Nedergaard, M. (2006). Astrocytic complexity distinguishes the human brain. Trends Neurosci. *29*, 547–553.

Obermann, M., Rodriguez-Raecke, R., Naegel, S., Holle, D., Mueller, D., Yoon, M.-S., Theysohn, N., Blex, S., Diener, H.-C., and Katsarava, Z. (2013). Gray matter volume reduction reflects chronic pain in trigeminal neuralgia. NeuroImage *74*, 352–358.

Ogata, K., and Kosaka, T. (2002). Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. Neuroscience *113*, 221–233.

Ogino, Y., Nemoto, H., Inui, K., Saito, S., Kakigi, R., and Goto, F. (2007). Inner experience of pain: imagination of pain while viewing images showing painful events forms subjective pain representation in human brain. Cereb. Cortex N. Y. N 1991 *17*, 1139–1146.

Ohara, S., and Lenz, F.A. (2003). Medial lateral extent of thermal and pain sensations evoked by microstimulation in somatic sensory nuclei of human thalamus. J. Neurophysiol. *90*, 2367–2377.

Ohsawa, K., Irino, Y., Nakamura, Y., Akazawa, C., Inoue, K., and Kohsaka, S. (2007). Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. Glia *55*, 604–616.

Oikonomou, G., and Shaham, S. (2011). The Glia of Caenorhabditis elegans. Glia *59*, 1253–1263.

Okere, C.O., and Kaba, H. (2000). Heterogenous immunohistochemical expression of microglia-specific ionized calcium binding adaptor protein (Iba1) in the mouse olfactory bulb. Brain Res. *877*, 85–90.

O'Shea, R.D., Lau, C.L., Farso, M.C., Diwakarla, S., Zagami, C.J., Svendsen, B.B., Feeney, S.J., Callaway, J.K., Jones, N.M., Pow, D.V., et al. (2006). Effects of lipopolysaccharide on glial phenotype and activity of glutamate transporters: Evidence for delayed up-regulation and redistribution of GLT-1. Neurochem. Int. *48*, 604–610.

P

Panatier, A., Theodosis, D.T., Mothet, J.-P., Touquet, B., Pollegioni, L., Poulain, D.A., and Oliet, S.H.R. (2006). Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. Cell *125*, 775–784.

Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., et al. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. Science *333*, 1456–1458.

Papadopoulos, M.C. (2004). Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. FASEB J.

Park, H., Oh, S.-J., Han, K.-S., Woo, D.H., Park, H., Mannaioni, G., Traynelis, S.F., and Lee, C.J. (2009). Bestrophin-1 Encodes for the Ca2+-Activated Anion Channel in Hippocampal Astrocytes. J. Neurosci. *29*, 13063–13073.

Parpura, V., Basarsky, T.A., Liu, F., Jeftinija, K., Jeftinija, S., and Haydon, P.G. (1994). Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. Nature *369*, 744–747.

Pascual, O., Ben Achour, S., Rostaing, P., Triller, A., and Bessis, A. (2012). Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, E197–E205.

Pattany, P.M., Yezierski, R.P., Widerström-Noga, E.G., Bowen, B.C., Martinez-Arizala, A., Garcia, B.R., and Quencer, R.M. (2002). Proton magnetic resonance spectroscopy of the thalamus in patients with chronic neuropathic pain after spinal cord injury. AJNR Am. J. Neuroradiol. *23*, 901–905.

Paulson, O.B., and Newman, E.A. (1987). Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? Science *237*, 896–898.

Payne, J., Maher, F., Simpson, I., Mattice, L., and Davies, P. (1997). Glucose transporter Glut 5 expression in microglial cells. Glia *21*, 327–331.

Pellerin, L., and Magistretti, P.J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 10625–10629.

Perea, G., and Araque, A. (2007). Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. Science *317*, 1083–1086.

Perlman, D.M., Salomons, T.V., Davidson, R.J., and Lutz, A. (2010). Differential effects on pain intensity and unpleasantness of two meditation practices. Emot. Wash. DC *10*, 65–71.

Perry, V.H. (1998). A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. J. Neuroimmunol. *90*, 113–121.

Persson, M., Brantefjord, M., Hansson, E., and Rönnbäck, L. (2005). Lipopolysaccharide increases microglial GLT-1 expression and glutamate uptake capacity in vitro by a mechanism dependent on TNF-alpha. Glia *51*, 111–120.

Persson, M., Sandberg, M., Hansson, E., and Rönnbäck, L. (2006). Microglial glutamate uptake is coupled to glutathione synthesis and glutamate release. Eur. J. Neurosci. *24*, 1063–1070.

Petrova, T.V., Hu, J., and Van Eldik, L.J. (2000). Modulation of glial activation by astrocyte-derived protein S100B: differential responses of astrocyte and microglial cultures. Brain Res. *853*, 74–80.

Peyron, R., Garcia-Larrea, L., Deiber, M.P., Cinotti, L., Convers, P., Sindou, M., Mauguière, F., and Laurent, B. (1995). Electrical stimulation of precentral cortical area in the treatment of central pain: electrophysiological and PET study. Pain *62*, 275–286.

Peyron, R., García-Larrea, L., Grégoire, M.C., Costes, N., Convers, P., Lavenne, F., Mauguière, F., Michel, D., and Laurent, B. (1999). Haemodynamic brain responses to acute pain in humans: sensory and attentional networks. Brain J. Neurol. *122 (Pt 9)*, 1765–1780.

Pierre, K., and Pellerin, L. (2005). Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. J. Neurochem. *94*, 1–14.

Pinault, D. (2004). The thalamic reticular nucleus: structure, function and concept. Brain Res. Brain Res. Rev. *46*, 1–31.

Pixley, S.K., and de Vellis, J. (1984). Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. Brain Res. *317*, 201–209.

Ponath, G., Schettler, C., Kaestner, F., Voigt, B., Wentker, D., Arolt, V., and Rothermundt, M. (2007). Autocrine S100B effects on astrocytes are mediated via RAGE. J. Neuroimmunol. *184*, 214–222.

Ponomarev, E.D., Maresz, K., Tan, Y., and Dittel, B.N. (2007). CNS-Derived Interleukin-4 Is Essential for the Regulation of Autoimmune Inflammation and Induces a State of Alternative Activation in Microglial Cells. J. Neurosci. *27*, 10714–10721.

Porter, J.T., and McCarthy, K.D. (1995). Adenosine receptors modulate [Ca2+]i in hippocampal astrocytes in situ. J. Neurochem. *65*, 1515–1523.

Price, D.L., Ludwig, J.W., Mi, H., Schwarz, T.L., and Ellisman, M.H. (2002). Distribution of rSlo Ca2+-activated K+ channels in rat astrocyte perivascular endfeet. Brain Res. *956*, 183–193.

Pritchard, T.C., Hamilton, R.B., Morse, J.R., and Norgren, R. (1986). Projections of thalamic gustatory and lingual areas in the monkey, Macaca fascicularis. J. Comp. Neurol. *244*, 213–228.

R

Rabchevsky, A.G., and Streit, W.J. (1997). Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth. J. Neurosci. Res. *47*, 34–48.

Raboisson, P., Dallel, R., Bernard, J.F., Le Bars, D., and Villanueva, L. (1996). Organization of efferent projections from the spinal cervical enlargement to the medullary subnucleus reticularis dorsalis and the adjacent cuneate nucleus: a PHA-L study in the rat. J. Comp. Neurol. *367*, 503–517.

Radhakrishnan, V., Tsoukatos, J., Davis, K.D., Tasker, R.R., Lozano, A.M., and Dostrovsky, J.O. (1999). A comparison of the burst activity of lateral thalamic neurons in chronic pain and non-pain patients. Pain *80*, 567–575.

Raghavendra, V., Tanga, F., Rutkowski, M.D., and DeLeo, J.A. (2003a). Anti-hyperalgesic and morphine-sparing actions of propentofylline following peripheral nerve injury in rats: mechanistic implications of spinal glia and proinflammatory cytokines. Pain *104*, 655–664.

Raghavendra, V., Tanga, F., and DeLeo, J.A. (2003b). Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. J. Pharmacol. Exp. Ther. *306*, 624–630.

Rajkowska, G., and Miguel-Hidalgo, J.J. (2007). Gliogenesis and glial pathology in depression. CNS Neurol. Disord. Drug Targets *6*, 219–233.

Rajkowska, G., Miguel-Hidalgo, J.J., Wei, J., Dilley, G., Pittman, S.D., Meltzer, H.Y., Overholser, J.C., Roth, B.L., and Stockmeier, C.A. (1999). Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. Biol. Psychiatry *45*, 1085–1098.

Ransom, C.B., and Sontheimer, H. (1995). Biophysical and pharmacological characterization of inwardly rectifying K+ currents in rat spinal cord astrocytes. J. Neurophysiol. *73*, 333–346.

Reeves, S.A., Helman, L.J., Allison, A., and Israel, M.A. (1989). Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *86*, 5178–5182.

Reid, D.M., Perry, V.H., Andersson, P.B., and Gordon, S. (1993). Mitosis and apoptosis of microglia in vivo induced by an anti-CR3 antibody which crosses the blood-brain barrier. Neuroscience *56*, 529–533.

Ren, W.-J., Liu, Y., Zhou, L.-J., Li, W., Zhong, Y., Pang, R.-P., Xin, W.-J., Wei, X.-H., Wang, J., Zhu, H.-Q., et al. (2011). Peripheral nerve injury leads to working memory deficits and dysfunction of the hippocampus by upregulation of TNF-α in rodents. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. *36*, 979–992.

Ren, Y., Zhang, L., Lu, Y., Yang, H., and Westlund, K.N. (2009). Central lateral thalamic neurons receive noxious visceral mechanical and chemical input in rats. J. Neurophysiol. *102*, 244–258.

Rickmann, M., and Wolff, J.R. (1995a). S100 immunoreactivity in a subpopulation of oligodendrocytes and Ranvier's nodes of adult rat brain. Neurosci. Lett. *186*, 13–16.

Rickmann, M., and Wolff, J.R. (1995b). S100 protein expression in subpopulations of neurons of rat brain. Neuroscience *67*, 977–991.

Rinaldi, P.C., Young, R.F., Albe-Fessard, D., and Chodakiewitz, J. (1991). Spontaneous neuronal hyperactivity in the medial and intralaminar thalamic nuclei of patients with deafferentation pain. J. Neurosurg. *74*, 415–421.

Roberts, V.J., and Dong, W.K. (1994). The effect of thalamic nucleus submedius lesions on nociceptive responding in rats. Pain *57*, 341–349.

Rodríguez-Zayas, A.E., Torrado, A.I., and Miranda, J.D. (2010). P2Y2 receptor expression is altered in rats after spinal cord injury. Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci. *28*, 413–421.

Rogers, J.T., Morganti, J.M., Bachstetter, A.D., Hudson, C.E., Peters, M.M., Grimmig, B.A., Weeber, E.J., Bickford, P.C., and Gemma, C. (2011). CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *31*, 16241–16250.

Rosomoff, H.L., Brown, C.J., and Sheptak, P. (1965). Percutaneous radiofrequency cervical cordotomy: technique. J. Neurosurg. *23*, 639–644.

Rothstein, J.D., Martin, L., Levey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., and Kuncl, R.W. (1994). Localization of neuronal and glial glutamate transporters. Neuron *13*, 713–725.

Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K., and Giaume, C. (2008). Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. Science *322*, 1551–1555.

Roumier, A., Pascual, O., Béchade, C., Wakselman, S., Poncer, J.-C., Réal, E., Triller, A., and Bessis, A. (2008). Prenatal activation of microglia induces delayed impairment of glutamatergic synaptic function. PloS One *3*, e2595.

Roy Choudhury, G., Ryou, M.-G., Poteet, E., Wen, Y., He, R., Sun, F., Yuan, F., Jin, K., and Yang, S.-H. (2014). Involvement of p38 MAPK in reactive astrogliosis induced by ischemic stroke. Brain Res. *1551*, 45–58.

Rutka, J.T., and Smith, S.L. (1993). Transfection of human astrocytoma cells with glial fibrillary acidic protein complementary DNA: analysis of expression, proliferation, and tumorigenicity. Cancer Res. *53*, 3624–3631.

Ruzicka, B.B., Fox, C.A., Thompson, R.C., Meng, F., Watson, S.J., and Akil, H. (1995). Primary astroglial cultures derived from several rat brain regions differentially express mu, delta and kappa opioid receptor mRNA. Brain Res. Mol. Brain Res. *34*, 209–220.

S

Saghaei, E., Abbaszadeh, F., Naseri, K., Ghorbanpoor, S., Afhami, M., Haeri, A., Rahimi, F., and Jorjani, M. (2013). Estradiol attenuates spinal cord injury-induced pain by suppressing microglial activation in thalamic VPL nuclei of rats. Neurosci. Res. *75*, 316–323.

De Salles, A.A., and Bittar, G.T. (1994). Thalamic pain syndrome: anatomic and metabolic correlation. Surg. Neurol. *41*, 147–151.

Sarnthein, J. (2005). Increased EEG power and slowed dominant frequency in patients with neurogenic pain. Brain *129*, 55–64.

Sarnthein, J., and Jeanmonod, D. (2008). High thalamocortical theta coherence in patients with neurogenic pain. NeuroImage *39*, 1910–1917.

Savchenko, V.L., McKanna, J.A., Nikonenko, I.R., and Skibo, G.G. (2000). Microglia and astrocytes in the adult rat brain: comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity. Neuroscience *96*, 195–203.

Sawamoto, N., Honda, M., Okada, T., Hanakawa, T., Kanda, M., Fukuyama, H., Konishi, J., and Shibasaki, H. (2000). Expectation of pain enhances responses to nonpainful somatosensory stimulation in the anterior cingulate cortex and parietal operculum/posterior insula: an event-related functional magnetic resonance imaging study. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *20*, 7438–7445.

Schaar, D.G., Sieber, B.A., Dreyfus, C.F., and Black, I.B. (1993). Regional and cell-specific expression of GDNF in rat brain. Exp. Neurol. *124*, 368–371.

Schell, M.J., Molliver, M.E., and Snyder, S.H. (1995). D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92*, 3948–3952.

Scholz, J., and Woolf, C.J. (2007). The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. Nat. Neurosci. *10*, 1361–1368.

Schönemeier, B., Kolodziej, A., Schulz, S., Jacobs, S., Hoellt, V., and Stumm, R. (2008). Regional and cellular localization of the CXCl12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 in the developing and adult rat brain. J. Comp. Neurol. *510*, 207–220.

Schubert, P., Ogata, T., Rudolphi, K., Marchini, C., McRae, A., and Ferroni, S. (1997). Support of homeostatic glial cell signaling: a novel therapeutic approach by propentofylline. Ann. N. Y. Acad. Sci. *826*, 337–347.

Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E.W., Pollard, J.W., et al. (2012). A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. Science *336*, 86–90.

Selinfreund, R.H., Barger, S.W., Pledger, W.J., and Van Eldik, L.J. (1991). Neurotrophic protein S100 beta stimulates glial cell proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *88*, 3554–3558.

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

Seminowicz, D.A., Mikulis, D.J., and Davis, K.D. (2004). Cognitive modulation of pain-related brain responses depends on behavioral strategy. Pain *112*, 48–58.

Seminowicz, D.A., Labus, J.S., Bueller, J.A., Tillisch, K., Naliboff, B.D., Bushnell, M.C., and Mayer, E.A. (2010). Regional gray matter density changes in brains of patients with irritable bowel syndrome. Gastroenterology *139*, 48–57.e2.

Shao, Y., and Sutin, J. (1992). Expression of adrenergic receptors in individual astrocytes and motor neurons isolated from the adult rat brain. Glia *6*, 108–117.

Shapiro, L.A., Wang, L., and Ribak, C.E. (2008). Rapid astrocyte and microglial activation following pilocarpine-induced seizures in rats. Epilepsia *49 Suppl 2*, 33–41.

Shapiro, L.A., Perez, Z.D., Foresti, M.L., Arisi, G.M., and Ribak, C.E. (2009). Morphological and ultrastructural features of Iba1-immunolabeled microglial cells in the hippocampal dentate gyrus. Brain Res. *1266*, 29–36.

Shashoua, V.E., Hesse, G.W., and Moore, B.W. (1984). Proteins of the brain extracellular fluid: evidence for release of S-100 protein. J. Neurochem. *42*, 1536–1541.

Shi, C.J., and Cassell, M.D. (1998). Cascade projections from somatosensory cortex to the rat basolateral amygdala via the parietal insular cortex. J. Comp. Neurol. *399*, 469–491.

Shimomura, T., Fujiki, M., Akiyoshi, J., Yoshida, T., Tabata, M., Kabasawa, H., and Kobayashi, H. (2008). Functional brain mapping during recitation of Buddhist scriptures and repetition of the Namu Amida Butsu: a study in experienced Japanese monks. Turk. Neurosurg. *18*, 134–141.

Shirihai, O., Smith, P., Hammar, K., and Dagan, D. (1998). Microglia generate external proton and potassium ion gradients utilizing a member of the H/K ATPase family. Glia *23*, 339–348.

Si, Q., Nakamura, Y., Ogata, T., Kataoka, K., and Schubert, P. (1998). Differential regulation of microglial activation by propentofylline via cAMP signaling. Brain Res. *812*, 97–104.

Sibson, N.R., Dhankhar, A., Mason, G.F., Rothman, D.L., Behar, K.L., and Shulman, R.G. (1998). Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *95*, 316–321.

De Simone, R., Ajmone-Cat, M.A., Carnevale, D., and Minghetti, L. (2005). Activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor by nicotine selectively up-regulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in rat microglial cultures. J. Neuroinflammation *2*, 4.

Simpson, J.R., Drevets, W.C., Snyder, A.Z., Gusnard, D.A., and Raichle, M.E. (2001). Emotion-induced changes in human medial prefrontal cortex: II. During anticipatory anxiety. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 688–693.

Smith, J.B., Mowery, T.M., and Alloway, K.D. (2012). Thalamic POm projections to the dorsolateral striatum of rats: potential pathway for mediating stimulus-response associations for sensorimotor habits. J. Neurophysiol. *108*, 160–174.

Smith, M.T., Edwards, R.R., Robinson, R.C., and Dworkin, R.H. (2004). Suicidal ideation, plans, and attempts in chronic pain patients: factors associated with increased risk. Pain *111*, 201–208.

Sofroniew, M.V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. Trends Neurosci. *32*, 638–647.

Sofroniew, M.V., and Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathol. (Berl.) *119*, 7–35.

Sonetti, D., Ottaviani, E., Bianchi, F., Rodriguez, M., Stefano, M.L., Scharrer, B., and Stefano, G.B. (1994). Microglia in invertebrate ganglia. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 9180–9184.

Sorci, G., Agneletti, A.L., and Donato, R. (2000). Effects of S100A1 and S100B on microtubule stability. An in vitro study using triton-cytoskeletons from astrocyte and myoblast cell lines. Neuroscience *99*, 773–783.

Sorge, R.E., Martin, L.J., Isbester, K.A., Sotocinal, S.G., Rosen, S., Tuttle, A.H., Wieskopf, J.S., Acland, E.L., Dokova, A., Kadoura, B., et al. (2014). Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. Nat. Methods.

Spreafico, R., Barbaresi, P., Weinberg, R.J., and Rustioni, A. (1987). SII-projecting neurons in the rat thalamus: a single- and double-retrograde-tracing study. Somatosens. Res. *4*, 359–375.

Steiner, J., Bernstein, H.-G., Bogerts, B., Gos, T., Richter-Landsberg, C., Wunderlich, M.T., and Keilhoff, G. (2008). S100B is expressed in, and released from, OLN-93 oligodendrocytes: Influence of serum and glucose deprivation. Neuroscience *154*, 496–503.

Stern, J., Jeanmonod, D., and Sarnthein, J. (2006). Persistent EEG overactivation in the cortical pain matrix of neurogenic pain patients. NeuroImage *31*, 721–731.

Stevens, R.T., London, S.M., and Apkarian, A.V. (1993). Spinothalamocortical projections to the secondary somatosensory cortex (SII) in squirrel monkey. Brain Res. *631*, 241–246.

Stirling, D.P. (2004). Minocycline Treatment Reduces Delayed Oligodendrocyte Death, Attenuates Axonal Dieback, and Improves Functional Outcome after Spinal Cord Injury. J. Neurosci. *24*, 2182–2190.

Strömberg, I., Björklund, H., Dahl, D., Jonsson, G., Sundström, E., and Olson, L. (1986). Astrocyte responses to dopaminergic denervations by 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine as evidenced by glial fibrillary acidic protein immunohistochemistry. Brain Res. Bull. *17*, 225–236.

Su, Z., Yuan, Y., Chen, J., Zhu, Y., Qiu, Y., Zhu, F., Huang, A., and He, C. (2011). Reactive astrocytes inhibit the survival and differentiation of oligodendrocyte precursor cells by secreted TNF-α. J. Neurotrauma *28*, 1089–1100.

Sugama, S., Fujita, M., Hashimoto, M., and Conti, B. (2007). Stress induced morphological microglial activation in the rodent brain: involvement of interleukin-18. Neuroscience *146*, 1388–1399.

Sultana, S., Sernett, S.W., Bellin, R.M., Robson, R.M., and Skalli, O. (2000). Intermediate filament protein synemin is transiently expressed in a subset of astrocytes during development. Glia *30*, 143–153.

Sung, B., Lim, G., and Mao, J. (2003). Altered expression and uptake activity of spinal glutamate transporters after nerve injury contribute to the pathogenesis of neuropathic pain in rats. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *23*, 2899–2910.

Sweitzer, S.M., Schubert, P., and DeLeo, J.A. (2001). Propentofylline, a glial modulating agent, exhibits antiallodynic properties in a rat model of neuropathic pain. J. Pharmacol. Exp. Ther. *297*, 1210–1217.

T

Takeuchi, H., Jin, S., Wang, J., Zhang, G., Kawanokuchi, J., Kuno, R., Sonobe, Y., Mizuno, T., and Suzumura, A. (2006). Tumor necrosis factor-alpha induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. J. Biol. Chem. *281*, 21362–21368.

Talbot, J.D., Marrett, S., Evans, A.C., Meyer, E., Bushnell, M.C., and Duncan, G.H. (1991). Multiple representations of pain in human cerebral cortex. Science *251*, 1355–1358.

Tanabe, S., Heesen, M., Yoshizawa, I., Berman, M.A., Luo, Y., Bleul, C.C., Springer, T.A., Okuda, K., Gerard, N., and Dorf, M.E. (1997). Functional expression of the CXC-chemokine receptor-4/fusin on mouse microglial cells and astrocytes. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *159*, 905–911.

Tanaka, H., Katoh, A., Oguro, K., Shimazaki, K., Gomi, H., Itohara, S., Masuzawa, T., and Kawai, N. (2002). Disturbance of hippocampal long-term potentiation after transient ischemia in GFAP deficient mice. J. Neurosci. Res. *67*, 11–20.

Tanga, F.Y., Raghavendra, V., and DeLeo, J.A. (2004). Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. Neurochem. Int. *45*, 397–407.

Tanga, F.Y., Raghavendra, V., Nutile-McMenemy, N., Marks, A., and Deleo, J.A. (2006). Role of astrocytic S100beta in behavioral hypersensitivity in rodent models of neuropathic pain. Neuroscience *140*, 1003–1010.

Tasker R. R., 1982 Pain, Thalamic procedures. In: Schaltenbrand G., Walker A.E. (eds). Textbook of stereotaxy of the humain brain. Thieme, Stuttgart, p484-497.

Tawfik, V.L., Regan, M.R., Haenggeli, C., Lacroix-Fralish, M.L., Nutile-McMenemy, N., Perez, N., Rothstein, J.D., and DeLeo, J.A. (2008). Propentofylline-induced astrocyte modulation leads to alterations in glial glutamate promoter activation following spinal nerve transection. Neuroscience *152*, 1086–1092.

Taylor, D.L., Jones, F., Kubota, E.S.F.C.S., and Pocock, J.M. (2005). Stimulation of microglial metabotropic glutamate receptor mGlu2 triggers tumor necrosis factor alpha-induced neurotoxicity in concert with microglial-derived Fas ligand. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *25*, 2952–2964.

Tian, D., Xie, M., Yu, Z., Zhang, Q., Wang, Y., Chen, B., Chen, C., and Wang, W. (2007). Cell cycle inhibition attenuates microglia induced inflammatory response and alleviates neuronal cell death after spinal cord injury in rats. Brain Res. *1135*, 177–185.

Tikka, T., Fiebich, B.L., Goldsteins, G., Keinanen, R., and Koistinaho, J. (2001). Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *21*, 2580–2588.

Timmermann, L., Ploner, M., Haucke, K., Schmitz, F., Baltissen, R., and Schnitzler, A. (2001). Differential coding of pain intensity in the human primary and secondary somatosensory cortex. J. Neurophysiol. *86*, 1499–1503.

Toda, M., Asou, H., Miura, M., Toya, S., and Uyemura, K. (1994). GFAP transfected cells produce laminin, leading to neurite outgrowth promotion. Neuroreport *5*, 1969–1972.

Tozaki-Saitoh, H., Tsuda, M., Miyata, H., Ueda, K., Kohsaka, S., and Inoue, K. (2008). P2Y12 receptors in spinal microglia are required for neuropathic pain after peripheral nerve injury. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *28*, 4949–4956.

Treede, R.-D., Jensen, T.S., Campbell, J.N., Cruccu, G., Dostrovsky, J.O., Griffin, J.W., Hansson, P., Hughes, R., Nurmikko, T., and Serra, J. (2008). Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. Neurology *70*, 1630–1635.

Tremblay, M.-È., Lowery, R.L., and Majewska, A.K. (2010). Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. PLoS Biol. *8*, e1000527.

Tsubokawa, T., Katayama, Y., Yamamoto, T., Hirayama, T., and Koyama, S. (1991a). Chronic motor cortex stimulation for the treatment of central pain. Acta Neurochir. Suppl. (Wien) *52*, 137–139.

Tsubokawa, T., Katayama, Y., Yamamoto, T., Hirayama, T., and Koyama, S. (1991b). Treatment of thalamic pain by chronic motor cortex stimulation. Pacing Clin. Electrophysiol. PACE *14*, 131–134.

Tsubokawa, T., Katayama, Y., Yamamoto, T., Hirayama, T., and Koyama, S. (1993). Chronic motor cortex stimulation in patients with thalamic pain. J. Neurosurg. *78*, 393–401.

Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M.W., and Inoue, K. (2003). P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. Nature *424*, 778–783.

U

Ullian, E.M., Sapperstein, S.K., Christopherson, K.S., and Barres, B.A. (2001). Control of synapse number by glia. Science *291*, 657–661.

V

Verge, G.M., Milligan, E.D., Maier, S.F., Watkins, L.R., Naeve, G.S., and Foster, A.C. (2004). Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1) distribution in spinal cord and dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions. Eur. J. Neurosci. *20*, 1150–1160.

Vertes, R.P., Hoover, W.B., and Rodriguez, J.J. (2012). Projections of the central medial nucleus of the thalamus in the rat: node in cortical, striatal and limbic forebrain circuitry. Neuroscience *219*, 120–136.

Vestergaard-Poulsen, P., van Beek, M., Skewes, J., Bjarkam, C.R., Stubberup, M., Bertelsen, J., and Roepstorff, A. (2009). Long-term meditation is associated with increased gray matter density in the brain stem. Neuroreport *20*, 170–174.

Vierck, C.J., Hansson, P.T., and Yezierski, R.P. (2008). Clinical and pre-clinical pain assessment: are we measuring the same thing? Pain *135*, 7–10.

Villanueva, L., Desbois, C., Le Bars, D., and Bernard, J.F. (1998). Organization of diencephalic projections from the medullary subnucleus reticularis dorsalis and the adjacent cuneate nucleus: a retrograde and anterograde tracer study in the rat. J. Comp. Neurol. *390*, 133–160.

Visentin, S., Nuccio, C.D., and Bellenchi, G.C. (2006). Different patterns of Ca^{2+} signals are induced by low compared to high concentrations of P2Y agonists in microglia. Purinergic Signal. *2*, 605–617.

Vives, V., Alonso, G., Solal, A.C., Joubert, D., and Legraverend, C. (2003). Visualization of S100B-positive neurons and glia in the central nervous system of EGFP transgenic mice. J. Comp. Neurol. *457*, 404–419.

Vizuete, M.L., Venero, J.L., Vargas, C., Ilundáin, A.A., Echevarría, M., Machado, A., and Cano, J. (1999). Differential upregulation of aquaporin-4 mRNA expression in reactive astrocytes after brain injury: potential role in brain edema. Neurobiol. Dis. *6*, 245–258.

Vogt, B.A., Derbyshire, S., and Jones, A.K. (1996). Pain processing in four regions of human cingulate cortex localized with co-registered PET and MR imaging. Eur. J. Neurosci. *8*, 1461–1473.

Vos, B.P., Strassman, A.M., and Maciewicz, R.J. (1994). Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *14*, 2708–2723.

Voskuhl, R.R., Peterson, R.S., Song, B., Ao, Y., Morales, L.B.J., Tiwari-Woodruff, S., and Sofroniew, M.V. (2009). Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *29*, 11511–11522.

W

Wake, H., Moorhouse, A.J., Jinno, S., Kohsaka, S., and Nabekura, J. (2009). Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *29*, 3974–3980.

Wake, H., Moorhouse, A.J., Miyamoto, A., and Nabekura, J. (2013). Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. Trends Neurosci. *36*, 209–217.

Wall, P.D., Devor, M., Inbal, R., Scadding, J.W., Schonfeld, D., Seltzer, Z., and Tomkiewicz, M.M. (1979). Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. Pain *7*, 103–111.

Walton, N.M., Sutter, B.M., Laywell, E.D., Levkoff, L.H., Kearns, S.M., Marshall, G.P., Scheffler, B., and Steindler, D.A. (2006). Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. Glia *54*, 815–825.

Walz, W., and Lang, M.K. (1998). Immunocytochemical evidence for a distinct GFAP-negative subpopulation of astrocytes in the adult rat hippocampus. Neurosci. Lett. *257*, 127–130.

Wang, D.J.J., Rao, H., Korczykowski, M., Wintering, N., Pluta, J., Khalsa, D.S., and Newberg, A.B. (2011). Cerebral blood flow changes associated with different meditation practices and perceived depth of meditation. Psychiatry Res. *191*, 60–67.

Wang, W., Wang, W., Wang, Y., Huang, J., Wu, S., and Li, Y.-Q. (2008). Temporal changes of astrocyte activation and glutamate transporter-1 expression in the spinal cord after spinal nerve ligation-induced neuropathic pain. Anat. Rec. Hoboken NJ 2007 *291*, 513–518.

Wang, W., Wang, W., Mei, X., Huang, J., Wei, Y., Wang, Y., Wu, S., and Li, Y. (2009). Crosstalk between spinal astrocytes and neurons in nerve injury-induced neuropathic pain. PloS One *4*, e6973.

Wang, Y., Ying, G.-X., Liu, X., Wang, W.-Y., Dong, J.-H., Ni, Z.-M., and Zhou, C.-F. (2005). Induction of ephrin-B1 and EphB receptors during denervation-induced plasticity in the adult mouse hippocampus. Eur. J. Neurosci. *21*, 2336–2346.

Watkins, L.R., and Maier, S.F. (2003). Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. Nat. Rev. Drug Discov. *2*, 973–985.

Wei, X.-H., Wei, X., Chen, F.-Y., Zang, Y., Xin, W.-J., Pang, R.-P., Chen, Y., Wang, J., Li, Y.-Y., Shen, K.-F., et al. (2013). The upregulation of translocator protein (18 kDa) promotes recovery from neuropathic pain in rats. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *33*, 1540–1551.

Wells, J. (1966). The pathway from the dorsomedial thalamus to the frontal lobe. Exp. Neurol. *14*, 338–350.

Weng, H.R., Lee, J.I., Lenz, F.A., Schwartz, A., Vierck, C., Rowland, L., and Dougherty, P.M. (2000). Functional plasticity in primate somatosensory thalamus following chronic lesion of the ventral lateral spinal cord. Neuroscience *101*, 393–401.

Westenbroek, R.E., Bausch, S.B., Lin, R.C., Franck, J.E., Noebels, J.L., and Catterall, W.A. (1998). Upregulation of L-type Ca2+ channels in reactive astrocytes after brain injury, hypomyelination, and ischemia. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *18*, 2321–2334.

Whitaker-Azmitia, P.M., Clarke, C., and Azmitia, E.C. (1993). Localization of 5-HT1A receptors to astroglial cells in adult rats: implications for neuronal-glial interactions and psychoactive drug mechanism of action. Synap. N. Y. N *14*, 201–205.

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

Wiech, K., Farias, M., Kahane, G., Shackel, N., Tiede, W., and Tracey, I. (2008). An fMRI study measuring analgesia enhanced by religion as a belief system. Pain *139*, 467–476.

Wilhelmsson, U., Li, L., Pekna, M., Berthold, C.-H., Blom, S., Eliasson, C., Renner, O., Bushong, E., Ellisman, M., Morgan, T.E., et al. (2004). Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *24*, 5016–5021.

Wilhelmsson, U., Bushong, E.A., Price, D.L., Smarr, B.L., Phung, V., Terada, M., Ellisman, M.H., and Pekny, M. (2006). Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 17513–17518.

Willis, W.D., Al-Chaer, E.D., Quast, M.J., and Westlund, K.N. (1999). A visceral pain pathway in the dorsal column of the spinal cord. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 7675–7679.

Woods, T.M., Cusick, C.G., Pons, T.P., Taub, E., and Jones, E.G. (2000). Progressive transneuronal changes in the brainstem and thalamus after long-term dorsal rhizotomies in adult macaque monkeys. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *20*, 3884–3899.

Wu, C., Erickson, M.A., Xu, J., Wild, K.D., and Brennan, T.J. (2009). Expression Profile of Nerve Growth Factor after Muscle Incision in the Rat: Anesthesiology *110*, 140–149.

Wu, J., Raver, C., Piao, C., Keller, A., and Faden, A.I. (2013). Cell Cycle Activation Contributes to Increased Neuronal Activity in the Posterior Thalamic Nucleus and Associated Chronic Hyperesthesia after Rat Spinal Cord Contusion. Neurotherapeutics *10*, 520–538.

X

Xie, Y., Zhang, J., Petersen, M., and LaMotte, R.H. (1995). Functional changes in dorsal root ganglion cells after chronic nerve constriction in the rat. J. Neurophysiol. *73*, 1811–1820.

Xin, W.-J., Weng, H.-R., and Dougherty, P.M. (2009). Plasticity in expression of the glutamate transporters GLT-1 and GLAST in spinal dorsal horn glial cells following partial sciatic nerve ligation. Mol. Pain *5*, 15.

Xiong, Z. (2000). Enhanced Calcium Transients in Glial Cells in Neonatal Cerebellar Cultures Derived from S100B Null Mice. Exp. Cell Res. *257*, 281–289.

Y

Yamada, K., Nagakane, Y., Yoshikawa, K., Kizu, O., Ito, H., Kubota, T., Akazawa, K., Oouchi, H., Matsushima, S., Nakagawa, M., et al. (2007). Somatotopic organization of thalamocortical projection fibers as assessed with MR tractography. Radiology *242*, 840–845.

Yamamura, H., Iwata, K., Tsuboi, Y., Toda, K., Kitajima, K., Shimizu, N., Nomura, H., Hibiya, J., Fujita, S., and Sumino, R. (1996). Morphological and electrophysiological properties of ACCx nociceptive neurons in rats. Brain Res. *735*, 83–92.

Yamashiro, K., Mukawa, J., Terada, Y., Tomiyama, N., Ishida, A., Mori, K., Tasker, R.R., and Albe-Fessard, D. (1994). Neurons with high-frequency discharge in the central nervous system in chronic pain. Stereotact. Funct. Neurosurg. *62*, 290–294.

Yang, L., Zhang, F.-X., Huang, F., Lu, Y.-J., Li, G.-D., Bao, L., Xiao, H.-S., and Zhang, X. (2004). Peripheral nerve injury induces trans-synaptic modification of channels, receptors and signal pathways in rat dorsal spinal cord. Eur. J. Neurosci. *19*, 871–883.

Yang, Y., Ge, W., Chen, Y., Zhang, Z., Shen, W., Wu, C., Poo, M., and Duan, S. (2003). Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 15194–15199.

Yoshida, A., Dostrovsky, J.O., and Chiang, C.Y. (1992). The afferent and efferent connections of the nucleus submedius in the rat. J. Comp. Neurol. *324*, 115–133.

Z

Zeidan, F., Gordon, N.S., Merchant, J., and Goolkasian, P. (2010). The effects of brief mindfulness meditation training on experimentally induced pain. J. Pain Off. J. Am. Pain Soc. *11*, 199–209.

Zeidan, F., Martucci, K.T., Kraft, R.A., Gordon, N.S., McHaffie, J.G., and Coghill, R.C. (2011). Brain Mechanisms Supporting the Modulation of Pain by Mindfulness Meditation. J. Neurosci. *31*, 5540–5548.

Zeisel, A., Manchado, A.B.M., Codeluppi, S., Lonnerberg, P., La Manno, G., Jureus, A., Marques, S., Munguba, H., He, L., Betsholtz, C., et al. (2015). Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. Science.

Zemlan, F.P., Leonard, C.M., Kow, L.M., and Pfaff, D.W. (1978). Ascending tracts of the lateral columns of the rat spinal cord: a study using the silver impregnation and horseradish peroxidase techniques. Exp. Neurol. *62*, 298–334.

Zhang, null, Tang, null, Yuan, null, and Jia, null (1998). Inhibitory effects of glutamate-induced activation of thalamic nucleus submedius are mediated by ventrolateral orbital cortex and periaqueductal gray in rats. Eur. J. Pain Lond. Engl. *2*, 153–163.

Zhang, W., Wang, T., Pei, Z., Miller, D.S., Wu, X., Block, M.L., Wilson, B., Zhang, W., Zhou, Y., Hong, J.-S., et al. (2005). Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *19*, 533–542.

Zhang, X., Xu, Y., Wang, J., Zhou, Q., Pu, S., Jiang, W., and Du, D. (2012). The effect of intrathecal administration of glial activation inhibitors on dorsal horn BDNF overexpression and hind paw mechanical allodynia in spinal nerve ligated rats. J. Neural Transm. Vienna Austria 1996 *119*, 329–336.

Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S.A., Bennett, M.L., Scholze, A.R., O'Keeffe, S., Phatnani, H.P., Guarnieri, P., Caneda, C., Ruderisch, N., et al. (2014). An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. J. Neurosci. *34*, 11929–11947.

Zhang, Y.Q., Tang, J.S., and Yuan, B. (1996). Inhibitory effects of electrical stimulation of thalamic nucleus submedius on the nociceptive responses of spinal dorsal horn neurons in the rat. Brain Res. *737*, 16–24.

Zhao, P., Waxman, S.G., and Hains, B.C. (2006a). Sodium channel expression in the ventral posterolateral nucleus of the thalamus after peripheral nerve injury. Mol. Pain *2*, 27.

Zhao, P., Waxman, S.G., and Hains, B.C. (2007). Modulation of thalamic nociceptive processing after spinal cord injury through remote activation of thalamic microglia by cysteine cysteine chemokine ligand 21. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *27*, 8893–8902.

Zhao, W., Xie, W., Xiao, Q., Beers, D.R., and Appel, S.H. (2006b). Protective effects of an anti-inflammatory cytokine, interleukin-4, on motoneuron toxicity induced by activated microglia. J. Neurochem. *99*, 1176–1187.

Zhou, C., and Luo, Z.D. (2015). Nerve injury-induced calcium channel alpha-2-delta-1 protein dysregulation leads to increased pre-synaptic excitatory input into deep dorsal horn neurons and neuropathic allodynia. Eur. J. Pain Lond. Engl.

Zhuang, Z.-Y., Wen, Y.-R., Zhang, D.-R., Borsello, T., Bonny, C., Strichartz, G.R., Decosterd, I., and Ji, R.-R. (2006). A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *26*, 3551–3560.

Zhuang, Z.-Y., Kawasaki, Y., Tan, P.-H., Wen, Y.-R., Huang, J., and Ji, R.-R. (2007). Role of the CX3CR1/p38 MAPK pathway in spinal microglia for the development of neuropathic pain following nerve injury-induced cleavage of fractalkine. Brain. Behav. Immun. *21*, 642–651.

Zochodne, D.W., Misra, M., Cheng, C., and Sun, H. (1997). Inhibition of nitric oxide synthase enhances peripheral nerve regeneration in mice. Neurosci. Lett. *228*, 71–74.

Zonta, M., Angulo, M.C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K.-A., Pozzan, T., and Carmignoto, G. (2003). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. Nat. Neurosci. *6*, 43–50.

(1994). Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms (Seattle: IASP Press).

PUBLICATIONS

Author's personal copy

PAIN® 155 (2014) 275–291

www.elsevier.com/locate/pain

Cancer pain is not necessarily correlated with spinal overexpression of reactive glia markers

Vincent R.R. Ducourneau [a,b,1], Tiphaine Dolique [b,c,1], Sabira Hachem-Delaunay [a,b,2], Loïs S. Miraucourt [a,b,2], Aurélie Amadio [a,b], Lucie Blaszczyk [a,b], Florian Jacquot [d,e], Jennifer Ly [a,b], Laurent Devoize [d,e], Stéphane H.R. Oliet [a,b], Radhouane Dallel [d,e], Jean-Pierre Mothet [a,b], Frédéric Nagy [b,c], Valérie S. Fénelon [a,b,*,3], Daniel L. Voisin [a,b,*,3]

[a] *Neurocentre Magendie, INSERM U862, F-33000 Bordeaux, France*
[b] *Université Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France*
[c] *CNRS, IINS, UMR5297, F-33000 Bordeaux, France*
[d] *Clermont Université, Université d'Auvergne, NEURO-DOL, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France*
[e] *Inserm, U1107, F-63001 Clermont-Ferrand, France*

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

ARTICLE INFO

Article history:
Received 11 October 2012
Received in revised form 4 October 2013
Accepted 7 October 2013

Keywords:
Astrocyte
Bone cancer pain
GFAP
Microglia

ABSTRACT

Bone cancer pain is a common and disruptive symptom in cancer patients. In cancer pain animal models, massive reactive astrogliosis in the dorsal horn of the spinal cord has been reported. Because astrocytes may behave as driving partners for pathological pain, we investigated the temporal development of pain behavior and reactive astrogliosis in a rat bone cancer pain model induced by injecting MRMT-1 rat mammary gland carcinoma cells into the tibia. Along with the development of bone lesions, a gradual mechanical and thermal allodynia and hyperalgesia as well as a reduced use of the affected limb developed in bone cancer–bearing animals, but not in sham-treated animals. Dorsal horn Fos expression after nonpainful palpation of the injected limb was also increased in bone cancer–bearing animals. However, at any time during the evolution of tumor, there was no increase in glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in the dorsal horn. Further analysis at 21 days after injection of the tumor showed no increase in GFAP and interleukin (IL) 1β transcripts, number of superficial dorsal horn S100β protein immunoreactive astrocytes, or immunoreactivity for microglial markers (OX-42 and Iba-1). In contrast, all these parameters were increased in the dorsal horn of rats 2 weeks after sciatic nerve ligation. This suggests that in some cases, bone cancer pain may not be correlated with spinal overexpression of reactive glia markers, whereas neuropathic pain is. Glia may thus play different roles in the development and maintenance of chronic pain in these 2 situations.

© 2013 International Association for the Study of Pain. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pain can have an extremely disruptive influence on the quality of life of cancer patients [27]. A total of 75% to 90% of advanced or terminal cancer patients must cope with chronic pain syndromes related to metastatic tumors, most of which involve bone, or advanced cancer [22,39]. As such, bone is the most common site of pain in patients with metastatic breast, prostate, kidney, lung, and thyroid cancers [4]. Bone cancer pain thus represents a serious clinical problem, with breakthrough pain and pain associated with movement being particularly difficult to treat [44,58]. There is a need, therefore, to elucidate the molecular and cellular mechanisms operating within the nervous system to produce bone cancer pain. Over the last decade, animal models that mirror the clinical picture of patients with bone cancer pain have been developed [34]. They have shown that a key factor in bone cancer pain is the relationship of the sensory neurons to the tumor itself and also to the bone. This implies a combination of ischemia and tumor-induced injury of primary afferent sensory neurons plus peripheral sensitization as a result of release of a variety of factors by the tumor and associated immune cells [2,37,52]. In addition, changes in bone turnover and bone microenvironment such as acidosis also

* Corresponding authors. Address: Inserm U862, Neurocentre Magendie, Université Bordeaux Segalen, 146 rue Léo-Saignat, F-33077 Bordeaux, France. Tel.: +33 5 57 57 37 35; fax: +33 5 57 57 37 50.
E-mail addresses: valerie.fenelon@inserm.fr (V.S. Fénelon), daniel.voisin@inserm.fr (D.L. Voisin).
[1] VRRD and TD contributed equally to the work as first authors.
[2] SHD and LSM contributed equally to the work as second authors.
[3] VSF and DLV contributed equally to the work as senior authors.

0304-3959/$36.00 © 2013 International Association for the Study of Pain. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2013.10.008

Author's personal copy

contribute to the peripheral mechanisms of bone cancer pain [10]. In parallel, central sensitization develops, as shown by alteration in superficial dorsal horn neuron excitability, increased Fos expression and dynorphin immunoreactivity in the dorsal horn [19,43,45]. Finally, several authors have reported that a key feature of bone cancer pain models is the massive-reactive astrogliosis that occurs in the dorsal horn of the spinal cord [9,12,14,15,23,26,30,41–43,45,51,59,62].

Astrocytes have been considered traditionally ancillary satellite glial cells of the nervous system. Over the last decade, however, a body of evidence has accumulated describing the role of astrocytes in regulating synaptic transmission [6,33,36,50]. Recent studies also suggest that astrocytes potentially contribute to chronic pain. In response to trauma to or inflammation of peripheral nerves resulting in neuropathic pain, spinal cord astroglia are often activated [7,31]. This is reflected by increased expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) by astrocytes [3,8,12,38,54]. In these models, reactive astrogliosis, often referred to as astroglial activation, correlates with behavioral hyperalgesia, and conversely astroglial functional inhibition attenuates pain hypersensitivity. Upon activation, astrocytes can release a variety of signaling molecules, including proalgesic cytokines [7,11]. Astrocyte activation also leads to down-regulation of glutamate transporter activity, changes in gap junction proteins, and alterations in the blood–brain barrier [42]. All these changes may in turn contribute to pain mechanisms. However, the exact relation of reactive astrogliosis with bone cancer pain symptoms is unknown.

As a first step to uncover this relation, we investigated the temporal development of pain behavior and glia activation in a rat bone cancer pain model induced by injecting MRMT-1 rat mammary gland carcinoma cells into the tibia. Our negative findings in this model suggest that reactive changes of glial cells may not always be essential for bone cancer pain to be present.

2. Methods

2.1. Cell culture

Mammary rat metastasis tumor (MRMT-1) cells (carcinoma) were kindly provided by the Cell Resource Center for Biomedical Research Institute of Development, Aging and Cancer (Tohoku University, Sendai, Japan) and collected in RPMI 1640 medium (Gibco, Fisher Scientific, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (heat inactivated), 1% L-glutamine, and 2% penicillin/streptomycin (Gibco, Fisher Scientific, France). Cells were detached by brief exposure to 0.1% w/v trypsin–EDTA (Gibco, Fisher Scientific, France) and prepared for injections. Briefly, cells were pelleted by centrifugation (8 min at 1000 rpm, 18°C), rinsed with 10 mL of Hanks balanced salt solution (HBSS) exempt of calcium, magnesium, or phenol (Gibco, Fisher Scientific, France), and further centrifuged in the same conditions. The pellet was finally resuspended in 1 mL of HBSS, and cells were counted with a hemocytometer. Cells were diluted to achieve a final concentration for injection of 3×10^4 cells in 10 μL and maintained on ice before surgery.

2.2. Animals

Adult rats (150–175 g) were obtained from Janvier (France) and maintained in a controlled environment (lights on 07:00–19:00, 22°C) with food and water freely available. They were housed 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 22 September 2010 (2010/63/EU). The project was approved by the Bordeaux Ethical Committee (CEEA50) under no. 50120164-A. Rats were acclimatized for 4 days to the animal facility and for 5 days to manipulations and devices before behavioral studies.

2.3. Surgery

Surgery was performed on all rats under gaseous anesthesia with a mixture of isoflurane (5% for induction and 2% for maintenance) and a 1:1 flow ratio of air/O_2 (1 L/min for induction and 0.5 L/min for maintenance). Before skin incision and at the time of wound closing, a local anesthesia was also provided (2% lidocaine). The rats resumed normal activity within 30 min after termination of the gaseous anesthesia. All rats were treated with antibiotics at days 0, 1, and 2 (6.25% sulfadoxine + 1.25% trimethoprime, 100 μL i.m.).

Virgin female Sprague Dawley rats were used in the bone cancer model experiments. According to the procedure described by Medhurst et al. [30], the right leg of the anesthetized rat was shaved and the skin was disinfected with 10% Betadine. A 1.5-cm rostrocaudal incision was made in the skin over the top half of the tibia. The tibia was carefully exposed with minimal damage to the muscle or blood vessels. Using a 26-gauge needle, the bone was pierced 5 mm below the knee joint distal to the epiphysial growth plate. The needle was inserted at an angle to enable it to be pushed down in the intramedullary canal of the bone. The needle was then removed and replaced with a long thin needle attached to a 10 μL Hamilton syringe (code 701 RN) containing the cells to be injected. A volume of 10 μL of cancer cells or vehicle (HBSS solution only) was injected into the bone cavity. As the plunger in the syringe was slowly pushed down, the needle was simultaneously lifted out of the bone to enable the cells to fill the space left in the bone cavity, taking care that no leakage of cells occurred outside the bone. After injection, the site was closed with bone wax (Phymep, France). The wound was then closed with metal skin clips (AMS, France).

Male Wistar rats were used in the spinal nerve ligation (SNL) model experiments. The right L4 and L5 spinal nerves were isolated and tightly ligated with a 6.0 polyamide thread (Ethicon, France). After complete hemostasis, the incision was closed by using metal skin clips (AMS, France). Sham-treated rats underwent the same procedure, but the spinal nerves were not ligated.

2.4. Radiological analysis

Digital radiographs were performed on fixed paws using the X-Mind DC generator (Satelec, France) fitted with a Toshiba DG-073B-AC tube (intensity 8 mA, voltage 70 kV). The exposure time was 0.5 s. The image plates were scanned with the Vistascan system (Dürr Dental, Germany). Radiological scores were given on the basis of careful blinded analysis of radiographs, taken from the ipsilateral leg of MRMT-1 cell–treated and vehicle-treated animals. All scores relate to the tibia (bone): 0, normal bone structure without any sign of deterioration; 1, small radiolucent lesions in the proximal epiphysis; 2, loss of medullary bone; 3, loss of medullary bone plus erosion of cortical bone; 4, loss of medullary bone plus loss of cortical bone (Fig. 1A).

2.5. Behavioral studies

In addition to behavioral measurements, cancer rats and related control rats were monitored for changes in body weight and core temperature.

Mechanical allodynia and hyperalgesia were measured at the hind paw using responses to von Frey filament stimulation according to the following method. Mechanical stimulation was carried

Author's personal copy

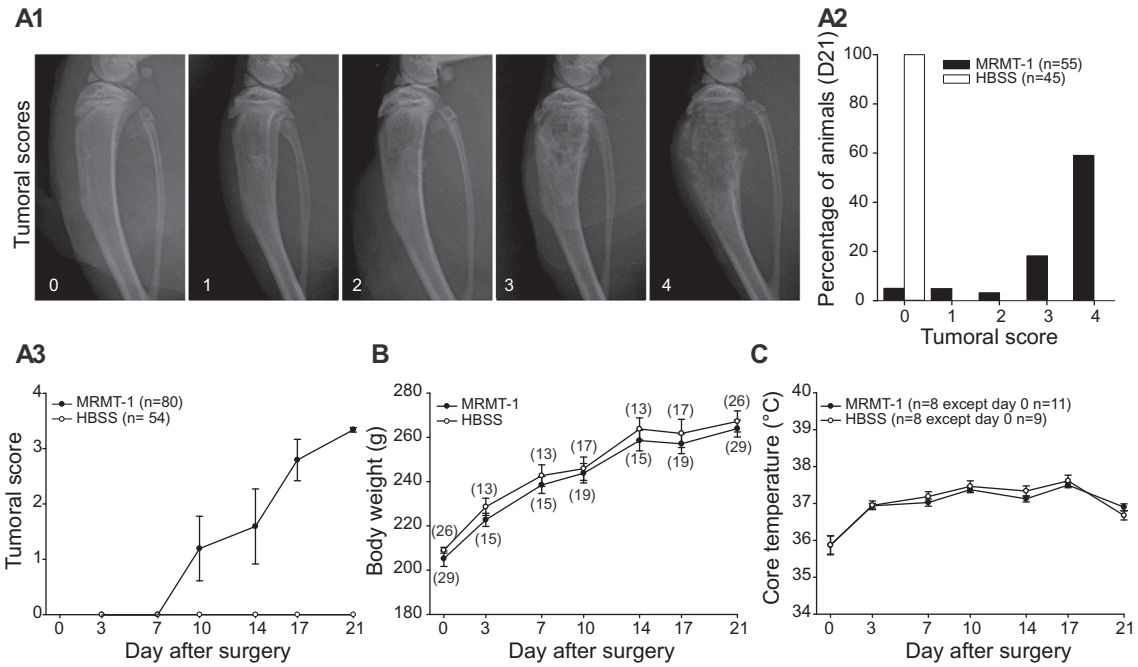


Fig. 1. Radiological analysis of tumor development in the tibia (A) and general health of rats (B, C). (A1) Examples of bone lesions illustrating the different tumor scores: 0, normal bone structure; 1, small lesion of the proximal epiphysis; 2, demineralization with loss of bone medulla; 3, loss of bone medulla and cortical erosion; 4, medullar and cortical lesions. (A2) Tumor score percentages in cancer rats (black bars) and in control animals injected with HBSS (white bar). (A3) Time course of changes in the mean tumor scores after injection of cancer cells (solid circles) or HBSS (open circles). In cancer rats, the first signs of a bone lesion appear at day 10. HBSS-injected animals showed no sign of bone lesion. (B) Growth-induced rat body weight changes after injection of cancer cells (solid circles) or HBSS (open circles). No significant difference was detected during the 21-day period between the 2 experimental groups. (C) Core body temperature of rats after injection of cancer cells (solid circles) or HBSS (open circles). No significant difference was detected during the 21-day period between the 2 experimental groups.

out with von Frey filaments with progressively incremental stiffness that deliver force to the hind paw measured in grams (range 0.008–100 g). The test environment consisted of a clear acrylic box, 32 cm long, 22 cm wide, and 34 cm high, which was situated on a wire mesh platform. During testing, the rat was placed in the test box and allowed to settle for 10 min. Each von Frey filament was applied to the plantar surface of the hind paw in ascending order, beginning with the 0.008 g filament. A single trial consisted of 5 applications of the filament within a 1-min period.

In all cases, the behavioral responses were observed and quantified by the evaluating experimenter who was blinded to the experimental group. A rat response to mechanical stimulation was scored according to the following elements: (1) detection—rats slightly contract their leg muscles without any actual movement; (2) withdrawal reaction; (3) escape—rats withdraw and avoid further contact with the stimulus by moving their body away from the stimulus; and (4) licking/biting of the stimulated paw after withdrawal. A score of 0 was given in cases of absence of response. A mean score value was then calculated for each stimulation series.

Because each von Frey filament was applied 5 times, the first mean score value above detection was 1.2 and was used to calculate the nociceptive response threshold. Accordingly, this score value corresponds to the stimulus intensity at which more than 50% of withdrawal responses could be observed over 5 responses. Calculation of the nociceptive response threshold used a simple linear approximation of the score value between the first von Frey hair value, giving a score above 1.2 and the previous von Frey hair value.

To quantify mechanical hyperalgesia, the difference between the areas under the response curves obtained before (day 0) and after surgery was used (Fig. 2C). It was called the hyperalgesia score. In both cases, areas were measured from above the value of the threshold that was measured at day 0 and from above 1.2 behavioral score value.

To quantify mechanical allodynia, shifts in nociceptive response threshold were measured. An allodynia score was also calculated as the surface area under the response curve obtained after surgery and taken below the value of the threshold that was measured at day 0 and from above the 1.2 behavioral score value (Fig. 2C).

Heat allodynia and hyperalgesia were assessed by using a computer-controlled hot plate analgesia meter (Bioseb, France). Animals were placed on the dynamic hot plate at 30°C, and the plate temperature increased up to 45°C in 1°C min^{-1} increments. During each degree interval, we scored hind paw lickings and paw withdrawals. The sum of the paw lickings and paw withdrawals was used as index of nociceptive response [56]. For each recording day, nociceptive responses were expressed as percentage of the maximal nociceptive responses obtained at 45°C in control rats.

Cold allodynia was assessed by application of a drop of acetone with a syringe to the back of the plantar surface of the hind paw, alternating between ipsilateral and contralateral sides. A total of 5 applications were made to each hind paw with at least 5 min separating each. The number of withdrawals was expressed as a percentage of maximum response.

To evaluate limb discomfort and incident pain upon movement in bone cancer rats, weight bearing was evaluated by using the dynamic weight-bearing (DWB) test. The DWB device (Bioseb, France) consisted of a clear Plexiglas enclosure (24 cm long, 24 cm wide, and 32 cm high) with a floor sensor composed of 1936 captors. The rat was allowed to move freely within the apparatus for 5 min while a video recording of the test was made (no acclimatization was performed before the initial testing period in order to maximize exploratory behaviors). Live recordings were

Author's personal copy

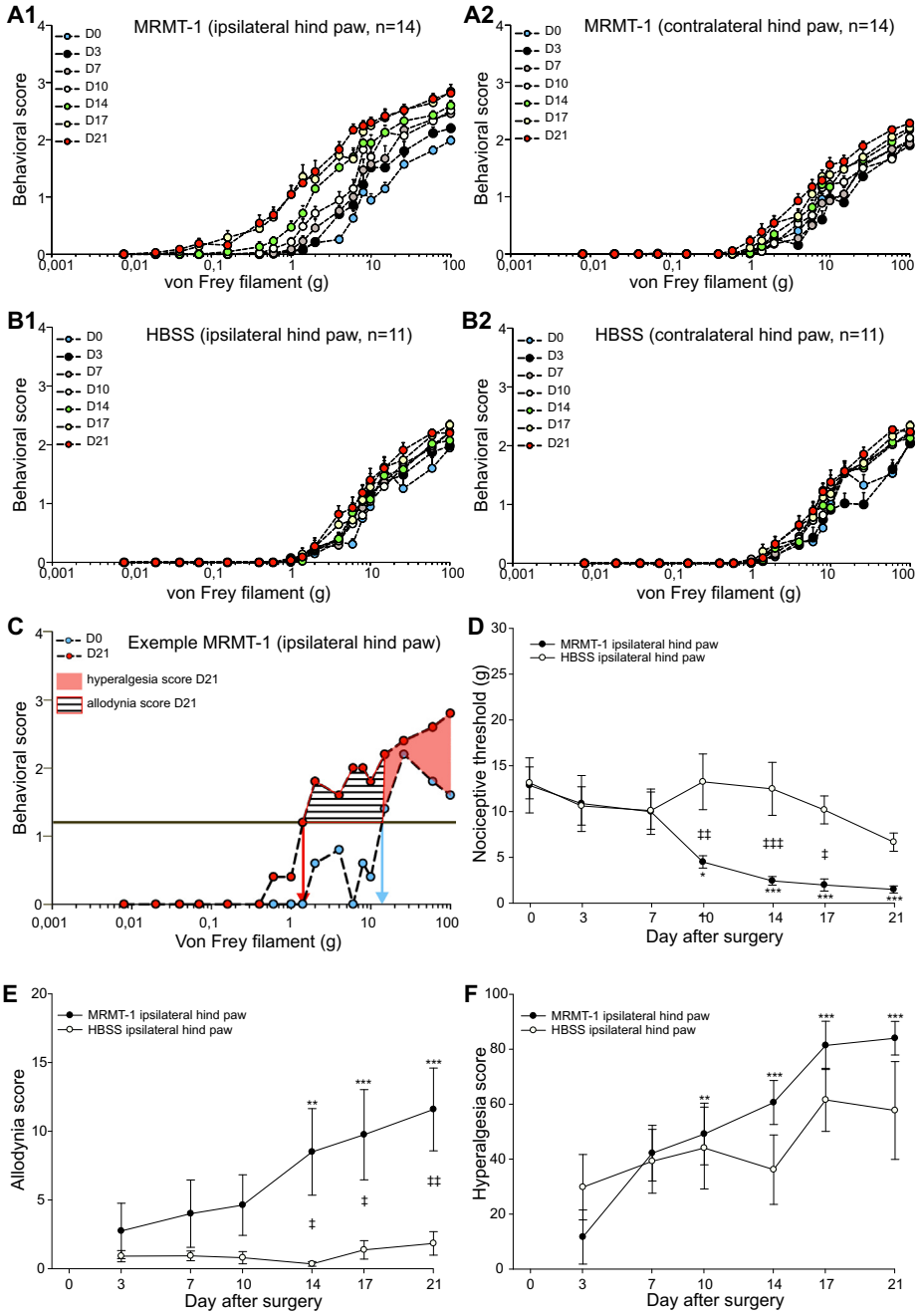


Fig. 2. Time course of development of mechanical static allodynia and hyperalgesia in cancer rats. (A) Behavioral responses of cancer rats (MRMT-1, $n = 14$) to von Frey hair stimuli applied on the plantar surface of the hind paw ipsilateral (A1) and contralateral (A2) to the tumor, from day 0 (presurgical baseline data) to day 21 after injection of cancer cells. The profiles show mean (±SEM) behavioral scores measured after 5 stimulations at the indicated intensity. Note that the curves are markedly shifted to the left for the ipsilateral hind paw and to a lesser extent for the contralateral hind paw. (B) Behavioral scores of control rats injected with culture medium (HBSS, $n = 11$) to von Frey hair stimulations on the plantar surface of the hind paw ipsilateral (B1) and contralateral (B2) to the injection site, from day 0 (presurgical baseline data) to day 21 after injection of the HBSS. Control animals did not develop mechanical sensitization. (C) Illustration of the hyperalgesia and allodynia scores. The pink area gives the hyperalgesia score and the striped area gives the allodynia score (see Methods). (D) Evolution with time of the nociceptive threshold of the ipsilateral hind paw of MRMT-1 (solid circles) and HBSS (open circles) rats. The nociceptive threshold of HBSS rats is not significantly altered over time. In contrast, MRMT-1 rats display a significant decrease in their nociceptive threshold beginning on day 10 and onward compared to day 0 ($^{*}P < .05$; $^{***}P < .001$). At day 10 and onward, the nociceptive threshold of MRMT-1 rats is significantly diminished compared to that of HBSS rats ($^{‡}P < .05$, $^{‡‡}P < .01$, $^{‡‡‡}P < .001$). Cancer rats display a static mechanical allodynia. E) Evolution with time of the allodynia score of the ipsilateral hind paw of MRMT-1 (solid circles) and HBSS (open circles) rats. The allodynia score of HBSS rats is not significantly altered over time. In contrast MRMT-1 rats display a significant increase in their allodynia score beginning on day 14 and onward compared to day 0 ($^{**}P < .01$; $^{***}P < .001$). At day 14 and onward the allodynia score of MRMT-1 rats is significantly increased compared to that of HBSS rats ($^{‡}P < .05$; $^{‡‡}P < .01$). Cancer rats do display a static mechanical allodynia. (F) Evolution with time of the hyperalgesia score of the ipsilateral hind paw of MRMT-1 (solid circles) and HBSS (open circles) rats. The hyperalgesia score of HBSS rats is not significantly altered over time. In contrast, MRMT-1 rats display a significant increase in their hyperalgesia score beginning on day 10 and onward compared to day 0 ($^{**}P < .01$, $^{***}P < .001$). However, the hyperalgesia score of MRMT-1 rats is not different from the one of HBSS rats at any given time point. Cancer rats display a static mechanical hyperalgesia.

transmitted to a computer via a USB interface and analyzed with DWB1.3.4.36 software (Bioseb, France). A paw was detected when 1 captor recorded a weight of at least 4 g and a minimum of 3 adjacent captors recorded a weight of at least 1 g. The paw was included when the recorded weight was stable for a minimum of 0.8 s. Using the video recording of the test, an experimenter vali-

Author's personal copy

dated each presumed paw as left or right and fore or hind paw. A mean value of the weight borne by each limb was calculated for the whole validated testing period and expressed as percentage of the animal weight.

2.6. Immunohistochemistry

Fos and GFAP expression after—or without—a 15-min period of normally nonnoxious palpation of the hind paw performed under urethane anesthesia (1.5 g/kg, i.p.) were measured in cancer and control rats at day 21 after surgery. Animals were humanely killed 90 min later.

In all cases, rats were killed under deep anesthesia with urethane (1.5 g/kg, i.p.) 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 spinal cord was then removed and transferred into 0.05 M Tris-buffered saline (TBS) containing 30% sucrose for cryoprotection and 0.05% sodium azide for conservation and left at 4°C until use. Coronal sections (30 μm) were cut on a freezing microtome from L4 and L5 spinal cord segments for bone cancer and neuropathic models, respectively, with a cryomicrotome (Microm, Germany). All following steps were performed at room temperature and under gentle agitation. Tissue sections were rinsed 3 times for 10 min in TBS and then incubated with the primary antiserum overnight. After incubation, tissue sections were washed 2 times for 10 min in TBS and incubated in the appropriate secondary antibody solution for 30 min to 2 h. All primary antibodies were diluted in TBS containing 0.25% Triton X-100 and 1% normal goat serum (except for S100β, for which 10% normal goat serum was used). All secondary antibodies were diluted in TBS containing 0.25% Triton X-100. To homogenize experimental conditions, each sequence of cutting and antibody incubation included animals from different groups and the immunohistochemical sequences were run consecutively.

For immunodetection of astrocytic markers, we used a rabbit antiserum raised against glial fibrillary acidic protein (GFAP; 1:1,000; catalog no. Z0334; Dako, France) or a monoclonal mouse antibody directed against protein S100 β-subunit (S100β; 1:10,000; clone SH-B1; catalog no. S2532; Sigma-Aldrich, USA). For immunodetection of microglia markers, we used a monoclonal mouse antibody directed against CD11 b/c (OX-42; clone MRC OX-42; 1:2,000; catalog no. CL042AP1; Cedarlane, Canada) or a rabbit antiserum raised against a synthetic peptide corresponding to the C-terminus of ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba-1; 1:2,000; catalog no. 019-19741; Wako, Japan). Secondary antisera were goat IgGs linked to cyanine 3 (Cy3; 1:300; Jackson Immunoresearch Laboratories, USA) except for the detection of OX-42 for which we used goat IgGs linked to Alexa 546 (1:1,000; Invitrogen SARL, France). The sections treated with these antibodies were mounted on gelatin-coated slides and coverslipped with Vectashield (Vector Laboratories, USA).

To visualize activated neurons, we used a rabbit antiserum raised against a peptide corresponding to the N-terminus of human c-Fos p62 (Fos; 1:50,000; catalog no. sc-52; Santa Cruz Biotechnology) followed by biotinylated goat anti-rabbit IgGs (1:400; Vector Laboratories, USA) and avidin–biotin–peroxidase procedure. Visualization was performed using the Vectastain ABC kit followed by the peroxidase substrate kit DAB (both from Vector Laboratories, USA). Sections were rinsed in TBS several times, between and after incubations. Finally, sections were transferred onto gelatinized slides before being coverslipped with DPX mountant for histology.

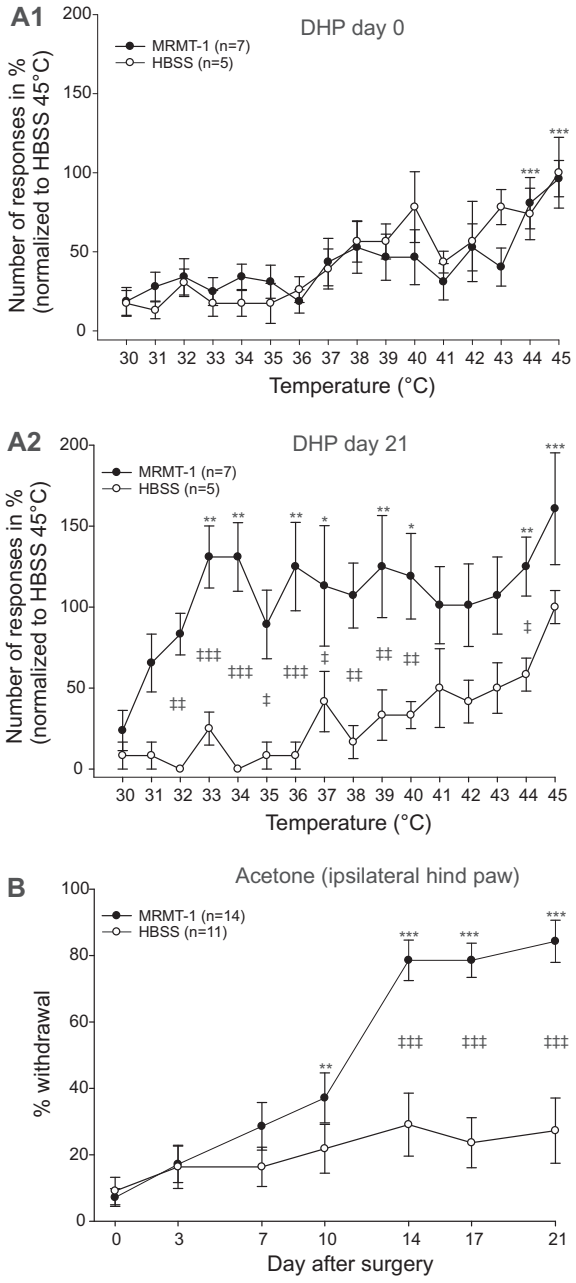


Fig. 3. Progressive development of cold allodynia and heat allodynia and hyperalgesia in cancer rats. (A) Sum of responses (paw licking and withdrawal) for the dynamic hot place (DHP) tests in cancer (solid circles) and HBSS (open circles) rats at day 0 (A1) and day 21 (A2). Responses were normalized to the responses obtained at 45°C in HBSS rats. At day 0 (A1), responses of cancer and HBSS rats are not significantly different. They both express a higher number of responses to heat at 44°C and 45°C compared to the starting temperature (***$P < .001$). At day 21 (A2), cancer rats display a higher number of responses to heat at 33°C and onward compared to starting temperature (*$P < .05$, **$P < .01$, ***$P < .001$). Therefore, cancer rats display nociceptive behavior at innocuous temperatures: they develop heat allodynia. In addition, the number of responses to noxious temperature (44°C) obtained in cancer rats was higher to the one obtained in HBSS rats ($^{‡}P < .05$). Cancer rats develop heat hyperalgesia. (B) Evolution with time of the percentage of ipsilateral foot withdrawal in response to 5 cooling stimuli (a drop of acetone). Responses in MRMT-1 are significantly higher from day 10 and onward compared to day 0 (***$P < .001$). Responses are not significantly altered in HBSS over time. Responses in MRMT-1 are significantly higher from day 14 and onward compared to responses in HBSS at the same time ($^{‡‡‡}P < .001$). Therefore, cold allodynia develops in cancer rats.

Author's personal copy

2.7. Quantification

Shortly after being processed, sections stained with a given antibody were photographed by a single experimenter with microscope and video camera settings fixed once for all. Sections stained for GFAP were observed on an inverted Leica DMI 600 (Leica Microsystems, Germany) equipped with a Quantem camera (Photometrics, USA), while sections stained for OX-42, S100β, and Iba-1 were observed on a Leica DM5000 microscope (Leica Microsystems, Germany) coupled with a Coolsnap HQ2 camera (Photometrics, USA). These systems were driven by Metamorph software (Molecular Devices). In these cases, a HC PL APO CS 20× dry 0.7 NA objective was used. The technique of scan slide was used in order to visualize and reconstruct a large field of view. The mosaics were performed with a monitored stage Scan IM (Märzhäuser, Germany). Sections stained for Fos were observed on a Zeiss Axiophot 1 and photographed at 10× with a Leica DFC300X video camera.

For GFAP, OX-42, and Iba-1 immunofluorescence, morphometric analysis was performed with the Metamorph 7.0 program [32]. The procedure consisted of 3 steps: (1) background subtraction, (2) thresholding, and (3) morphometric calculations in delineated laminae. Thresholding of images was made to obtain positive vs negative pixel in a 0 to 65,535 grayscale. Before performing the thresholding, a threshold that did not affect either the complexity or the integrity of the cell was determined on each image for a given antibody and expressed as a percentage of the maximum intensity detected on an individual image. Then the mean of the threshold of each individual image was calculated and applied on all sections for a given antibody when morphometric measurements were automated on Metamorph software after delineation and discrimination of spinal cord laminae I–II, III–IV and V as well as the whole ventral horn. Each section was taken at a given rostrocaudal plane within L4 and L5 spinal cord segments for bone cancer model and neuropathic model, respectively. For each section, the total area superficies of immunofluorescence as well as the total area superficies of the delineated areas were calculated. Values were expressed in percentages, and for each rat, the mean of the percentage values obtained on 5 different sections was calculated. The percentage value thus represents the proportion of the surface that is GFAP, OX-42, or Iba-1 immunopositive.

For Fos and protein S100β immunoreactivity, counts were made by ImageJ software with a visual control on the section observed on a Zeiss Axiophot 1 epifluorescence microscope. Fos-immunoreactive nuclei and protein S100β immunopositive astrocyte cell bodies were counted in each rat according to their location in the different laminae of the spinal cord from 7 and 5 different sections, respectively, each taken at a given rostrocaudal plane from L4 and L5 spinal cord segments for the bone cancer and neuropathic models, respectively. Minimal intervals of 180 μm between planes ensured that cells were counted only once. Counts were performed by an experimenter who was blinded to the experimental group. Counts were expressed in functionally related laminae as the mean number of labeled cells counted from all 7 sections that were analyzed in each animal for Fos and as the mean number of labeled cells counted from all 5 sections that were analyzed in each animal per surface area unit for protein S100β.

2.8. Quantitative RT-PCR

For RNA extraction, the lumbar ipsilateral dorsal horn was dissected. Total RNA was purified with the TRI Reagent (Sigma-Aldrich, USA) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 1 μg of total RNA using the RevertAid H Minus first strand synthesis kit (Fermentas, USA) and oligo-dT primers.

Polymerase chain reaction (PCR) amplification for GFAP was performed on a DNA Engine Opticon2 fluorescence detection System (MJResearch/BioRad, USA) with primer pair designed to span exon boundaries and to generate amplicons of ~80 bp (5′ to 3′): GFAP forward AATGACTATCGCCGCCAACT, reverse CTCCTGGTAACT CGCCGACT. The DyNAmo SYBR Green qPCR kit (Finnzymes, USA) was used with the following PCR amplification cycles: initial denaturation, 95°C for 15 min, followed by 40 cycles with denaturation, 95°C for 20 s, and annealing–extension, 61°C for 35 s.

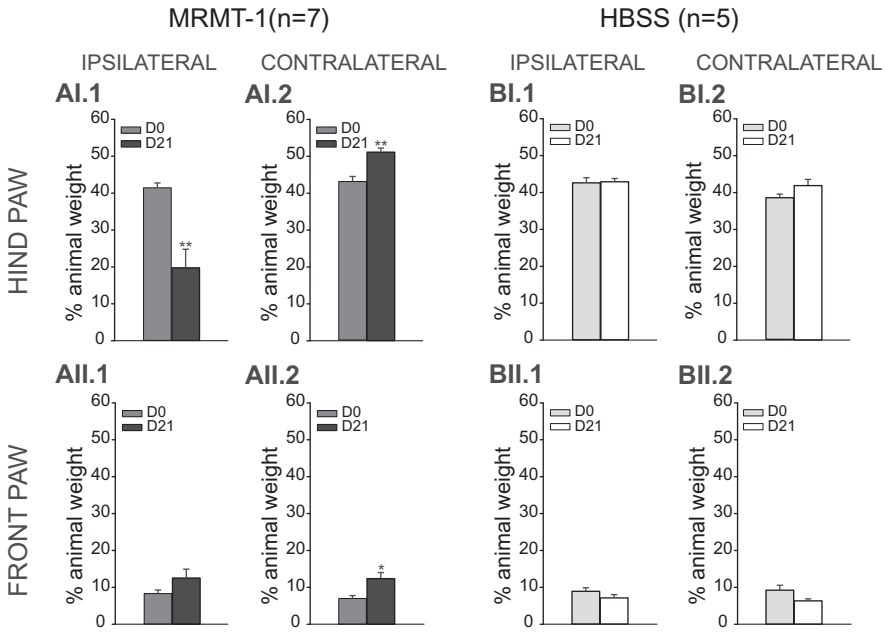


Fig. 4. Weight-bearing impairment in cancer rats. The percentage of animal weight distributed on the ipsilateral (.1) and contralateral (.2) hind (I) and front (II) paws in cancer (A) and HBSS (B) rats during a 5-min observation was measured at day 0 and day 21. In cancer rats, at day 21, the percentage of the animal weight borne on the ipsilateral hind paw injected with MRMT-1 cells was significantly decreased, and the percentage of the animal weight borne on the contralateral hind and front paws significantly increased compared to day 0 ($^{*}P < .05$, $^{**}P < .01$, paired t tests). No significant weight-bearing impairment was observed in HBSS rats between day 0 and day 21 for any paw.

Author's personal copy

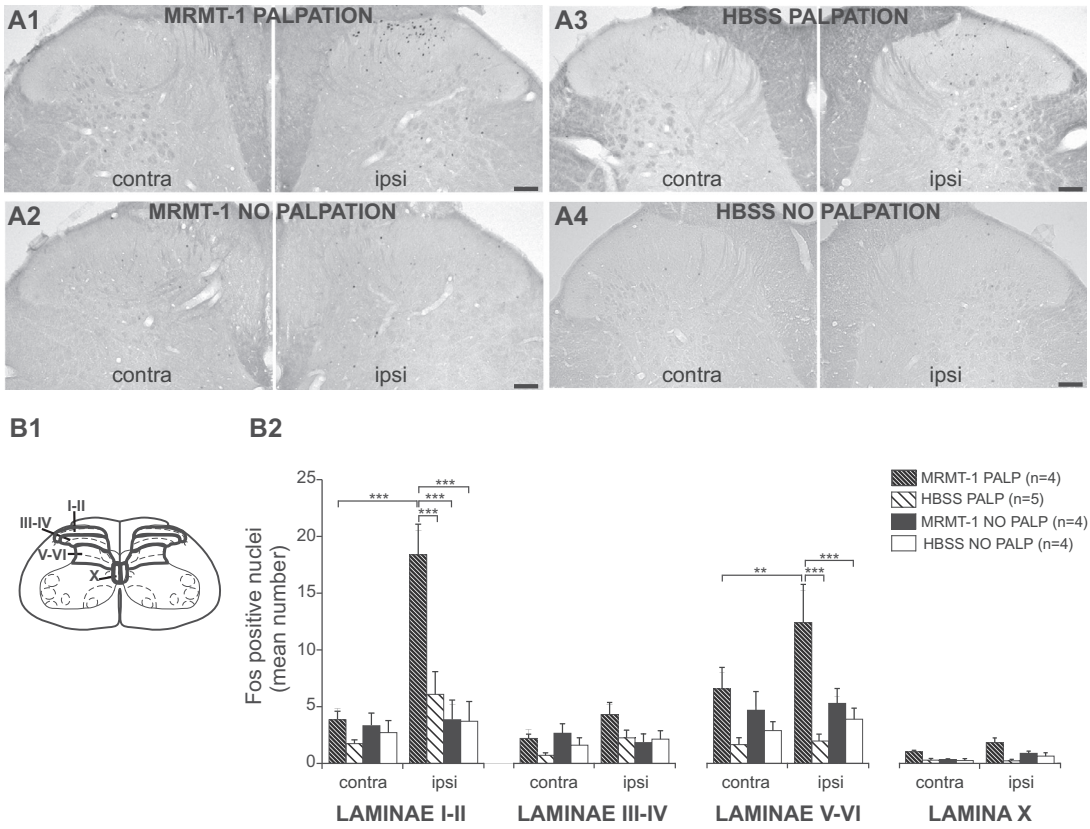


Fig. 5. Fos expression reveals dorsal horn sensitization in cancer rats. (A) Examples of Fos immunostaining in the dorsal horn of contralateral (contra) and ipsilateral (ipsi) L4 spinal cord segment of MRMT-1 (A1 and A2) and HBSS animals (A3 and A4), with (A1 and A3) or without palpation (A2 and A4) of the ipsilateral paw. Note that there is an increase in Fos immunostaining in the ipsilateral side of MRMT-1 animals that received palpation (scale bar, 100 μm). (B1) Delineation of the spinal cord laminae in which the number of Fos positive nuclei was counted: laminae I–II, III–IV, V–VI, and lamina X. (B2) There is a statistically significant increase in the number of Fos positive nuclei in the ipsilateral laminae (I–II and V–VI) of MRMT-1 PALP animals (that received palpation) compared to the contralateral laminae of MRMT-1 PALP animals (dark stripes; $^{**}P < .01$; $^{***}P < .001$). Note that there is also a statistically significant increase in the ipsilateral laminae I–II and V–VI of MRMT-1 PALP animals compared to the ipsilateral laminae of HBSS PALP (light stripes; $^{***}P < .001$).

PCR amplification for interleukin-1 beta (IL-1β), tumor necrosis factor alpha (TNF-α), chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2/MCP1), and mitogen-activated protein kinase 8 (MAPK8) was performed on a LightCycler LC 480-II (Roche, Switzerland) with primer pairs designed to span exon boundaries and to generate amplicons of ~100 bp (5′ to 3′): IL-1β forward AAGCCAACAAGTGGTATTCTC, reverse TGCCGTCTTTCATCACAC; TNF-α forward CGTCGTAGCAAACCACCA, reverse TTGTCTTTGAGATCCATGCCA; CCL2/MCP1 forward GAAGCTGTAGTATTTGTC ACCA, reverse GTACTTCTGGACCCATTCCT and MAPK8 forward TCTCCTTTAGGTGCAGCAG, reverse GTCATTGACAGACGGCGA. LightCycler 480 SYBR Green I master mix (Roche) was used with the following PCR amplification cycles: initial denaturation, 95°C for 5 min, followed by 40 cycles with denaturation at 95°C for 10 s, annealing at 61°C for 15 s, and extension at 72°C for 20 s.

For all experiments, primer sets were tested by quantitative reverse transcription (qRT) PCR and gel electrophoresis for the absence of primer-dimer artifacts and multiple products. Triplicate (DNA Engine Opticon2 fluorescence detection System) or duplicate (LightCycler LC 480-II) qRT-PCRs were performed twice for each sample using transcript-specific primers (600 nM) and cDNA (10 ng) in a final volume of 10 μL. A dissociation curve was generated at the end of the 40th cycle to verify that a single product was amplified. The Ct value of the gene was normalized against that of succinate dehydrogenase complex subunit A (SDHA) (5′ to 3′: forward TGCGGAAGCACGGAAGGAGT, reverse CTTCTGCTGGCCC TCGATGG). The relative level of expression was calculated using the comparative ($2^{\Delta\Delta CT}$) method [25].

2.9. Western blot testing

Anesthetized rats were killed by decapitation. The spinal cord was removed from the spine after laminectomy; the L4 ipsilateral dorsal quadrant was dissected and immediately flash frozen on dry ice. Spinal cord dorsal quadrant tissues were homogenized in ice-cold lysis buffer (HEPES 5 mM with sucrose 0.32 M, MgCl 2 1 mM, EGTA 2 mM, phenylmethanesulfonyl fluoride 0.1 mM, Triton 1%, and protease inhibitors). Tissue lysates were centrifuged at 14,000 rpm for 15 min at 4°C, and the supernatant was collected (cytosolic proteins). Protein quantification was performed by the Bradford method. A 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis was run on a BioRad mini protein II electrophoresis cell. For each sample, 20 μg of protein was electrophoresed 90 min at 150 V/500 mA and electroblotted for 120 min at 600 V/250 mA using semidry transfer apparatus with ice in the bath. The polyvinylidene fluoride membrane was blocked with 5% nonfat dry milk in phosphate-buffered saline for 2 h at room temperature. Next the blot was probed overnight with the primary antibodies directed against GFAP (rabbit antiserum; 1:5,000; ab7260, Abcam, UK) or β-actin (mouse antiserum; 1:5,000; A5441, Sigma, France) after membrane stripping at low pH. Immunoreactivity was detected using

Author's personal copy

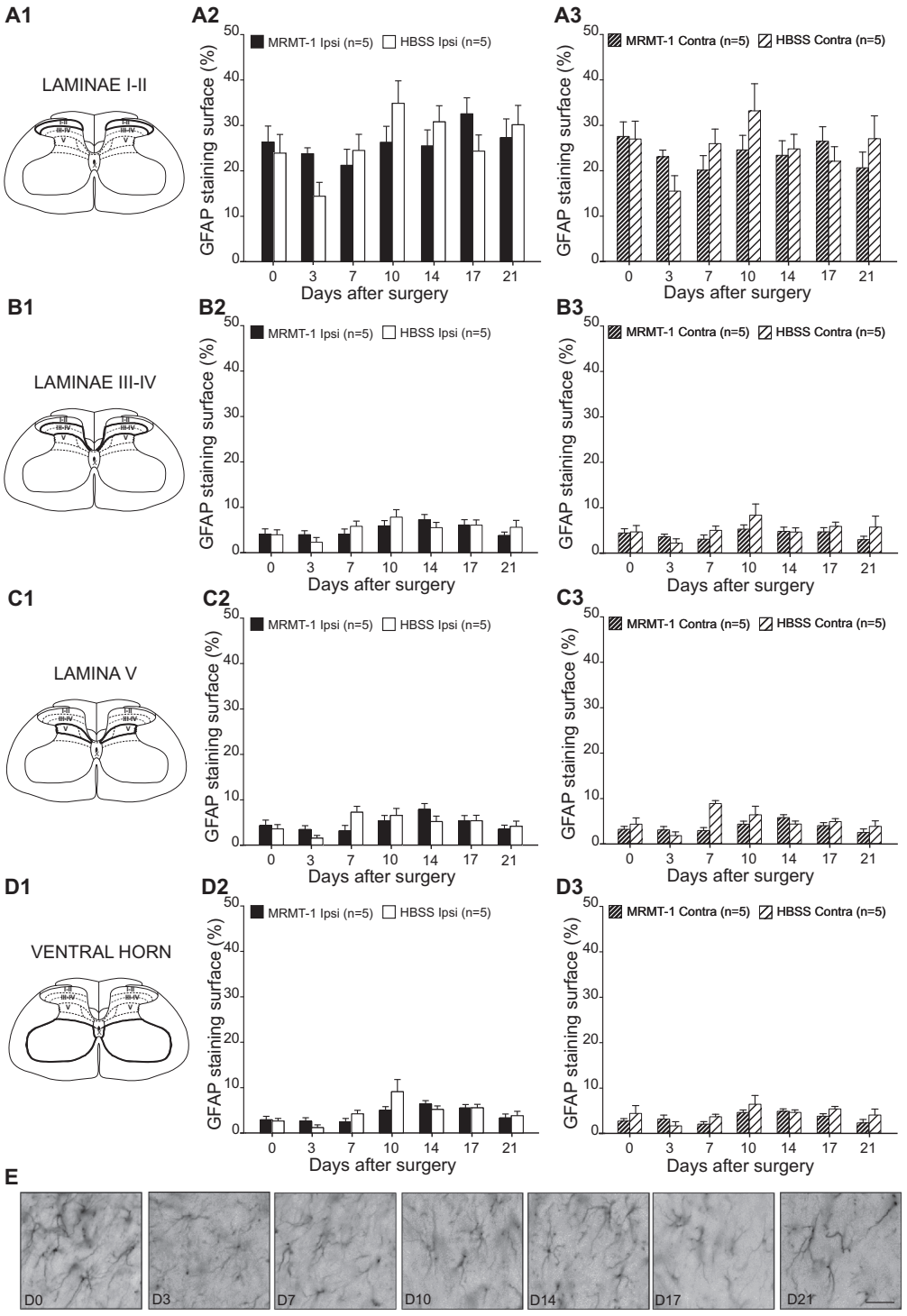


Fig. 6. Time course of changes in GFAP immunostaining in laminae I–II (A, E), laminae III–IV (B), and lamina V (C) of the dorsal horn as well as in the ventral horn (D) of cancer and control rats. The histograms represent the percentage of surface of I–II (A1), III–IV (B1), and V (C1) laminae as well as of the ventral horn (D1) occupied by the GFAP immunostaining (mean ± SEM; $n = 5$ animals for each day). Comparisons are made between cancer (black bars) and control (HBSS; white bars) rats in ipsilateral (A2, B2, C2, D2) and contralateral (A3, B3, C3, D3) sides of spinal cord. Statistical analysis showed no change over time in both ipsilateral and contralateral sides of the I–II, III–IV, and V laminae of the dorsal horn as well as of the ventral horn. Examples of GFAP immunostaining in the medial part of ipsilateral laminae I–II of rats on the preoperative day (D0) and 3 to 21 days (D3 to D21) after inoculation of MRMT-1 cells in the tibia are shown (E). Scale bar = 50 μm.

horseradish peroxidase–conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse IgG antibody (1:2,000 in TBS-T and 5% dried milk, Thermo Scientific, France) for 2 h at room temperature and visualized using an electrochemiluminescence kit (product no. 34080, Super Signal, West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, France). After scanning the films, quantitative analysis was performed by densitometry with ImageJ software and normalized with the internal loading control β-actin.

2.10. Bio-Plex cytokine measurement

Anesthetized rats were killed by decapitation, and blood samples were collected, centrifuged for 15 min at 1500 g at 4°C, formed into aliquots, and stored at −80°C. BioRad Bio-Plex kits were used for all assays (BioRad, France). All samples were run in duplicate and were assayed for IL-1β, TNF-α, and CCL2 according to the manufacturer's instructions. Results were expressed in pg/mL. The low-

Author's personal copy

Table 1
Nonnoxious palpation of hind paw in rats with cancer and control rats.[a]

Site	Ipsilateral hind paw				Contralateral hind paw			
	MRMT-1 with palpation	MRMT-1 without palpation	HBSS with palpation	HBSS without palpation	MRMT-1 with palpation	MRMT-1 without palpation	HBSS with palpation	HBSS without palpation
Lamina I–II	25.3 ± 0.4	24.0 ± 0.9	26.0 ± 0.7	27.0 ± 2.3	25.2 ± 1.0	23.0 ± 0.7	26.0 ± 0.9	27.0 ± 1.3
Lamina III–IV	4.1 ± 0.3	3.9 ± 0.4	4.3 ± 0.3	5.8 ± 1.6	4.2 ± 0.5	3.2 ± 0.2	4.3 ± 0.4	5.2 ± 0.5
Lamina V	2.7 ± 0.4	3.0 ± 0.6	2.5 ± 0.1	3.7 ± 0.7	2.4 ± 0.3	2.4 ± 0.3	2.8 ± 0.1	3.0 ± 0.3
Ventral horn	2.9 ± 0.7	3.0 ± 0.3	2.6 ± 0.1	3.4 ± 0.2	2.8 ± 0.3	2.6 ± 0.1	2.7 ± 0.1	3.2 ± 0.4

GFAP, glial fibrillary acidic protein; MRMT-1, mammary rat metastasis tumor cell line; HBSS, Hanks balanced salt solution (control).
[a] Values are percentages of surface of I–II, III–IV, and V laminae as well as of ventral horn occupied by GFAP immunostaining (mean ± SEM; n = 4–6 animals per condition).

est detectable concentration of IL-1β, TNF-α, and CCL2 was 2.8, 1.9, and 9 pg/mL, respectively (manufacturer's information).

2.11. Statistical analyses

All data are expressed as mean ± SEM. To assess changes over time, repeated-measures ANOVA followed by the Tukey post hoc test were performed by Statistisca 10 and SigmaPlot 12 software. To assess potential effects and interactions between treatment and side (ipsilateral vs contralateral) or between treatment and temperature (repeated measures) 2-way repeated-measures ANOVA (1 repetition factor) followed by Tukey post hoc tests were performed. To assess potential effects and interactions between treatment, palpation, and side (ipsilateral vs contralateral), 3-way ANOVA with 1 repeated factor (side) followed by Tukey post hoc tests were performed. Otherwise, unpaired or paired (as appropriate) t tests were performed. Differences were considered significant at $P < .05$.

3. Results

3.1. Radiological analysis of tumor development in the tibia

No radiological change (score 0, Fig. 1A1) was found in animals treated with HBSS solution (Fig. 1A2, white bar). No changes were apparent at early stages in rats treated with MRMT-1 cells (Fig. 1A3). However, 10 days after injection with MRMT-1 cells, the bone showed signs of small radiolucent lesions in the proximal epiphysis, close to the site of the injection (mean score 1.2; range 0–3; Fig. 1A3; score 1 in Fig. 1A). By day 17 after inoculation, loss of medullary bone and erosion of the cortical bone were apparent (mean score 2.8; range 2–4; Fig. 1A3; scores 2 and 3 in Fig. 1A). Further deterioration was detected at day 21 after injection with loss of cortical bone (mean score 3.34; range 0–4; Fig. 1A3; score 4 in Fig. 1A). Overall, at the final time point, 21 days after MRMT-1 injection, about 95% treated rats displayed a tumoral score of 1 or more (Fig. 1A2). Rats that had a radiological score equal to 0 at day 21 were discarded from the following behavioral, morphological, and molecular analyses.

3.2. Body weight, core temperature, and general condition of the animals

All bone cancer–bearing and related control animals displayed generally good health, with no signs of distress or abnormal weight increase during the 21 day observation period (Fig. 1B). There was no significant change in core body (rectal) temperature in MRMT-1 cell–injected and vehicle-injected groups (Fig. 1C). Signs of tumor growth, observed as swelling around the knee became visible in some (9 of 39) animals injected with MRMT-1 cells by day 21.

3.3. Time course of mechanical allodynia and hyperalgesia induced by bone cancer

Overall, rats treated with MRMT-1 cells displayed a progressive and dramatic reduction in nociceptive response threshold to von Frey hair stimulation on the ipsilateral hind paw. This was paralleled by a progressive and noticeable increase in the intensity of behavioral responses to von Frey hair stimulation above and below the initial nociceptive threshold (Fig. 2).

Over time, there was a progressive and finally important shift to the left and the top of the curve giving the mean behavioral score (see Methods and Fig. 2C) for each von Frey filament applied on the ipsilateral hind paw in rats treated with MRMT-1 cells (Fig. 2A1). In contrast, only a minor shift was found on the contralateral hind paw in rats treated with MRMT-1 cells (Fig. 2A2) and on both hind paws in rats treated with HBSS (Fig. 2B1, B2).

Consistently, in rats treated with MRMT-1 cells, the nociceptive response threshold (see Methods) to von Frey hair stimulation applied on the ipsilateral hind paw progressively decreased by −88% from 12.92 ± 3.00 g at day 0 to 1.56 ± 0.38 g (n = 14) at day 21 (Fig. 2D, solid symbols). In contrast, the nociceptive threshold to von Frey hair stimulation applied on the ipsilateral hind paw of control rats treated with HBSS was not significantly altered over time: from 13.20 ± 1.74 g at day 0 to 6.73 ± 0.99 g (n = 14) at day 21 (Fig. 2D, open symbols). The nociceptive threshold of cancer rats was significantly reduced compared to that of the control rats from day 10 to day 21 (Fig. 2D). An analysis of variance of the nociceptive threshold of the contralateral hind paw with time and bone cancer presence as factors revealed no effect of treatment and no interaction between treatment and time (data not shown).

To further quantify mechanical static allodynia in cancer rats, we measured the allodynia score at different time points (see Methods and Fig. 2C). In cancer rats (ipsilateral hind paw), the allodynia score progressively increased by +323% from 2.74 ± 2.01 at day 3 to 11.59 ± 3.01 (n = 14) at day 21 (Fig. 2E, solid symbols). In contrast, in control rats treated with HBSS (ipsilateral hind paw), the allodynia score did not change over time: from 0.91 ± 0.41 at day 3 to 1.84 ± 0.85 (n = 14) at day 21 (Fig. 2E). The allodynia score of cancer rats was significantly larger than that of control rats from day 14 to day 21 (Fig. 2E, open symbols). For the contralateral hind paw, the analysis of variance of the allodynia score with time and bone cancer presence as factors revealed no effect of treatment and no interaction between treatment and time (data not shown).

To further quantify mechanical hyperalgesia in cancer rats, we measured the hyperalgesia score at different time points (see Methods and Fig. 2C). In cancer rats (ipsilateral hind paw), the hyperalgesia score progressively increased by +633% from 11.42 ± 9.84 at day 3 to 83.76 ± 6.11 (n = 14) at day 21 (Fig. 2F). In contrast, in control rats treated with HBSS (ipsilateral hind paw), the hyperalgesia score did not change significantly over time: from 29.55 ± 11.89 at day 3 to 57.48 ± 17.79 (n = 14) at day 21 (Fig. 2F). However, the hyperalgesia score of cancer rats was not significantly different compared to the scores obtained from control rats from day 3 to day 21 (Fig. 2F). For the contralateral hind paw, the analysis of variance of the hyperalgesia score with time and bone cancer presence as factors revealed no effect of treatment and no interaction between treatment and time (data not shown).

Author's personal copy

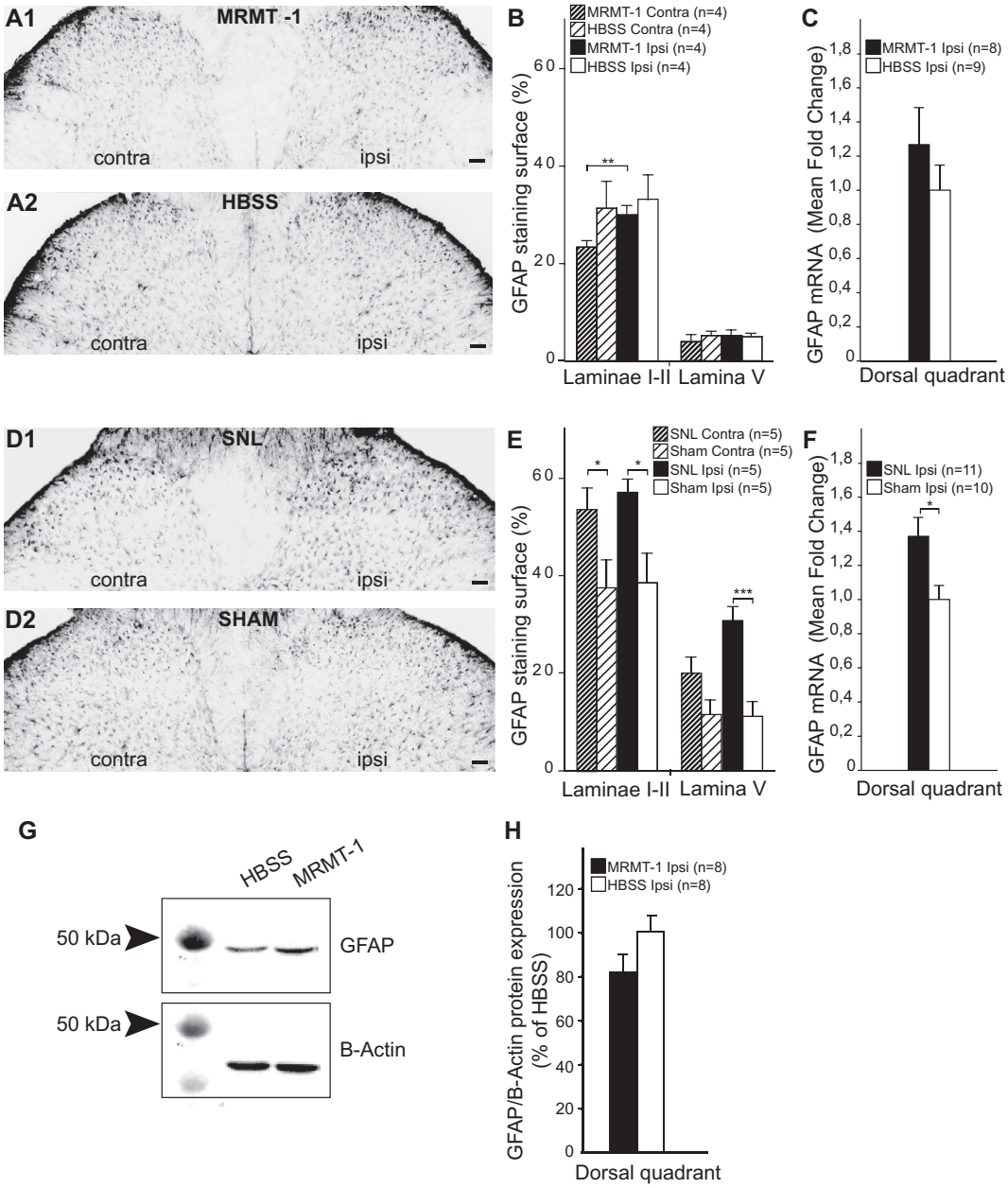


Fig. 7. GFAP expression in the dorsal horn of cancer and neuropathic rats and controls. (A) Examples of GFAP immunostaining in L4 spinal cord segments of MRMT-1 (A1) and HBSS (A2) rats taken at day 21 after injection. Note that there is no morphological sign of astrocyte activation in MRMT-1 rats (scale bar = 100 μm). (B) Morphometric analysis shows no difference in the percentage of GFAP immunostaining areas in laminae I–II and lamina V or between MRMT-1 (cancer) and HBSS (control) rats. We found that the percentage in contralateral laminae I–II was statistically lower than in the ipsilateral ones in MRMT-1 rats (**$P < .01$). (C) GFAP mRNA expression in the dorsal quadrant of lumbar segments was not different between MRMT-1 and HBSS rats. Values are normalized to the values found on the ipsilateral side of HBSS rats. (D) Examples of GFAP immunostaining in L5 spinal cord segment of SNL (D1) and sham-treated rats (D2) taken at day 14 after the injection. Note that GFAP immunostaining increases in SNL rats (scale bar = 100 μm). (E) There is a statistically significant increase in the relative surface of GFAP immunostaining in all ipsilateral laminae (I–II and V) of SNL rats compared to sham-treated rats (*$P < .05$; ***$P < .001$). This also true for the contralateral laminae I–II (*$P < .05$). (F) GFAP mRNA expression in the ipsilateral dorsal quadrant of lumbar segments was significantly higher in SNL rats compared to sham-treated rats (*$P < .05$). Values are normalized to the values found on the ipsilateral side of HBSS rats. (G) Example of Western blot of ipsilateral L4 spinal cord dorsal quadrant GFAP of MRMT-1- and HBSS-treated rats taken at day 21 after the injection. β-Actin was used as an internal loading control. (H) GFAP expression in the ipsilateral dorsal quadrant of lumbar segments was not different between MRMT-1- and HBSS-treated rats. The results are expressed as the percentage ± SEM of the HBSS reference value set to 100% (8 rats in each condition).

3.4. Time course of thermal allodynia and hyperalgesia induced by bone cancer

In the dynamic hot plate test at day 0 and for temperatures above 43°C, we found significantly elevated nociceptive responses in cancer and HBSS rats (Fig. 3A1). Responses of cancer and HBSS rats were not significantly different. At day 21, cancer rats displayed significant elevated responses above 32°C. Responses of cancer rats were also significantly higher than those of HBSS rats above 32°C (Fig. 3A2).

In the acetone test, rats treated with MRMT-1 cells showed a progressive increase in responses to cooling stimuli applied to the ipsilateral paw that became significantly different from the ones obtained on day 0 from day 10 to day 21 (Fig. 3B). In contrast, HBSS-treated rats did not display any significant change in their withdrawal response to acetone (Fig. 3B). Furthermore, the in-

Author's personal copy

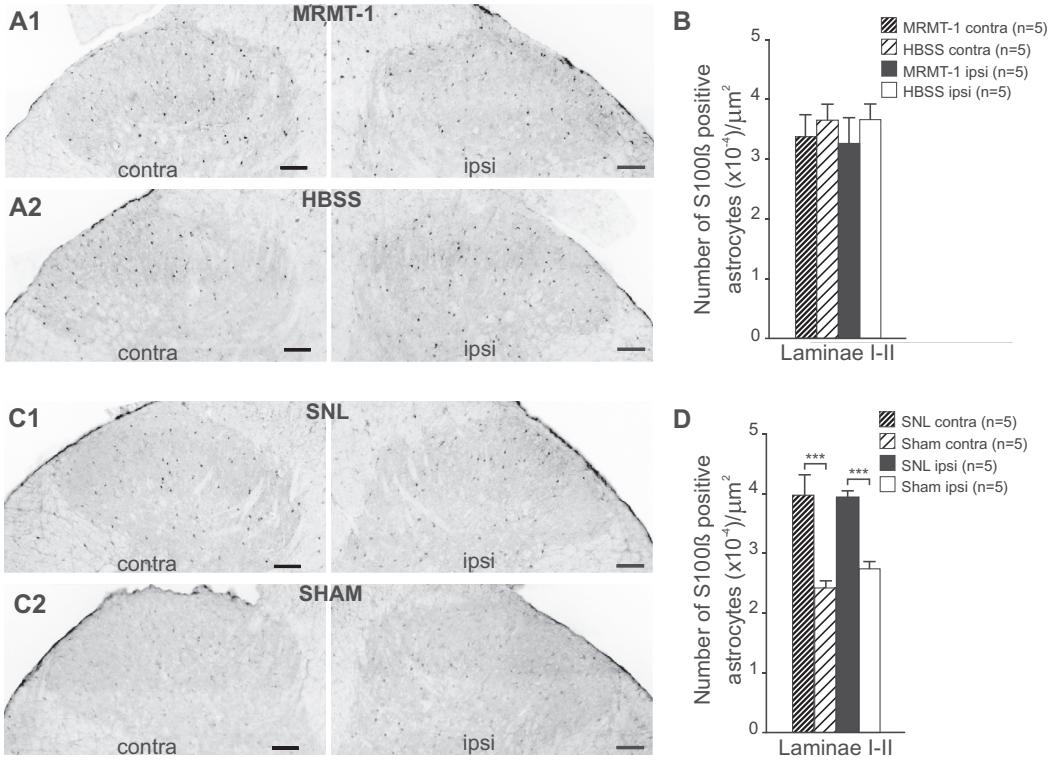


Fig. 8. Quantification of S100β-positive astrocytes in the dorsal horn of cancer and neuropathic rats and controls. (A) Examples of S100β immunostaining in L4 spinal cord segment of MRMT-1 (A1) and HBSS (A2) rats taken at day 21 after the injection. Note that there is no sign of astrocyte activation in MRMT-1 rats (scale bar = 100 µm). (B) The number of astrocytes immunoreactive for the S100β protein in laminae I–II was not different between MRMT-1 and HBSS rats. (C) Examples of S100β immunostaining in L5 spinal cord segment of SNL (C1) and sham-treated (C2) rats taken at day 14 after the injection. Note that S100β immunostaining is higher in SNL rats than in sham-treated rats (scale bar = 100 µm). (D) There is a statistically significant difference in the number of immunoreactive astrocytes in laminae I–II between SNL and sham-treated rats, both ipsilateral and contralateral to the injection (***$P < .001$).

crease in withdrawal response to acetone in cancer rats compared to HBSS rats became statistically significant at day 14 (Fig. 3B). The ANOVA of the withdrawal response to acetone applied to the contralateral hind paw with time and bone cancer presence as factors revealed no differences (data not shown).

3.5. Limb discomfort evaluation

DWB evaluation showed that at day 0, the weight distribution between paws was similar in cancer and HBSS rats (Fig. 4, grey bars). At day 21, reduced use of the injured paw in cancer rats was detected, with a large and statistically significant drop of 52% in the weight borne on the ipsilateral hind paw compared to day 0 (Fig. 4AI.1). The load was redistributed to the contralateral paws with a significant 19% increase in the weight borne on the contralateral hind paw (Fig. 4AI.2) and a significant 76.5% increase in the weight borne on the contralateral front paw (Fig. 4AII.2) at day 21 compared to day 0 in cancer rats. The increase in the weight borne on the ipsilateral front paw at day 21 compared to day 0 did not reach statistical significance (Fig. 4AII.1; $P = .082$). Finally, DWB did not reveal any weight redistribution over time in HBSS rats (Fig. 4B).

3.6. Dorsal horn Fos expression after nonpainful palpation of the injected limb is increased in bone cancer–bearing animals

To determine whether tumor implantation in the bone leads to activation of dorsal horn neurons, we counted the number of Fos-immunoreactive neurons on both sides in L4 spinal cord sections taken from rats treated with MRMT-1 cells (Fig. 5A1 and A2) and from rats treated with vehicle (Fig. 5A3 and A4), whether they have undergone (Fig. 5A1 and A3) or not undergone (Fig. 5A2 and A4) nonnoxious palpation of the ipsilateral hind paw. At day 21, there was a significant increase in the number of Fos-immunoreactive superficial laminae (laminae I–II in Fig. 5B1) neurons ipsilateral to the tumor-injected tibia after nonnoxious palpation only compared to vehicle-treated rat values, contralateral side values, or nonpalpated cancer rat values (Fig. 5B2). There was also a significant increase in the number of Fos-immunoreactive deep lamina (lamina V in Fig. 5B1) neurons ipsilateral to the tumor-injected tibia after nonnoxious palpation only compared to vehicle-treated rat values and contralateral side values. In any case, there were no changes in the number of Fos-immunoreactive neurons in laminae III–IV of the dorsal horn and in lamina X (Fig. 5B2 and delineation in Fig. 5B1).

3.7. GFAP immunoreactivity is unchanged in the dorsal horn during the evolution of bone cancer

We used morphometric analysis of GFAP immunolabeling to uncover reactive astrogliosis in relation to the temporal development of pain behavior in bone cancer–bearing animals. The analysis of variance of the mean GFAP immunofluorescence surfaces we conducted, with time, side, and bone cancer as factors, showed no changes over time in the I–II, III–IV, and V laminae of the dorsal horn (Fig. 6A–C) as well as in the ventral horn (Fig. 6D). Accordingly, under direct observation through the microscope, there was no evidence of astrocyte hypertrophy in the dorsal horn of rats treated with MRMT-1 cells; the cell bodies did not appear enlarged, and the distal processes of the astrocytes did not appear longer or with extensive arborization compared to dorsal horn astrocytes of rats on preoperative day (Fig. 6E). Furthermore, there were no

Author's personal copy

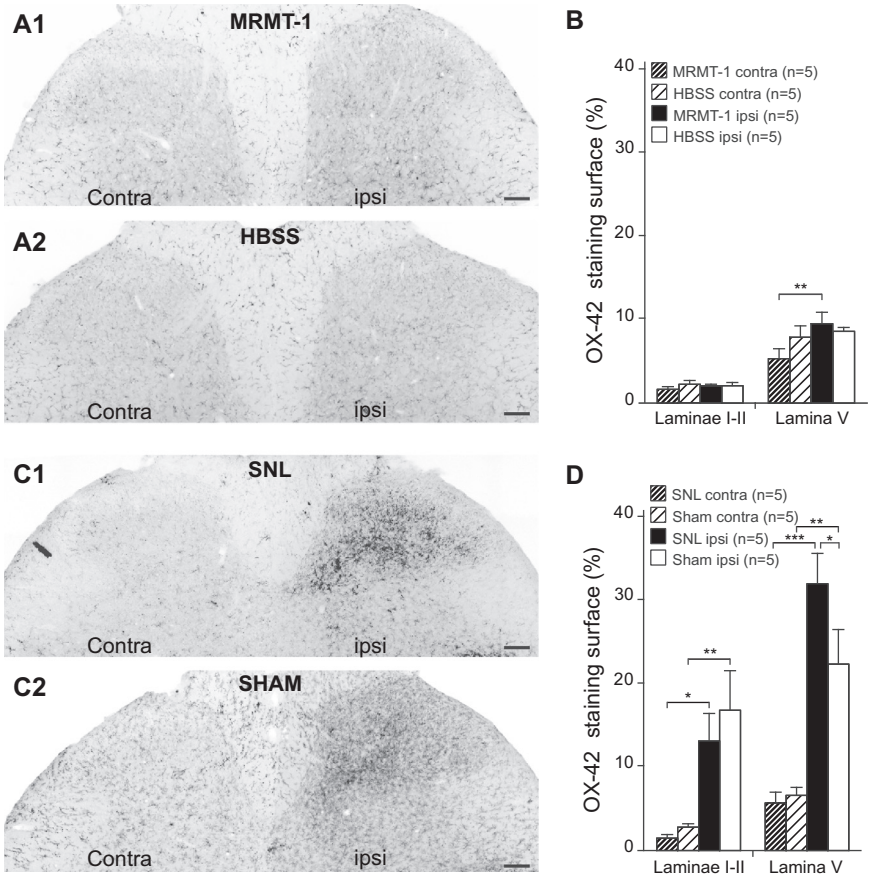


Fig. 9. Quantification of OX-42 positive microglia in the dorsal horn of cancer and neuropathic rats and controls. (A) Examples of OX-42 immunostaining in L4 spinal cord segment of MRMT-1 (A1) and HBSS (A2) rats taken at day 21 after the injection. Note that there is no morphological sign of microglia activation in MRMT-1 rats (scale bar = 100 μm). (B) Morphometric analysis shows no difference in the percentage of OX-42 immunostaining areas in laminae I–II and V between MRMT-1 (cancer) and HBSS (control) rats. We found only a decrease in percentage in the contralateral lamina V compared to the ipsilateral side in MRMT-1 rats (**$P < .01$). (C) Examples of OX-42 immunostaining in L5 spinal cord segments of SNL (C1) and sham-treated (C2) rats taken at day 14 after the surgery. Note that OX-42 immunostaining increases in the ipsilateral side of the dorsal horn of SNL rats but also of sham-treated rats (scale bar = 100 μm). (D) There is a statistically significant increase in the relative surface of OX-42 immunostaining in all ipsilateral laminae (I–II and V) of SNL and sham-treated rats compared to the contralateral side (*$P < .05$; **$P < .01$; ***$P < .001$). Note also that the ipsilateral lamina V of sham-treated rats displays a significantly higher percentage of surface occupied by OX-42 immunostaining than the contralateral one (**$P < .01$).

changes in GFAP immunofluorescence surfaces on both sides in L4 spinal cord sections taken from rats treated with MRMT-1 cells and from rats treated with vehicle, whether or not they had undergone nonnoxious palpation of the ipsilateral hind paw at the final stage of evolution (Table 1).

3.8. Reactive astrocyte markers are increased in the dorsal horn after sciatic nerve ligation, not after bone cancer induction

Because our results are at odds with previous data reported in the literature, we duplicated our morphometric experiments at a time when pain symptoms were fully evident in bone cancer–bearing rats (day 21). We also further explored astrocytic activation using measurements of GFAP transcripts, looking at expression of GFAP protein by Western blot testing and by counting the number of superficial dorsal horn S100β protein immunoreactive astrocytes. We then checked this new data set against data obtained from a SNL neuropathic pain model.

The ANOVA of the mean GFAP immunofluorescence surfaces that we conducted in a new set of rats treated with MRMT-1 cells or with vehicle (representative examples of GFAP immunolabeling in Fig. 7A1 and A2), with side and bone cancer presence as factors, showed no differences between groups in the superficial (I–II) laminae of the dorsal horn, but it showed a significant decrease in mean GFAP immunofluorescence surfaces on the contralateral side in MRMT-1 cell–treated animals compared to the ipsilateral side (Fig. 7B). There were no differences between groups in the deep (V) lamina (Fig. 7B, left). Analysis of GFAP transcripts expressed in the dorsal horn showed similar levels on the ipsilateral side in rats treated with MRMT-1 cells or with vehicle (Fig. 7C).

In contrast, we observed a significant increase in mean GFAP immunofluorescence surfaces (Fig. 7D1 and D2) on both sides in the superficial (I–II) dorsal horn laminae of SNL rats compared to sham-treated as well as on the ipsilateral side in the deep (V) lamina of SNL rats compared to sham-treated animals (Fig. 7E). Accordingly, a significant increase in GFAP transcripts was found on the ipsilateral side in SNL rats compared to sham-treated rats (Fig. 7F).

Expression of GFAP protein was examined by Western blot test in total extracts of ipsilateral L4 spinal cord dorsal horn of rats treated with MRMT-1 cells or with HBSS. The antiserum recognized a single band with an apparent molecular weight around 55 kDa (Fig. 7G). Western blot quantification showed no increase of protein level in the ipsilateral L4 spinal cord of rats treated with MRMT-1 cells (Fig. 7H, 81 ± 8% of L4 spinal cord of rats treated with HBSS).

At day 21, there was no difference in the number of S100β protein immunoreactive astrocytes (Fig. 8A1 and A2) counted in the

Author's personal copy

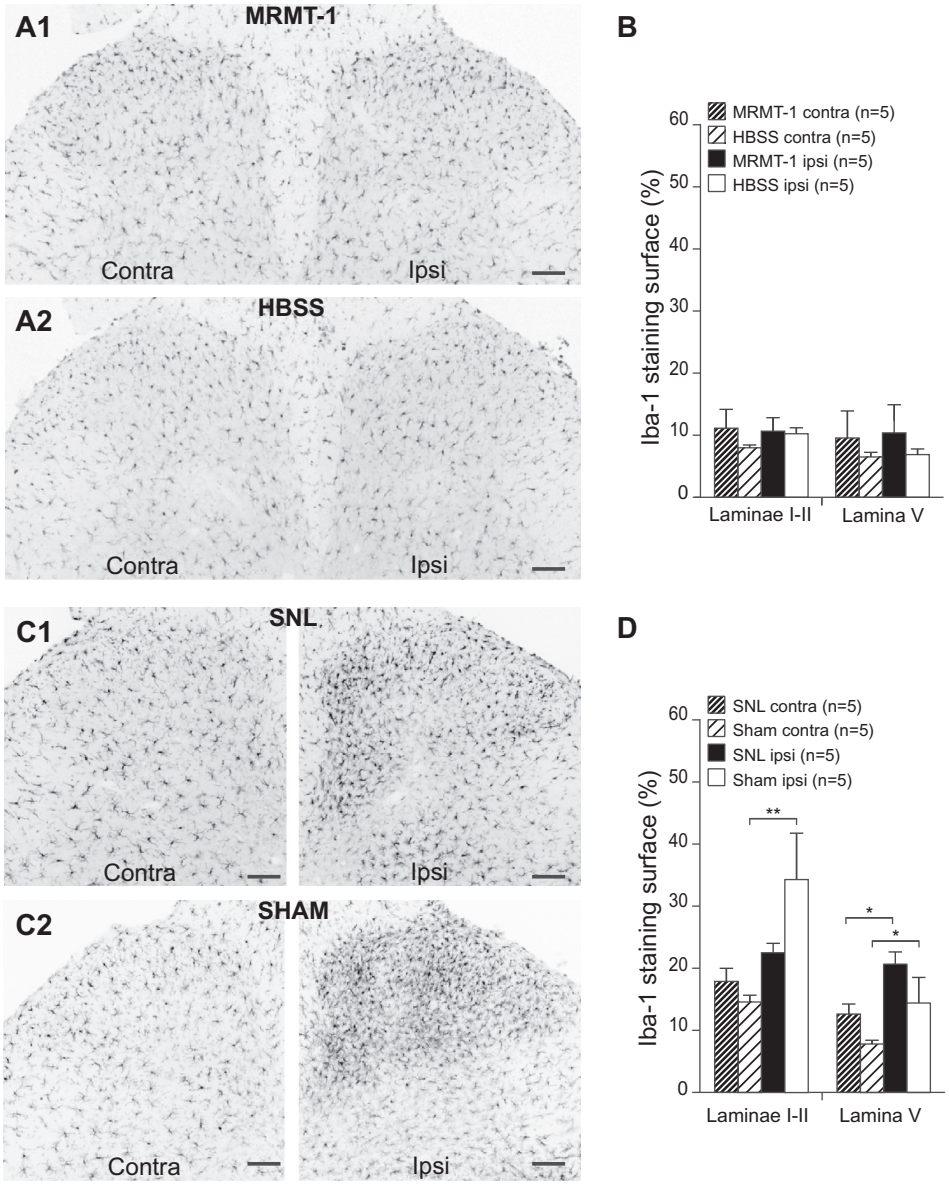


Fig. 10. Quantification of Iba-1-positive microglia in the dorsal horn of cancer and neuropathic rats and controls. (A) Examples of Iba-1 immunostaining in L4 spinal cord segment of MRMT-1 (A1) and HBSS (A2) rats taken at day 21 after the injection. Note that there is no morphological sign of microglial activation in MRMT-1 rats (scale bar = 100 μm). (B) Morphometric analysis shows no difference in the percentage of Iba-1 immunostaining areas in laminae I–II and V between MRMT-1 (cancer) and HBSS (control) rats. (C) Examples of Iba-1 immunostaining in L5 spinal cord segment of SNL (C1) and sham-treated (C2) rats taken at day 14 after the injection (scale bar = 100 μm). Note that Iba-1 immunostaining increases in the ipsilateral side of the dorsal horn of SNL rats but also of sham-treated rats (scale bar = 100 μm). (D) The percentage of surface occupied by Iba-1 immunostaining in ipsilateral lamina V was significantly higher than in the contralateral one in SNL and sham-treated rats (*$P < .05$). Note that this also true for sham-treated rats in laminae I–II (**$P < .01$).

superficial dorsal horn (I–II) laminae, on either side, in rats treated with MRMT-1 cells or with vehicle (Fig. 8B). In contrast, a significant increase in the number of S100β protein immunoreactive astrocytes (Fig. 8C1 and C2) was found on both sides in the superficial (I–II) dorsal horn laminae of SNL rats compared to sham-treated rats (Fig. 8D).

3.9. Reactive microglia markers are increased in the dorsal horn after sciatic nerve ligation, not after bone cancer induction

To determine whether tumor implantation in the bone leads to microglia activation in the dorsal horn, we conducted an ANOVA of the mean OX-42 and Iba-1 immunofluorescence surfaces, with side and treatment as factors. No changes in mean OX-42 and Iba-1 immunofluorescence surfaces were found in the superficial (I–II) and deep (V) laminae of the dorsal horn of MRMT-1 cell–treated rats compared to the vehicle-injected rats (Fig. 9A,B; Fig. 10A,B), but we observed a decrease in OX-42 immunofluorescence surfaces in the deep (V) lamina on the contralateral side compared to the ipsilateral side in MRMT-1 cell–treated rats (Fig. 9B).

In contrast, significant increases in mean OX-42 and Iba-1 immunofluorescence surfaces were found on the ipsilateral side in the deep (V) dorsal horn lamina of SNL and sham-treated rats compared to the respective contralateral side (Fig. 9C,D; Fig. 10C,D). A similar increase in mean OX-42 immunofluorescence surfaces was found on the ipsilateral side in the superficial (I–II) laminae of SNL and sham-treated rats compared to the respective contralateral side (Fig. 9D). Mean OX-42 immunofluorescence surfaces were significantly larger in the SNL rats than in the sham-treated rats on the ipsilateral side of the deep (V) dorsal horn lamina (Fig. 9D). Finally, mean Iba-1 immunofluorescence surfaces were significantly larger on the ipsilateral side in the superficial

Author's personal copy

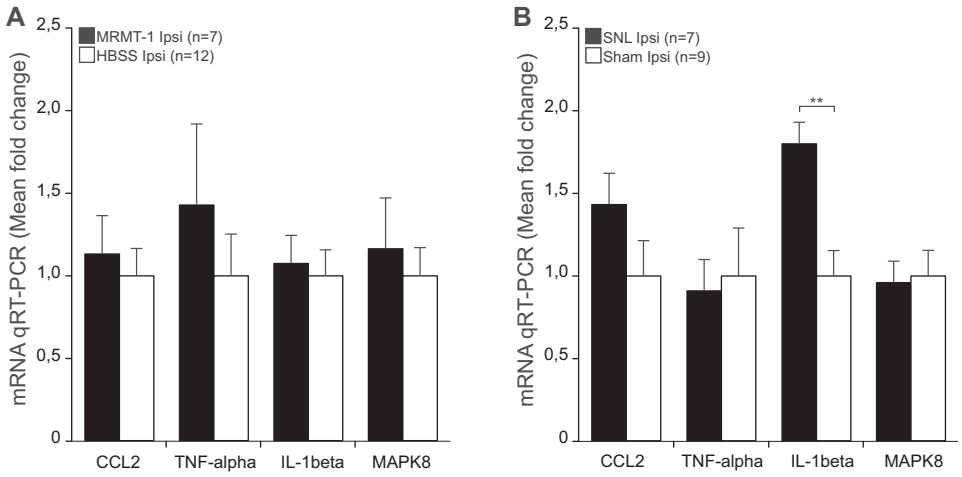


Fig. 11. mRNA expression of pro-inflammatory mediators and MAPK8 in the ipsilateral dorsal quadrant of lumbar segments from cancer (A) and neuropathic (B) rats and controls. (A) No significant change in CCL2, TNF-α, IL-1β, and MAPK8 mRNA expression was found in cancer rats at day 21. Values are normalized to the values found in HBSS rats. (B) Only IL-1β mRNA expression was significantly up-regulated in SNL rats at day 14 (**$P < .01$). Values are normalized to the values found in sham-treated rats.

(I–II) laminae of sham-treated rats compared to the contralateral side (Fig. 10D).

3.10. Quantification of the mRNA expression of molecular mediators and markers of reactive glia

In the 2 pain models, we also quantified the mRNA expression of molecular mediators and markers of reactive glia [18]: the pro-inflammatory chemokine CCL2, the pro-inflammatory cytokines TNF-α and IL-1β, and the mitogen-activated protein kinase MAPK8. We finally used Bio-Plex assays to check the circulating protein levels of CCL2, TNF-α, and IL-1β in the cancer rats and associated controls.

CCL2, TNF-α, IL-1β, and MAPK8 mRNA expression was not different in the ipsilateral dorsal quadrant of lumbar segments from cancer and HBSS rats (Fig. 11A). IL-1β mRNA expression was significantly up-regulated in the ipsilateral dorsal quadrant of lumbar segments of SNL rats compared to sham-treated rats, but not CCL2, TNF-α, and MAPK8 mRNA (Fig. 11B).

Circulating serum CCL2 levels were not affected by the treatment; no significant difference was found in protein levels of CCL2 between naive (498.25 ± 41.38 pg/mL; $n = 8$), cancer (425.13 ± 44.52 pg/mL; $n = 8$), and HBSS (313.19 ± 56.77 pg/mL; $n = 8$) rats. Although we were able to detect 68.60 ± 16.69 pg/mL of IL-1β in serum of naive rats ($n = 8$), IL-1β levels were undetectable in serum from cancer ($n = 8$) and HBSS ($n = 8$) rats. Finally, TNF-α levels were undetectable in serum of naive, cancer, and HBSS rats ($n = 8$ in each condition).

4. Discussion

In order to uncover the exact relationship of reactive astrogliosis with bone cancer pain symptoms, we investigated the temporal development of pain symptoms and astrogliosis. Unexpectedly, our data provide the first evidence that bone cancer pain is not always correlated with the overexpression of spinal reactive astrocyte markers, thereby raising the issue of the functional meaning of reactive astrogliosis in chronic pain models.

We used a rat model of bone cancer pain developed by Medhurst et al. [30], in which MRMT-1 breast cancer cells are injected in the tibial bone of Sprague Dawley female rats. Like these authors, we found that mechanical allodynia and hyperalgesia developed gradually, beginning on day 14 after intratibial injections of MRMT-1 cells. We also found that thermal allodynia and hyperalgesia developed in parallel with the mechanical pain symptoms and that a reduced use of the affected limb was present 21 days after inoculation of MRMT-1 cells, all in the absence of weight loss or core body temperature changes, indicating otherwise generally good well-being in rats in the presence of a growing malignant tumor. Taken together, these results agree with those published by others using rat models of bone cancer pain [5,23,29,30,49,59,60]. Bone tumors were visualized using a standard radiology procedure, which showed a progressive but localized extension of the tumor, with significant destruction and rebuilding of the bone by day 17. This is in line with recent results obtained by Doré-Savard et al. [5] showing that bone metastases can be visualized earlier than pain symptoms using advanced medical imaging, while classical radiology may not be so sensitive.

Nociceptive or painful conditions have been associated with an increase in Fos expression in the spinal cord, reflecting the central sensitization phenomena frequently observed in chronic pain states [13]. As in the murine femoral sarcoma model [14,15,26,43,45], we found that nonnoxious palpation of the paw ipsilateral to the injected tibia induced significant increased Fos expression in the superficial and deep lamina of the ipsilateral dorsal horn. However, unlike others [5,14,15,45], we did not find increased expression of Fos in the deep lamina of the dorsal horn of cancer bearing animals compared to sham-treated rats in basal conditions. These discrepancies in Fos expression may be related to the type and location of tumor. Although we did not test the hypothesis, the lack of increased Fos expression in basal conditions in our model might also be due to reduced spontaneous pain compared to other models. In summary, along with the development of radiological bone lesions, gradual mechanical and thermal allodynia and hyperalgesia and reduced use of the affected limb developed in the rat bone cancer model we used, we also found that there was neuronal hyperactivity accompanying hyperalgesia and allodynia in the spinal cord.

Early evidence of astrocyte activation in pain models arose from the chronic constriction injury neuropathic pain model which showed an increase in the astrocytic marker GFAP in L4 spinal cord [8]. 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. Increased numbers of GFAP immunopositive astrocytes displaying a hypertrophic morphology is a phenomenon referred to as astrogliosis [46].

Author's personal copy

Studies in transgenic mice indicated that the expression of GFAP is not essential for the normal appearance and function of most astrocytes in the healthy central nervous system [35], but it is essential for the process of reactive astrogliosis and glial scar formation [46]. As such, GFAP expression can be regarded as a sensitive and reliable marker that labels most, if not all, reactive astrocytes [46]. Astrogliosis has been regularly demonstrated in different models of neuropathic pain as well as in cancer pain models, in which it is particularly intense. It has even been considered as part of the unique set of neurochemical changes in the spinal cord that characterize bone cancer pain [28]. Reactive astrogliosis plays either primary or contributing pathological roles via loss of normal astrocyte function or gain of abnormal effects [46]. It is known that astrocyte activation contributes to neuropathic pain, because blockade of astrocyte activation prevents and/or reverse it [31]. Neuropathy causes spinal cord astrocyte to enhance pain by releasing neuroexcitatory proinflammatory cytokines such as TNF-α, IL-1β, and IL-6 by altering glutamate transport or by enhancing the glutamate–glutamine shuttle action [42]. Activated astrocytes can also have a protective role through the release of anti-inflammatory factors [31].

The mechanisms by which astrocytes may contribute to cancer pain are not known. However, targeting EphB1 or TNF-α receptors, which inhibited pain symptoms in mice models of bone cancer pain, also resulted in reduction in the associated astrogliosis in the spinal cord [23]. Similarly, the analgesic effect of low-dose focal irradiation in a mouse model of bone cancer was associated with spinal decrease in astrocyte activation [51]. This suggests a close relationship between bone cancer pain symptoms and astrogliosis. This could simply result from increased neuronal activity in the spinal cord, leading to GFAP up-regulation in neighboring astrocytes [46]. However, because GFAP is important in modulating astrocyte motility and may have important functions in synaptic modulation in the central nervous system, it is possible that bone cancer–induced GFAP up-regulation not only serves as a marker for astrocyte activation but also contributes to the maintenance of pain. Accordingly, in GFAP knockout mice or after reduced expression of GFAP in the spinal cord of rats by intrathecal injection of GFAP antisense oligonucleotides, animals had a shorter duration of tactile allodynia after nerve ligation [20].

Here, we found no correlation between the temporal development of pain symptoms and astrogliosis. Furthermore, at a time when allodynia and hyperalgesia were fully established, there was no evidence of astrogliosis in the spinal cord of cancer-bearing animals and no up-regulation of GFAP expression as shown by Western blot testing. In contrast, a clear astrogliosis was present in the spinal cord of rats 2 weeks after sciatic nerve ligation. Similarly, we found no increase in GFAP transcripts in the cancer model, while they were elevated after sciatic nerve ligation. One may hypothesize that changes in estrogen levels in female rats may have tempered astrogliosis development. However, others also using female rats described spinal astrogliosis in their models [30]. Even if this were true, it would only emphasize the lack of correlation between the presence of astrogliosis and pain symptoms. In addition, we also investigated the expression of S100β protein, a calcium-binding protein produced mainly by astrocytes that can be used as an alternative functional marker of astroglial activity [47]. Again, no increase in the number of superficial dorsal horn S100β protein immunoreactive astrocytes was found in the cancer model but they were elevated after sciatic nerve ligation, in agreement with a previous report [48]. Furthermore, in the bone cancer pain model, and contrary to other reports [1,16,21,24], we found no up-regulation of spinal mRNA and serum protein levels of pro-algesic mediators known to trigger or regulate astrogliosis and to be released by astrocytes (TNF-α, IL-1β, and CCL2) and no up-regulation of spinal mRNA of MAPK8 (JNK1) known to be activated in spinal astrocytes during pain [61]. In contrast, we found that IL-1β spinal mRNA was up-regulated in neuropathic pain conditions, as previously reported [17,40,55].

In summary, our data provide unexpected evidence that such glial changes may not always be essential for bone cancer pain to be present. However, this does not definitively mean that astrocytes are not activated in bone cancer pain. Indeed, upon activation of intracellular signaling pathways, astrocytes may still release substances implicated in establishing mechanical and thermal hypersensitivity that we did not explore in the present study. For instance, despite the fact that activated JNK colocalized with GFAP immunopositive spinal astrocytes in neuropathic pain condition, JNK inhibition did not reduce the number of reactive astrocytes, while it reduced pain-associated behavior without affecting physiological sensitivity [61]. Complex signaling pathways may thus be involved during astrocyte activation in chronic pain conditions, leading to different cellular changes.

Because spinal microglia were significantly activated in a few rodent models of bone cancer pain [53,57,59], we also investigated whether expression of the microglia markers Iba-1 and OX-42 changed in the model we used. At a time when allodynia and hyperalgesia were fully established, there was no evidence of activated microglia as detected by these markers in the spinal cord of cancer-bearing animals, while a clear microglia activation was present in the spinal cord of rats 2 weeks after sciatic nerve ligation.

Taken together, our data suggest that in some cases bone cancer pain may not be correlated with spinal overexpression of reactive glia markers, while neuropathic pain is. However, because we did not investigate all possible glia activation mediators and markers, it is still possible that glial changes might occur at a subtler scale or may involve the synthesis of proinflammatory mediators uncorrelated to gliosis. Finally, our data also strongly suggest that glia may play different roles in the development and maintenance of neuropathic pain and chronic cancer pain.

Conflict of interest statement

The authors report no conflict of interest.

Acknowledgments

Part of the microscopy was done in the Bordeaux Imaging Center of the University of Bordeaux Segalen, and the help of Christel Pujol is acknowledged. We thank William Gerand for designing the area surface calculation algorithm, Dr Carole Dufouil for advice about statistics, and Dr Peggy Vincent for help with Western blot testing. We thank Dr Sophie Layé and Agnès Aubert for their help with the Bio-Plex assays. This work was supported by ARC-INCa, Institut UPSA de la douleur, Inserm, Université d'Auvergne Clermont-Ferrand, Université de Bordeaux, Conseil Régional d'Aquitaine, studentships from the French Ministry for Research to VRD and TD, and a fellowship from Ecole Pratique des Hautes Etudes to LM.

References

[1] Baamonde A, Curto-Reyes V, Juarez L, Meana A, Hidalgo A, Menendez L. Antihyperalgesic effects induced by the IL-1 receptor antagonist anakinra and increased IL-1beta levels in inflamed and osteosarcoma-bearing mice. Life Sci 2007;81:673–82.

[2] Cain DM, Wacnik PW, Turner M, Wendelschafer-Crabb G, Kennedy WR, Wilcox GL, Simone DA. Functional interactions between tumor and peripheral nerve: changes in excitability and morphology of primary afferent fibers in a murine model of cancer pain. J Neurosci 2001;21:9367–76.

[3] 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.

Author's personal copy

[4] Coleman RE. Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. Clin Cancer Res 2006;12:6243s–9s.
[5] Doré-Savard L, Otis V, Belleville K, Lemire M, Archambault M, Tremblay L, Beaudoin JF, Beaudet N, Lecomte R, Lepage M, Gendron L, Sarret P. Behavioral, medical imaging and histopathological features of a new rat model of bone cancer pain. PLoS One 2010;5:e13774.
[6] Fellin T. Communication between neurons and astrocytes: relevance to the modulation of synaptic and network activity. J Neurochem 2009;108:533–44.
[7] Gao YJ, Ji RR. Targeting astrocyte signaling for chronic pain. Neurotherapeutics 2010;7:482–93.
[8] 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.
[9] Geis C, Graulich M, Wissmann A, Hagenacker T, Thomale J, Sommer C, Schafers M. Evoked pain behavior and spinal glia activation is dependent on tumor necrosis factor receptor 1 and 2 in a mouse model of bone cancer pain. Neuroscience 2010;169:463–74.
[10] Ghilardi JR, Rohrich H, Lindsay TH, Sevcik MA, Schwei MJ, Kubota K, Halvorson KG, Poblete J, Chaplan SR, Dubin AE, Carruthers NI, Swanson D, Kuskowski M, Flores CM, Julius D, Mantyh PW. Selective blockade of the capsaicin receptor TRPV1 attenuates bone cancer pain. J Neurosci 2005;25:3126–31.
[11] Gosselin RD, Suter MR, Ji RR, Decosterd I. Glial cells and chronic pain. Neuroscientist 2010;16:519–31.
[12] Hald A, Nedergaard S, Hansen RR, Ding M, Heegaard AM. Differential activation of spinal cord glial cells in murine models of neuropathic and cancer pain. Eur J Pain 2009;13:138–45.
[13] Harris JA. Using c-fos as a neural marker of pain. Brain Res Bull 1998;45:1–8.
[14] Honore P, Luger NM, Sabino MA, Schwei MJ, Rogers SD, Mach DB, O'Keefe PF, Ramnaraine ML, Clohisy DR, Mantyh PW. Osteoprotegerin blocks bone cancer–induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord. Nat Med 2000;6:521–8.
[15] Honore P, Rogers SD, Schwei MJ, Salak-Johnson JL, Luger NM, Sabino MC, Clohisy DR, Mantyh PW. Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons. Neuroscience 2000;98:585–98.
[16] Hu JH, Zheng XY, Yang JP, Wang LN, Ji FH. Involvement of spinal monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in cancer-induced bone pain in rats. Neurosci Lett 2012;517:60–3.
[17] Hunt SP, Mantyh PW. The molecular dynamics of pain control. Nat Rev Neurosci 2001;2:83–91.
[18] Ji RR, Kawasaki Y, Zhuang ZY, Wen YR, Decosterd I. Possible role of spinal astrocytes in maintaining chronic pain sensitization: review of current evidence with focus on bFGF/JNK pathway. Neuron Glia Biol 2006;2:259–69.
[19] Khasabov SG, Hamamoto DT, Harding-Rose C, Simone DA. Tumor-evoked hyperalgesia and sensitization of nociceptive dorsal horn neurons in a murine model of cancer pain. Brain Res 2007;1180:7–19.
[20] Kim DS, Figueroa KW, Li KW, Boroujerdi A, Yolo T, Luo ZD. Profiling of dynamically changed gene expression in dorsal root ganglia post peripheral nerve injury and a critical role of injury-induced glial fibrillary acidic protein in maintenance of pain behaviors [Corrected]. PAIN® 2009;143:114–22.
[21] Lan LS, Ping YJ, Na WL, Miao J, Cheng QQ, Ni MZ, Lei L, Fang LC, Guang RC, Jin Z, Wei L. Down-regulation of Toll-like receptor 4 gene expression by short interfering RNA attenuates bone cancer pain in a rat model. Mol Pain 2010;6:2.
[22] Lesage P, Portenoy RK. Trends in cancer pain management. Cancer Control 1999;6:136–45.
[23] Liu S, Liu WT, Liu YP, Dong HL, Henkemeyer M, Xiong LZ, Song XJ. Blocking EphB1 receptor forward signaling in spinal cord relieves bone cancer pain and rescues analgesic effect of morphine treatment in rodents. Cancer Res 2011;71:4392–402.
[24] Liu S, Yang J, Wang L, Jiang M, Qiu Q, Ma Z, Liu L, Li C, Ren C, Zhou J, Li W. Tibia tumor-induced cancer pain involves spinal p38 mitogen-activated protein kinase activation via TLR4-dependent mechanisms. Brain Res 2010;1346:213–23.
[25] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 2001;25:402–8.
[26] Luger NM, Honore P, Sabino MA, Schwei MJ, Rogers SD, Mach DB, Clohisy DR, Mantyh PW. Osteoprotegerin diminishes advanced bone cancer pain. Cancer Res 2001;61:4038–47.
[27] Mantyh PW. Cancer pain and its impact on diagnosis, survival and quality of life. Nat Rev Neurosci 2006;7:797–809.
[28] Mantyh PW. Cancer pain: causes, consequences and therapeutic opportunities. In: McMahon SB, Koltzenburg M, editors. Wall and Melzack's textbook of pain. Edinburgh: Elsevier; 2006. p. 1087–98.
[29] Mao-Ying QL, Zhao J, Dong ZQ, Wang J, Yu J, Yan MF, Zhang YQ, Wu GC, Wang YQ. A rat model of bone cancer pain induced by intra-tibia inoculation of Walker 256 mammary gland carcinoma cells. Biochem Biophys Res Commun 2006;345:1292–8.
[30] Medhurst SJ, Walker K, Bowes M, Kidd BL, Glatt M, Muller M, Hattenberger M, Vaxelaire J, O'Reilly T, Wotherspoon G, Winter J, Green J, Urban L. A rat model of bone cancer pain. PAIN® 2002;96:129–40.
[31] Milligan ED, Watkins LR. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. Nat Rev Neurosci 2009;10:23–36.
[32] Miraucourt LS, Peirs C, Dallel R, Voisin DL. Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through astrocyte-derived D-serine. PAIN® 2011;152:1340–8.
[33] Oliet SH, Panatier A, Piet R, Mothet JP, Poulain DA, Theodosis DT. Neuron-glia interactions in the rat supraoptic nucleus. Prog Brain Res 2008;170:109–17.
[34] Pacharinsak C, Beitz A. Animal models of cancer pain. Comp Med 2008;58:220–33.
[35] Pekny M, Leveen P, Pekna M, Eliasson C, Berthold CH, Westermark B, Betsholtz C. Mice lacking glial fibrillary acidic protein display astrocytes devoid of intermediate filaments but develop and reproduce normally. EMBO J 1995;14:1590–8.
[36] Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. Trends Neurosci 2009;32:421–31.
[37] Peters CM, Ghilardi JR, Keyser CP, Kubota K, Lindsay TH, Luger NM, Mach DB, Schwei MJ, Sevcik MA, Mantyh PW. Tumor-induced injury of primary afferent sensory nerve fibers in bone cancer pain. Exp Neurol 2005;193:85–100.
[38] 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.
[39] Portenoy RK, Thaler HT, Kornblith AB, Lepore JM, Friedlander-Klar H, Coyle N, Smart-Curley T, Kemeny N, Norton L, Hoskins W, Scher H. Symptom prevalence, characteristics and distress in a cancer population. Qual Life Res 1994;3:183–9.
[40] 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.
[41] Ren BX, Gu XP, Zheng YG, Liu CL, Wang D, Sun YE, Ma ZL. Intrathecal injection of metabotropic glutamate receptor subtype 3 and 5 agonist/antagonist attenuates bone cancer pain by inhibition of spinal astrocyte activation in a mouse model. Anesthesiology 2012;116:122–32.
[42] Ren K. Emerging role of astroglia in pain hypersensitivity. Jpn Dent Sci Rev 2010;46:86.
[43] Sabino MA, Luger NM, Mach DB, Rogers SD, Schwei MJ, Mantyh PW. Different tumors in bone each give rise to a distinct pattern of skeletal destruction, bone cancer-related pain behaviors and neurochemical changes in the central nervous system. Int J Cancer 2003;104:550–8.
[44] Schneider G, Voltz R, Gaertner J. Cancer pain management and bone metastases: an update for the clinician. Breast Care (Basel) 2012;7:113–20.
[45] Schwei MJ, Honore P, Rogers SD, Salak-Johnson JL, Finke MP, Ramnaraine ML, Clohisy DR, Mantyh PW. Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. J Neurosci 1999;19:10886–97.
[46] Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathol 2010;119:7–35.
[47] Svensson CI, Brodin E. Spinal astrocytes in pain processing: non-neuronal cells as therapeutic targets. Mol Interv 2010;10:25–38.
[48] 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.
[49] Tetreault P, Dansereau MA, Dore-Savard L, Beaudet N, Sarret P. Weight bearing evaluation in inflammatory, neuropathic and cancer chronic pain in freely moving rats. Physiol Behav 2011;104:495–502.
[50] Theodosis DT, Poulain DA, Oliet SH. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. Physiol Rev 2008;88:983–1008.
[51] Vit JP, Ohara PT, Tien DA, Fike JR, Eikmeier L, Beitz A, Wilcox GL, Jasmin L. The analgesic effect of low dose focal irradiation in a mouse model of bone cancer is associated with spinal changes in neuro-mediators of nociception. PAIN® 2006;120:188–201.
[52] Wacnik PW, Eikmeier LJ, Ruggles TR, Ramnaraine ML, Walcheck BK, Beitz AJ, Wilcox GL. Functional interactions between tumor and peripheral nerve: morphology, algogen identification, and behavioral characterization of a new murine model of cancer pain. J Neurosci 2001;21:9355–66.
[53] Wang LN, Yao M, Yang JP, Peng J, Peng Y, Li CF, Zhang YB, Ji FH, Cheng H, Xu QN, Wang XY, Zuo JL. Cancer-induced bone pain sequentially activates the ERK/MAPK pathway in different cell types in the rat spinal cord. Mol Pain 2011;7:48.
[54] Wang W, Wang Y, Huang J, Wu S, Li YQ. Temporal changes of astrocyte activation and glutamate transporter-1 expression in the spinal cord after spinal nerve ligation-induced neuropathic pain. Anat Rec (Hoboken) 2008;291:513–8.
[55] Winkelstein BA, Rutkowski MD, Sweitzer SM, Pahl JL, DeLeo JA. Nerve injury proximal or distal to the DRG induces similar spinal glial activation and selective cytokine expression but differential behavioral responses to pharmacologic treatment. J Comp Neurol 2001;439:127–39.
[56] Yalcin I, Charlet A, Freund-Mercier MJ, Barrot M, Poisbeau P. Differentiating thermal allodynia and hyperalgesia using dynamic hot and cold plate in rodents. J Pain 2009;10:767–73.
[57] Yao M, Chang XY, Chu YX, Yang JP, Wang LN, Cao HQ, Liu MJ, Xu QN. Antiallodynic effects of propentofylline Elicited by interrupting spinal glial function in a rat model of bone cancer pain. J Neurosci Res 2011;89:1877–86.
[58] Zeppetella G. Breakthrough pain in cancer patients. Clin Oncol (R Coll Radiol) 2011;23:393–8.
[59] Zhang RX, Liu B, Wang L, Ren K, Qiao JT, Berman BM, Lao L. Spinal glial activation in a new rat model of bone cancer pain produced by prostate cancer cell inoculation of the tibia. PAIN® 2005;118:125–36.

Author's personal copy

[60] Zheng Q, Fang D, Cai J, Wan Y, Han JS, Xing GG. Enhanced excitability of small dorsal root ganglion neurons in rats with bone cancer pain. Mol Pain 2012;8:24.
[61] Zhuang ZY, Wen YR, Zhang DR, Borsello T, Bonny C, Strichartz GR, Decosterd I, Ji RR. A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. J Neurosci 2006;26:3551–60.
[62] Zwolak P, Jasinski P, Terai K, Gallus NJ, Ericson ME, Clohisy DR, Dudek AZ. Addition of receptor tyrosine kinase inhibitor to radiation increases tumour control in an orthotopic murine model of breast cancer metastasis in bone. Eur J Cancer 2008;44:2506–17.

Journal of Alzheimer's Disease xx (20xx) x–xx
DOI 10.3233/JAD-143129
IOS Press

Short Communication

An Eighteen-Month *Helicobacter* Infection Does Not Induce Amyloid Plaques or Neuroinflammation in Brains of Wild Type C57BL/6J Mice

Claire Roubaud Baudron[a,b,c,*], Lucie Chambonnier[a,b], Alice Buissionnière[a,b], Alban Giese[b], Nathalie Macrez[b,d], Yoon Cho[b,e], Valérie Fénelon[b,f], Lucie Blaszczyk[b,f], Pierre Dubus[b,g], Philippe Lehours[a,b], Francis Mégraud[a,b], Nathalie Salles[a,b,c] and Christine Varon[a,b]
[a]*INSERM U853, Bordeaux, France*
[b]*University of Bordeaux, Bordeaux, France*
[c]*Pôle de gérontologie clinique, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France*
[d]*CNRS, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, Bordeaux, France*
[e]*CNRS, INCIA, UMR 5287, Bordeaux, France*
[f]*INSERM U862 Physiopathologie de la plasticité neuronale, Bordeaux, France*
[g]*EA 2406 Histologie et Pathologie, Bordeaux France*

Handling Associate Editor: Sim K. Singhrao

Accepted 21 January 2015

Abstract. There is increasing evidence to support the role of infectious agents in the progression of Alzheimer's disease (AD), especially *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). The impact of *Helicobacter* infection on the brain of non-AD predisposed mice was studied. For that, C57BL/6J mice were infected by oral gavage with *H. pylori* SS1 ($n=6$) and *Helicobacter felis* (*H. felis*) ($n=6$) or not infected ($n=6$) for evaluation of neuroinflammation (anti-GFAP and anti-iba1 immunohistochemistry) and amyloid-β deposition (thioflavin-S stain and anti-Aβ immunohistochemistry). After 18-month of infection, *H. pylori* SS1 and *H. felis* infection induced a strong gastric inflammation compared to non-infected mice, but did not induce brain neuroinflammation or amyloid-β deposition.

Keywords: Alzheimer's disease, dementia, GFAP, *Helicobacter pylori*, iba 1, neuroinflammation, thioflavin-S

INTRODUCTION

After approximately 100 years of intensive research studying pathophysiological mechanisms related to Alzheimer's disease (AD), especially amyloid-β (Aβ) peptide and tau protein deposition, the two AD histological hallmarks, the initial process inducing the disease and, ultimately, neurodegeneration has not yet been elucidated [1]. The alteration of the blood-brain barrier [2] and the activation of neuroinflammation [3] seem to play an important role in AD neurodegeneration, especially in the decrease of Aβ clearance [4]. Moreover, it has been proven that systemic

*Correspondence to: Claire Roubaud Baudron, MD PhD, INSERM U853, 33076 Bordeaux cedex, France. Université de Bordeaux, Site de Carreire, 33076 Bordeaux cedex, France. Tel.: +33 5 57 65 66 10; Fax: +33 5 57 65 62 24; E-mail: claire.roubaud@chu-bordeaux.fr.

ISSN 1387-2877/15/$35.00 © 2015 – IOS Press and the authors. All rights reserved

Uncorrected Author Proof

inflammation worsens brain lesions and behavior in a murine model of AD [5, 6] and is even able to induce amyloid-β pathology in wild type (WT) mice when the inflammation starts *in utero* [5]. These data allowed researchers to evoke an infectious hypothesis with several agents like herpes simplex virus (HSV), spirochetes, or *Chlamydia pneumoniae* [7]. These agents have been incriminated in AD pathophysiology because they were detected in AD human brain specimens [8–10] or because they induced an increased production of Aβ peptide [11, 12] when co-cultured with neuronal cells, and finally induced Aβ peptide deposition in the mouse brain [13, 14]. Nevertheless, these preliminary results remain controversial because other research teams have not reproduced them [15, 16]. More recently an association between *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection and AD has been observed in epidemiological studies; two case control studies found a higher prevalence of *H. pylori* infection in AD patients compared to controls [17, 18], and a third study showed that *H. pylori*-positive AD patients presented a more severe cognitive decline compared to non-infected AD patients [19]. Finally recent data shows that *H. pylori* infection could increase the incidence of dementia [20]. In fact, *H. pylori* infection, most often acquired during childhood, induces a lifelong gastric inflammation and remains asymptomatic in 90% of cases [21]. This lifelong gastric inflammation may be implicated in extradigestive diseases [22] via systemic inflammation and atherosclerosis. AD and *H. pylori* infection share several risk factors like living conditions or education levels, restricting conclusions of epidemiological studies. To bypass these limitations, the impact of chronic *H. pylori* infection on brain histopathology of WT non-AD predisposed mice was studied, like Wozniak et al. [14] and Little et al. [13] did previously for HSV and C. *pneumonia,* respectively.

MATERIALS AND METHODS

All animal experiments were performed in level 2 animal facilities at the University of Bordeaux according to institutional guidelines defined by the local Ethical Committee of the University of Bordeaux CEEA50 (approval number 5012044-A) and in conformity with the French Ministry of Agriculture Guidelines on Animal Care and the French Committee of Genetic Engineering (approval number 4608).

Infection of mice with *Helicobacter* species, tissue processing, histological and immunohistochemical staining studying amyloid load and neuroinflammation, quantification scoring and statistical analysis, and *Helicobacter* DNA detection in the brain are detailed in the Supplementary Material.

RESULTS

Gastric inflammation

The successful gastric infection with *H. pylori* and *Helicobacter felis* (*H. felis*), as well as the absence of infection in the non-infected controls, were confirmed for all mice by PCR (data not shown). *H. pylori* and *H. felis* infections were associated with an increased gastric inflammation (mean inflammation score, 1.3 ± 0.61 in controls versus 2.8 ± 0.98 with *H. pylori* SS1 and 3.2 ± 0.41 with *H. felis*, $p < 0.001$).

Amyloid deposition

No amyloid plaque was detected with thioflavin-S stain (Fig. 1) or anti-Aβ immunostaining (data not shown) in C57BL/6J mice after 18 months, neither in *H. pylori* SS1 or *H. felis* nor in non-infected negative controls, whereas amyloid deposition was present in positive control AβPP-PS1 mice.

Neuroinflammation

GFAP-positive astrocytes were present in a higher number and occupied a larger area in AβPP-PS1 mice than in WT mice (Fig. 2A). However, the GFAP-positive astrocyte count and area were not significantly different between control and infected WT mice after 18 months. The iba1-positive microglial cell count and area were also increased in AβPP-PS1 mice compared to WT mice; moreover no difference was observed between infected and non-infected WT mice (Fig. 2B).

H. felis and *H. pylori* DNA were not detected in the brains of infected mice.

DISCUSSION

This study aimed to evaluate the consequence of a natural *Helicobacter* infection in a situation mimicking that in humans, in which infection by the bacteria during childhood induces a chronic gastritis that persists lifelong, and we studied the impact of this chronic gastric inflammation on the brain in aged mice after 18 months of infection. Unlike previous studies with HSV or C. pneumoniae, this study failed to show an induction of AD-like lesions in the brains of non-predisposed AD-mice after an 18-month infection with *H. pylori*.

Uncorrected Author Proof

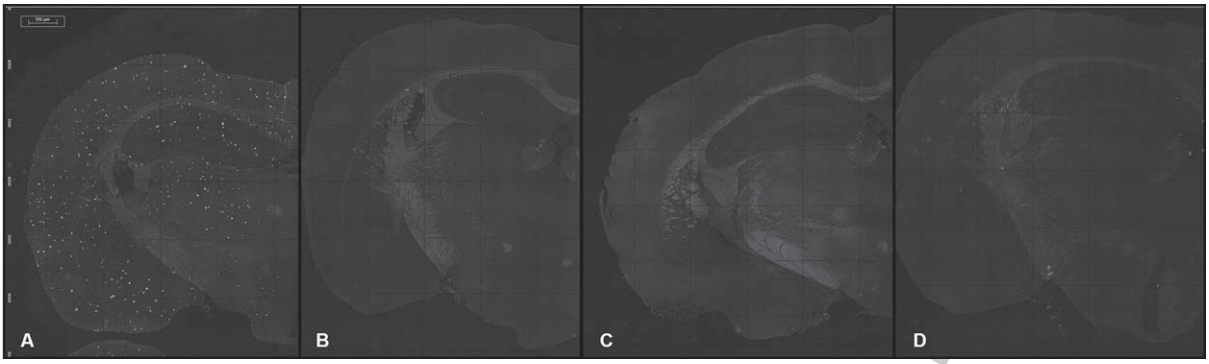


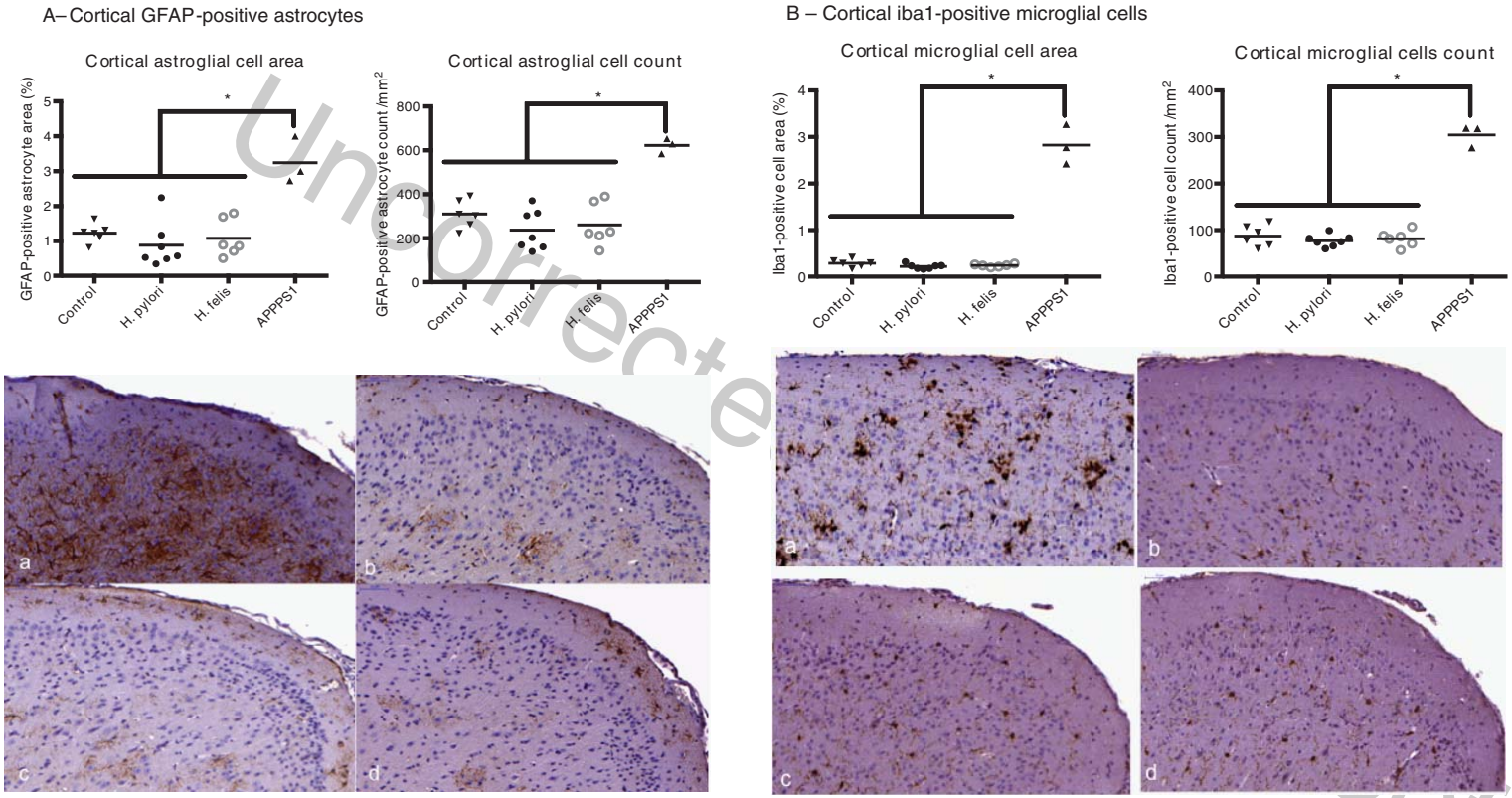
Fig. 1. Detection of amyloid deposition on brain tissue sections. Representative images of coronal hemibrain sections from an uninfected AβPP-PS1 (A), and uninfected control (B) or *Helicobacter pylori* SS1 (C) and *Helicobacter felis* (D) infected WT mice after thioflavin-S staining. White dots in (A) indicate Aβ deposits. Scale bars, 500 μm.

In fact, Little et al. [13] obtained amyloid plaques with astroglial activation in the brains of non-transgenic BALB/c mice following a 3-month infection with C. pneumoniae isolated from the brain of an AD patient postmortem, and Wozniak et al. [14] found deposition of Aβ on brain sections from a BALB/c mouse 5 days after HSV1 infection, using a strain isolated from a patient with a herpes simplex encephalitis. In both studies, the infectious agent was isolated from a human brain. However, more recently, Eisele et al. [23] showed that the intraperitoneal administration of amyloid-β precursor protein (AβPP)-transgenic mice (Tg) brain extract into young AβPP-Tg mice triggered cerebral amyloid deposit after 7 months whereas intraperitoneal inoculation of PBS or brain extract from age-matched, non-Tg WT mice was ineffective. In these studies, it can be considered that HSV and C. pneumoniae isolated from humans were associated with the presence of Aβ peptides which may have behaved like a prion protein in recipient mice. To our knowledge, results of these two studies were not reproduced by others despite several attempts; Boelen et al. detected extracellular Aβ immunoreactivity in the brains of 3-month C. pneumoniae infected WT BALB/c mice but also in the brains of non-infected mice [15], and Guzman-Sanchez et al. [16] concluded that the presence of HSV-1 (16 months post-infection) did not directly cause any significant neurodegeneration in the brain of C57BL/6J mice. Two recent studies found an impact of 7-day intraperitoneal injection of *H. pylori* filtrates (soluble surface fractions or exotoxins secreted from one strain of the bacteria) on amyloid deposition [24] and tau phosphorylation [25] in the brains of WT rats. We did not confirm these results. This discrepancy between these results may be secondary to four main reasons: 1) the choice of animal model, mice in the present study versus rats in the two previous studies; 2) the protocol of Helicobacter challenge: in the present study mice were infected by oral gavage with the live bacteria leading to a long term colonization which seems to be a more physiological situation rather than an intraperitoneal injection with bacterial fractions; 3) amyloid deposition was evaluated by different strategies: by thioflavin-S staining and $A\beta_{1\text{-}42}$ immunohistochemistry in the present study versus enzyme-linked immunosorbent assay against Aβ using a different antibody in the study of Wang et al. [24]; and 4) *H. pylori* strains were different, SS1 Sydney strain versus TN2GF4 Japanese strain.

H. pylori is responsible for asymptomatic gastritis in 90% of the cases. The consequences of its low grade but lifelong inflammation have been implicated in several extradigestive diseases but remain controversial [22]. In contrast to HSV or C. pneumoniae, *H. pylori* cerebral tropism is not very likely, despite the fact that its DNA was found in extragastric locations, like atherosclerotic plaques [26]. Several hypotheses have been suggested to explain the association between *H. pylori* and extradigestive diseases like the effect of the systemic inflammation induced by the infection or autoimmune processes mediated by molecular mimicry [27]. There are no available data in the literature regarding *Helicobacter* infection and inflammation in the brain of infected mice. A preliminary study of our group on AD human cerebrospinal fluid did not find a significant increase of proinflammatory cytokines after adjustment of AD risk factors [19]. The present study is an original research because it attempts for the first to explore an association between *H. pylori* infection and neuroinflammation in the brain of mice.

The choice of C57Bl6 mice (rather than BALB/c background) was based on their ability to develop a

Uncorrected Author



Uncorrected Proof

Fig. 2. Detection and quantification of astrocytes and microglial cells on brain tissue sections. Representative images of cortical sections from an uninfected AβPP-PS1 (a), and uninfected control (b) or *Helicobacter pylori* SS1 (c) and *Helicobacter felis* (d) infected WT mice after anti-GFAP (A) and after anti-Iba 1 (B) immunohistochemistry. Scale bars, 50 μm. Data indicate the mean of the percentages of GFAP-positive astrocyte (A) or microglial (B) area and cell count/mm^2. $^*p < 0.001$.

stronger Th1 immune response to *Helicobacter* infection than BALB/c mice. This Th1 immune response enhanced gastritis induced by infection with *Helicobacter* species [28] and increased the probability of a systemic inflammation as similar to that is observed in humans. *H. felis* was also chosen even though it is not a pathogen in humans because it is a strong gastric inflammation inducer in mice [29].

In this study, the neuroinflammation was evaluated by quantification of the number and the area occupied by astroglial and microglial cells, the increase in these two parameters being a well-accepted sign of activation [30, 31]. Our results do not support the hypothesis that gastric inflammation induced by *H. pylori* infection triggers activation of neuroinflammation in this mouse model.

Further studies on the impact of *H. pylori* infection on AD predisposed mice should produce interesting results. In fact, *H. pylori* infection does not induce amyloid deposition nor does it increase neuroinflammation at this stage in WT mice, but we cannot exclude that these phenomena could be worsened by the infection if the AD pathology is already in progress.

ACKNOWLEDGMENTS

CR was a recipient of a fellowship from the French Alzheimer Plan. LB was a recipient of a fellowship from the French Ministry for Research. We thank B. Rousseau (Animalerie A2, University of Bordeaux, France) for technical assistance in mice experiments. Alban Giese and the Experimental Histology Unit were funded by the Cancéropole Grand Sud Ouest (EA 2406, University of Bordeaux, France).

Authors' disclosures available online (http://j-alz.com/manuscript-disclosures/14-3129r1).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The supplementary material is available in the electronic version of this article: http://dx.doi.org/10.3233/JAD-143129.

REFERENCES

[1] Lansbury PT, Lashuel HA (2006) A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic. *Nature* **443**, 774-779.

[2] Zlokovic BV (2008) The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* **57**, 178-201.

[3] Griffin WS, Barger SW (2010) Neuroinflammatory cytokines-the common thread in Alzheimer's pathogenesis. *US Neurology* **6**, 19-27.

[4] Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, Yarasheski KE, Bateman RJ (2010) Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Sci-enc* **330**, 1774.

[5] Krstic D, Madhusudan A, Doehner J, Vogel P, Notter T, Imhof C, Manalastas A, Hilfiker M, Pfister S, Schwerdel C, Riether C, Meyer U, Knuesel I (2012) Systemic immune challenges trigger and drive Alzheimer-like neuropathology in mice. *J Neuroinflammation* **9**, 151.

[6] Kitazawa M, Oddo S, Yamasaki TR, Green KN, LaFerla FM (2005) Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **25**, 8843-8853.

[7] Miklossy J (2011) Emerging roles of pathogens in Alzheimer disease. *Exp Rev Mol Med* **13**, e30.

[8] Gerard HC, Dreses-Werringloer U, Wildt KS, Deka S, Oszust C, Balin BJ, Frey WH, 2nd, Bordayo EZ, Whittum-Hudson JA, Hudson AP (2006) Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae in the Alzheimer's brain. *FEMS Immunol Med Microbiol* **48**, 355-366.

[9] Miklossy J (1993) Alzheimer's disease–a spirochetosis? *Neuroreport* **4**, 1069.

[10] Wozniak MA, Mee AP, Itzhaki RF (2009) Herpes simplex virus type 1 DNA is located within Alzheimer's disease amyloid plaques. *J Pathol* **217**, 131-138.

[11] Miklossy J, Kis A, Radenovic A, Miller L, Forro L, Martins R, Reiss K, Darbinian N, Darekar P, Mihaly L, Khalili K (2006) Beta-amyloid deposition and Alzheimer's type changes induced by Borrelia spirochetes. *Neurobiol Aging* **27**, 228-236.

[12] Piacentini R, Civitelli L, Ripoli C, Marcocci ME, De Chiara G, Garaci E, Azzena GB, Palamara AT, Grassi C (2010) HSV-1 promotes Ca2+ -mediated APP phosphorylation and Abeta accumulation in rat cortical neurons. *Neurobiol Aging* **32**, 2323 e2313-2326.

[13] Little CS, Hammond CJ, MacIntyre A, Balin BJ, Appelt DM (2004) Chlamydia pneumoniae induces Alzheimer-like amyloid plaques in brains of BALB/c mice. *Neurobiol Aging* **25**, 419-429.

[14] Wozniak MA, Itzhaki RF, Shipley SJ, Dobson CB (2007) Herpes simplex virus infection causes cellular beta-amyloid accumulation and secretase upregulation. *Neurosci Lett* **429**, 95-100.

[15] Boelen E, Stassen FR, van der Ven AJ, Lemmens MA, Steinbusch HP, Bruggeman CA, Schmitz C, Steinbusch HW (2007) Detection of amyloid beta aggregates in the brain of BALB/c mice after Chlamydia pneumoniae infection. *Acta Neuropathol* **114**, 255-261.

[16] Guzman-Sanchez F, Valdivieso F, Burgos JS (2012) Aging-related neurostructural, neuropathological, and behavioral changes associated with herpes simplex virus type 1 brain infection in mice. *J Alzheimers Dis* **30**, 779-790.

[17] Kountouras J, Tsolaki M, Gavalas E, Boziki M, Zavos C, Karatzoglou P, Chatzopoulos D, Venizelos I (2006) Relationship between *Helicobacter pylori* infection and Alzheimer disease. *Neurology* **66**, 938-940.

[18] Malaguarnera M, Bella R, Alagona G, Ferri R, Carnemolla A, Pennisi G (2004) *Helicobacter pylori* and Alzheimer's disease: A possible link. *Eur J Intern Med* **15**, 381-386.

[19] Roubaud-Baudron C, Krolak-Salmon P, Quadrio I, Megraud F, Salles N (2012) Impact of chronic *Helicobacter pylori* infection on Alzheimer's disease: Preliminary results. *Neurobiol Aging* **33**, 1009 e1011-1009.

Uncorrected Author Proof

[20] Roubaud Baudron C, Letenneur L, Langlais A, Buissonniere A, Megraud F, Dartigues JF, Salles N (2013) Does *Helicobacter pylori* infection increase incidence of dementia? The Personnes Agees QUID Study. *J Am Geriatr Soc* **61**, 74-78.

[21] Suerbaum S, Michetti P (2002) *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* **347**, 1175-1186.

[22] Roubaud Baudron C, Franceschi F, Salles N, Gasbarrini A (2013) Extragastric diseases and *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* **18**(Suppl 1), 44-51.

[23] Eisele YS, Obermuller U, Heilbronner G, Baumann F, Kaeser SA, Wolburg H, Walker LC, Staufenbiel M, Heikenwalder M, Jucker M (2010) Peripherally applied Abeta-containing inoculates induce cerebral beta-amyloidosis. *Science* **330**, 980-982.

[24] Wang XL, Zeng J, Feng J, Tian YT, Liu YJ, Qiu M, Yan X, Yang Y, Xiong Y, Zhang ZH, Wang Q, Wang JZ, Liu R (2014) *Helicobacter pylori* filtrate impairs spatial learning and memory in rats and increases beta-amyloid by enhancing expression of presenilin-2. *Front Aging Neurosci* **6**, 66.

[25] Wang XL, Zeng J, Yang Y, Xiong Y, Zhang ZH, Qiu M, Yan X, Sun XY, Tuo QZ, Liu R, Wang JZ (2015) *Helicobacter pylori* filtrate induces Alzheimer-like tau hyperphosphorylation by activating glycogen synthase kinase-3beta. *J Alzheimers Dis* **43**, 153-165.

[26] Ameriso SF, Fridman EA, Leiguarda RC, Sevlever GE (2001) Detection of *Helicobacter pylori* in human carotid atherosclerotic plaques. *Stroke* **32**, 385-391.

[27] Kountouras J, Zavos C, Gavalas E, Boziki M, Chatzopoulos D, Katsinelos P (2007) Normal-tension glaucoma and Alzheimer's disease: *Helicobacter pylori* as a possible common underlying risk factor. *Medical Hypotheses* **68**, 228-229.

[28] Mohammadi M, Nedrud J, Redline R, Lycke N, Czinn SJ (1997) Murine CD4 T-cell response to *Helicobacter* infection: TH1 cells enhance gastritis and TH2 cells reduce bacterial load. *Gastroenterology* **113**, 1848-1857.

[29] Fox JG, Blanco M, Murphy JC, Taylor NS, Lee A, Kabok Z, Pappo J (1993) Local and systemic immune responses in murine *Helicobacter felis* active chronic gastritis. *Infect Immun* **61**, 2309-2315.

[30] Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol* **119**, 7-35.

[31] Ladeby R, Wirenfeldt M, Garcia-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, Dalmau I, Finsen B (2005) Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* **48**, 196-206.

[32] Varon C, Dubus P, Mazurier F, Asencio C, Chambonnier L, Ferrand J, Giese A, Senant-Dugot N, Carlotti M, Megraud F (2012) *Helicobacter pylori* infection recruits bone marrow-derived cells that participate in gastric preneoplasia in mice. *Gastroenterology* **142**, 281-291.

[33] Fox JG, Rogers AB, Whary MT, Ge Z, Ohtani M, Jones EK, Wang TC (2007) Accelerated progression of gastritis to dysplasia in the pyloric antrum of TFF2 -/- C57BL6 x Sv129 *Helicobacter pylori*-infected mice. *Am J Pathol* **171**, 1520-1528.

[34] Paxinos G, Franklin K (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press.

[35] Burkitt MD, Williams JM, Duckworth CA, O'Hara A, Hanedi A, Varro A, Caamano JH, Pritchard DM (2013) Signaling mediated by the NF-kappaB sub-units NF-kappaB1, NF-kappaB2 and c-Rel differentially regulate *Helicobacter felis*-induced gastric carcinogenesis in C57BL/6 mice. *Oncogene* **32**, 5563-5573.

[36] Oleastro M, Menard A, Santos A, Lamouliatte H, Monteiro L, Barthelemy P, Megraud F (2003) Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* **41**, 397-402.

Uncorrected Author Proof

Does *Helicobacter pylori* infection impact the course of Alzheimer's disease? An animal study

Claire ROUBAUD BAUDRON[a,b,c], Lucie BLASZCZYK[b,d], Christine VARON[a,b], Lucie CHAMBONNIER[a,b], Alban GIESE[b,e], Pierre DUBUS[b,e], Nathalie MACREZ[b,f], Susanna PIETROPAOLO[b,g], Thierry LESTE-LASSERRE[b,d], Pierre COSTET[h], Benoit ROUSSEAU[i], Valérie FENELON[b,d], Yoon CHO[b,g], Francis MEGRAUD[a,b] and Nathalie SALLES[a,b,c]

[a] INSERM U853, F-33000, Bordeaux France

[b] University of Bordeaux, F-33000, Bordeaux France

[c] Pôle de gérontologie clinique, CHU de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

[d] INSERM U862, F-33000 Bordeaux, France

[e] EA 2406, F 33000 Bordeaux France

[f] CNRS, UMR 5293**,** F-33000 Bordeaux, France

[g] CNRS, UMR 5287, F-33000 Bordeaux France

[h] Animalerie spécialisée, University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

[i] Animalerie A2, University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

Corresponding author

Claire ROUBAUD BAUDRON, MD MSc

claire.roubaud@chu-bordeaux.fr

INSERM U853, 33076 Bordeaux cedex, France.

Université de Bordeaux, Site de Carreire, 33076 Bordeaux cedex, France

Tel: + 33 5 57 65 65 53 Fax: + 33 5 57 65 62 24

Background. *Helicobacter pylori* infection seems to play a critical role in extra-gastric diseases including Alzheimer's dementia (AD). Chronic *H. pylori* infection could worsen AD lesions *via* atherosclerosis and inflammation.

Objective. To determine the impact of *Helicobacter* species infection on cerebral lesions and the behaviour of AD transgenic (Tg) mice and their wild type (WT) littermates. .

Methods. Tg mice (APPswe/PS1dE9) and their WT littermates were infected with *H. pylori* (n=60) or *Helicobacter felis* (n=60) or left uninfected (n=60). Cognitive performances (Y-maze, open field, novel object location and direct social interaction) and histological abnormalities were evaluated at 4, 6 and 10 months of age. Brain specimens were processed to detect cerebral amyloid plaques (thioflavin-S stain) and astroglial and microglial cells (immunochemistry anti-GFAP and anti-iba-1, respectively). Stomach specimens were processed to detect gastric lesions (hematoxylin and eosin stain). The levels of expression of several genes involved in neuroinflammation (especially gfap and iba-1) were evaluated by quantitative polymerase chain reaction (q-PCR).

Results. *H. pylori* did not lead to any histological or behavioural consequences at 4 months of age, however, at 6 months of age, it was associated with an increased number of amyloid plaques in Tg mice but without changes in behaviours. At 10 months of age, Tg mice showed impaired cognitive and social behaviour with a higher neuroinflammation (immunochemistry and q-PCR) than WT littermates.

Conclusion. *H. pylori* infection was associated with an increased number of brain amyloid plaques, but not with increased neuroinflammation nor a worsening behaviour at 6 and 10 months of age. More studies are needed to conclude that there is an association between *H. pylori* infection and AD.

Key words: neuroinflammation, *Helicobacter pylori*, GFAP, iba-1, Alzheimer's disease, thioflavin-S, dementia, transgenic mice, APPswe-PS1dE9, social behavior, cognition

Introduction

Despite a great amount of investigation to try and explain Alzheimer's disease (AD) pathophysiology, the cause of this neurodegenerative disease is still unknown and current treatments are disappointing. The main hypothesis is the development of an amyloid cascade (1, 2) in which an accumulation of amyloid β-peptide (Aβ) drives AD pathogenesis. The inflammatory hypothesis rests on the influence of microglial and astroglial cells in the Aβ clearance (3) which seems to decrease and explains the Aβ accumulation (4) and the secretion of deleterious cytokines (5). The vascular hypothesis is based on epidemiological studies which report that cardiovascular risk factors (6) increase the incidence of AD. The predominant role of the blood brain barrier is also studied (7). Alois Alzheimer already suggested that an infectious agent could be associated with the neurodegenerative disease he described (8). Thus, the link between AD and several infectious agents has been proposed, especially Herpes Simplex Virus (HSV), *Chlamydia pneumonia* and spirochetes based on epidemiological (9-18) and experimental (19-24) studies. Systemic inflammation, regardless of its aetiology, has also been described as a mechanism increasing cognitive decline (25). More recently, an association with *Helicobacter pylori* has also been considered. This infection is acquired during childhood and often persists during an entire lifetime inducing chronic gastric inflammation. This gastritis remains asymptomatic in approximately 80% of the cases and represents a chronic inflammatory model (26). *Via* Increasing systemic inflammation and homocysteine levels, *H. pylori* infection may contribute to worsen AD lesions. Case-control (27, 28) and cohort studies (29-33) found that *H. pylori* infection is more prevalent among AD patients than non-AD patients and increases the risk of developing AD. More recently, in an experimental study where wild type (WT) C57BL6 mice were infected by *H. pylori* for 18 months, we did not observe any brain amyloid induction or

increased neuroinflammation (data submitted for publication) whereas Wozniak *et al.* (23) and Little *et al.* (20) detected amyloid plaques in the brains of WT mice infected with HSV and *C. pneumoniae* respectively.

Despite failing to induce amyloid deposition in a WT murine model, we decided to test the hypothesis that *H. pylori* infection may worsen damage described in a transgenic (Tg) mouse model of AD. To confirm this hypothesis, we infected APPswe/PS1dE9 mice and their WT littermates with *Helicobacter* spp and we studied their behaviour, brain amyloid deposition and neuroinflammation.

Materials and Methods

Animals

All animal experiments were performed in level 2 animal facilities at the University of Bordeaux according to institutional guidelines defined by the local Ethical Committee of the University of Bordeaux and in conformity with the French Ministry of Agriculture Guidelines on Animal Care and the French Committee of Genetic Engineering (approval number No. 50120144-A).

Double transgenic male APPswe/PS1dE9 mice were free of pathogenic agents including *Helicobacter* species (Jackson Laboratory stock number 005864, Bar Harbor, ME, USA). The colony was maintained as hemizygotes by crossing Tg mice with B6C3F1/J mice in individual ventilated cages. Male littermates were used for WT controls. The Tg mice expressed a mutant form of the human familial AD variant of PS1dE9 (deletion of exon 9) and a chimeric mouse/human amyloid precursor protein APPswe (mouse APP695) harbouring a human Aß domain and mutations K595N and M596L linked to Swedish familial AD kindred under the control of the mouse prion protein promoter (34, 35). This mouse model presents an increased amount of brain amyloid deposits, neuroinflammation and cognitive deterioration with age (36, 37). All mice were genotyped using DNA collected from the tail.

Thirty 12-week old female NMRI mice were used as stimuli in the direct social interaction test. They were purchased from Charles River (Boston, MA, USA) and were germfree, housed in groups of 4-5 individuals, and left undisturbed for at least two weeks before being used for testing.

Infection of mice with Helicobacter species

For mice infection, *H. pylori* SS1 and *Helicobacter felis* CS1 strains were grown on agar plates and cultured under microaerobic conditions (N_2: 85%; O_2: 5%; CO_2: 10%) at 37°C as previously described (38). Ten week-old WT and Tg males were infected by oral gavage with the bacterial suspension every day for 3 days (*H. pylori* SS1, n=75, and *H. felis* CS1, n=75) at 3 weeks of age as described previously (38, 39). Non-infected mice (control group, n=75) were given phosphate buffered saline (PBS) alone. Groups of 30 WT and 45 Tg were used for each specific infection, based on the expected mortality rate of 33% (40). Mice were housed five per microisolator cage on ventilated shelves on a 12-hour day/night cycle with constant humidity and temperature control, with a low content vitamin diet and water *ad libidum*. All testing occurred during the light phase.

Behavioural procedures

Cognitive performance was evaluated at 4, 6 and 10 months of age. For that, one-third of the non-infected (n=20), the *H. pylori* SS1 infected mice (n=20) and the *H. felis* infected mice (n=20) were cognitively tested and sacrificed at each time point (**Figure 1**). Each subgroup consisted of half Tg and half WT mice. Regarding the infectious status, mice could not be tested alternatively because of the risk of cross-contamination between groups. Regarding the number of mice evaluated, the sequence of behavioural testing was repeated two weeks, carried out under identical conditions, so that, half of non-infected mice were tested with the *H. pylori* infected mice the first week and the other half of non-infected mice with the *H. felis* infected mice the second week. Mice were subjected to the same following sequence of behavioural testing. On Day 1, they were assessed in the Y-maze. On Day 2, they were habituated to the object arena and their open field behaviour was recorded without the two

identical objects, followed on Day 3 by the sequential object location test. Finally, on the last Day 4, the direct social interaction was recorded.

Spatial recognition in the Y-maze

Apparatus and procedures

A grey plastic Y-maze adapted to the size of the biosafety cabinet was designed as follows: three identical arms were spaced at 120° from each other, and they measured 35 cm long, 5.2 cm wide and 9.8 cm high. A Plexiglass plate covering the Y-maze was used to avoid the mice escaping. Extra maze visual cues were put on the walls of the safety cabinet. A camera localized above the Y-maze tracked images.

Each mouse was isolated in a cage (365 x 207 x 140 mm) for 20 min. During the first sample period, the mouse was placed at the end of the "start" arm and allowed to explore freely both the "start" and the "familiar" arm for 5 min, while the third arm ("novel" arm) was closed by a grey door at the entrance. Then the mouse was removed from the Y-maze and placed for 10 min in its waiting cage. During the second test period, the door blocking the "novel arm" was removed. The mouse was placed at the end of the same "start arm" and allowed to explore the entire maze for 2 min. Timing of the 2 min test phase period was initiated only once the mouse had left the start arm. In the interval between the sample and the test phase, the apparatus was cleaned with alcohol and water to remove odour residue.

Allocation of arms ("start", "familiar" and "novel") was counterbalanced within each experimental group.

Variables measured

An observer, unaware of either the genotype or the infectious status, measured the time spent in the "start", "familiar" and "novel" arms. The time spent exploring the "novel" arm

was compared according to the different genotype/infectious groups. A ratio of the time spent in the "novel" arm divided by the time spent in all three arms (Preference Index) was calculated.

Open field

Apparatus and procedures

After being isolated for at least 10 minutes, mice were habituated to the open field arena (425 x 266 x 185 mm) on Day 2. The bottom and sides of the cage were made of plastic covered with an opaque tissue. They were allowed to explore the arena freely for 20 min and were recorded with a digital camera placed above the arena. The centre of the arena was defined as a remote rectangle 5 cm from the arena edges.

Variables measured

Recorded videoframes were analyzed using Ethovision Software (Noldus, Wageningen, The Netherlands). The total distance moved and the percentage of time spent in the centre were measured as indicators of the locomotor performance and the emotional reactivity, respectively.

New object location

Apparatus and procedures

On Day 3, two identical dark parallelepiped objects were put in adjacent corners of the arena. Mice were free to explore these two objects for 10 min after which they were removed and placed in a holding cage for 30 min. In the second trial, one of the identical objects was moved to a new location (another corner of the arena so that the two objects were at opposite positions) and mice were allowed to explore them for 5 min.

Variables measured

An observer, blind to all conditions, manually scored the object exploration times using then recorded images. The time spent exploring the new object (i.e. sniffing the object) and preference index (ratio of time spent exploring the object at the new location divided by the time spent exploring the 2 objects) were compared between genotype/infectious groups. The preference index was also compared to the chance level (50%, one-sample t-test).

Direct social interaction with an adult female

Apparatus and procedures

Direct social interaction was evaluated in a standard mouse cage in which the experimental animals were isolated for 1 hour for habituation. An unfamiliar stimulus mouse (a 12-week-old NMRI female) was introduced into the cage and left for 3 min. A camera located in front of the cage tracked images. Each stimulus animal was employed several times in the same experiment (2-3 times in total). The use and order of presentation of the stimulus animal were balanced across genotypes. The NMRI strain is commonly employed in studies of social behaviour, because of its high level of sociability (41).

Variables measured

An observer, unaware of the genotype and the infectious status, analyzed images between 0 and 3 min using ETHOLOG software (42). The recorded time that the experimental animal spent performing several behavioural categories was scored (43). Sniffing the anogenital region, the nose or the rest of the body, allogrooming (i.e. grooming the NMRI mouse) and mounting were considered as affiliate behaviour. Digging, self-grooming and rearing were considered as non-social activities.

Histological analysis

Tissue processing

After behavioural procedures, mice were anesthetized with isoflurane and ketamine/xylazine. Then mice were euthanized by cervical dislocation. Stomachs were removed and fixed for 24 h in a 3.7 % neutral-buffered formalin solution (Sigma Aldrich, Saint Louis, MI, USA). Brains were removed and cut longitudinally; half of the brain was fixed in 4% paraformaldehyde with 0.01% glutaraldehyde solution (Sigma Aldrich) and the other half was dissected in several parts (cortex and hippocampus) and frozen at -80°C. Stomach and brain fixations were followed by standard histological processing and paraffin embedding.

Histological and immunohistochemical staining

Three µm sections from paraffin-embedded stomachs were processed for hematoxylin/eosin/safran (HES) staining following the standard procedure. Five µm brain sections were deparaffinised, rehydrated and stained with 1% thioflavin-S (Sigma Aldrich) for 8 min then washed with Tris buffered saline (TBS) (2 times 15 min) and 50% ethanol solution (2 times 15 min), and mounted with Vectashield anti-fade mounting medium (Vector Laboratories, Peterborough, UK).

For immunohistochemistry detection, 5 µm sections from paraffin-embedded brains were rehydrated, washed and heated to 100°C for 30 min for antigen retrieval using a homemade buffer, Tris ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA 1 mM), pH 9, then left for 30 min at room temperature (RT). After washing in TBS (3 times 10 min), endogenous peroxidases were inhibited with 3% hydrogen peroxide in H_2O for 5 min. Sections were blocked for 30 min in a solution of bovine serum albumin (BSA, 1%) with goat serum (10%) in TBS (Sigma Aldrich).

Slides were then incubated for 3 h at RT with primary rabbit anti-GFAP (1:2000) (Dako, Trappes, France) or anti-iba-1 (1:1000) (Wako, Osaka, Japan) (Invitrogen, Saint Aubin, France) for detection of astroglia and microglia, respectively, followed by a 30 min incubation at RT with labelled polymer-HRP anti-rabbit antibodies (DAKO Envision Systems, Dako), washed with TBS and revealed by an additional 10 min incubation with Liquid DAB Substrate-Chromogen System (DAKO) at RT. Slides were counterstained with haematoxylin, dehydrated and mounted with Eukitt-mounting medium (Labonord, Pessac, France).

Histological scoring

Gastric histology was scored blindly using a numerical scale of 1 to 4 for quantification of inflammation as previously described (38). Hippocampal and cortical GFAP-positive astrocyte and iba-1-positive microglial cell counts and areas were determined automatically by Mercator software (Explora Nova, Mercator, La Rochelle, France) on coronal sections localized approximately 1.8 mm behind the bregma when scanned by Panoramic viewer 1.15 (3D Histech, Budapest, Hungary) (44). The threshold of detection was held constant during analysis and all measurements were conducted in a blinded fashion. Amyloid plaques on thioflavin-S slides were counted manually also in a blinded fashion.

Quantitative real-time PCR (q-PCR).

Cortical and hippocampal brain tissue samples were homogenized in Trizol (Fermentas, Fisher Scientific SAS, Illkirch, France) and RNA was isolated using a standard chloroform/isopropanol protocol (45). RNA was processed and analyzed following an adaptation of published methods (46, 47). Briefly, cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA using RevertAid Premium Reverse Transcriptase (Fermentas) and primed with oligo-dT

primers (Fermentas) and random primers (Fermentas). Q-PCR was performed using a LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Meylan, France). Q-PCR reactions were carried out in duplicate for each sample, using transcript-specific primers, cDNA (4 ng) and LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche) in a final volume of 10 µl. The PCR data were exported and analyzed in an informatics tool (Gene Expression Analysis Software Environment) developed at the Neuro Centre Magendie, in Bordeaux, France. For the determination of the reference gene, the Genorm method was used (47). Relative expression analysis was corrected for PCR efficiency and normalized against two reference genes. In particular, the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) and the tubulin alpha 4A (*tuba4a*) genes were used as reference genes for the brain cortex, while the translation elongation factor 1 (e*ef1a1*) and the succinate dehydrogenase complex subunit A (*sdha*) genes were used as reference genes for the hippocampus. The relative level of expression was calculated using the comparative ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method with non-infected WT mice as reference at each point of sacrifice (48). Primer sequences are reported in table 1. The level of gene expression concerned the neuroinflammation: astrocytes (*gfap, vimentin*), microglia (*iba-1*, *cd11b*), *tumour necrosis factor* (*tnf*)-α, *cyclo-oxygenase* 2, *nuclear factor-kappa B* (*NFκB*) (49, 50), the endothelial cell junction (*occludin*, *claudin-5* (51, 52)) and finally *human app*.

Statistical analysis

Quantitative results were expressed as a mean +/- standard error (SE). At each age of sacrifice (M4, M6 and M10) cognitive and histological data were analyzed using a two way-ANOVA with infectious status and genotype as between-group factors followed by a post hoc Tukey's test. For the comparison of amyloid plaques and mRNA *human app*, age and

infectious status were used as factors for the two-way ANOVA. For the new object location, the preference index was also compared to chance level (0.5, one-sample t-test).

All statistical analyses were performed with GraphPad Prism 6.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Behaviour

Y-maze

During the first sample period, mice showed no preference for either of the two arms of the maze (data not shown). No significant effect of the infection or the genotype was observed at 4 and 6 months of age regarding the time spent in the new arm (**Figure 2**, upper) and the Preference Index (**Figure 2**, lower). At 10 months of age, Tg mice spent less time in the new arm (genotype effect $F(1, 50)=5.55$, $p=0.022$) irrespective of the infectious status (genotype x infection interaction $F(2, 50)=0.87$, $p=0.42$) and the Preference Index was decreased in the Tg mice (genotype effect $F(1,53)=6.38$, $p=0.015$) irrespective of the infectious status (infection x genotype interaction $F(2, 53)= 0.91$, $p=0.41$).

Open field

During habituation of the arena (**Figure 3**), at 4 months of age, *H. pylori* Tg mice travelled a greater distance than the other groups of mice contributing to a significant effect of infection ($F(2, 53)=8.91$, $p<0.001$) and genotype ($F(1, 53)=10.5$, $p<0.001$), but no significant genotype x infection interaction was observed ($F(2, 53)=2.26$, $p=0.11$). At 6 and 10 months of age, no effects of infection or genotype were observed. The percentage of time spent in the centre was not significantly different regarding genotype and infectious status.

Novel object location

While no effect was observed at 4 and 6 months, at 10 months of age, Tg mice spent more time sniffing the object at the new location ($F(1, 57)=11.1$, $p<0.001$); this was irrespective of

the infectious status (genotype x infection interaction F(2, 57)=1.4, p=0.25, **Figure 4**). When the index preference was compared to the chance level (0.5, one simple t-test), non-infected WT (p=0.013) and *H. pylori* infected WT mice (p=0.006) exhibited a preference for the object at the new location at 4 months of age, while all mice presented a preference for the object at the new location compared to the chance level at 6 months of age. At 10 months of age, only non-infected WT mice (p=0.024) and *H. felis* infected WT mice (p=0.011) demonstrated a preference for the object at the new location compared to the chance level.

Social interaction

No significant effects of infectious status and genotype were observed neither at 4 nor at 6 months of age. However, at 10 months of age, Tg mice, irrespective of the infection status, displayed lower levels of affiliation compared with their WT littermates (genotype effect F(1, 54)=25.5, p<0.001; genotype x infection interaction F(2, 54)=1.01, p=0.34, **Figure 5**). Regarding non-social interaction no significant differences were observed (data not shown).

Gastric inflammation

At 4 months of age, the gastric inflammation score was already higher in infected groups, (infection effect F(2, 51)=69.3, p<0.001), whether Tg or WT (genotype effect F(1, 51)=0.15, p=0.70; genotype x age interaction F(2, 51)=0.80, p=0.45). *H. felis* infection induced a higher inflammation than *H. pylori* (post hoc, p<0.001)(F**igure 6)**. Gastric inflammation scores at 6 and 10 months of age are not yet available.

Amyloid deposition

Senile plaques were detected in 4 month-old Tg mice and there was an overall increase in

the number of plaques with age (age effect F(2, 89)=497, p<0.001) (**Figure 7**). Infection was associated with an increase in senile plaques (infection effect F(2,89)=6.74, p=0.02) irrespective of the ~~genotype~~ (F(4, 89)=1.7, p=0.15). In fact, at 6 months of age, the number of plaques increased in the *H. pylori* infected group (post hoc, p=0.04). This difference was confirmed at 10 months of age (post hoc, p=0.03). Results are presented in **Figure 8**.

Neuroinflammation

Representative pictures of iba-1-positive microglial cells in the cortex of infected and non-infected mice at different ages are shown in **Figure 9.** Quantitative results are not yet available at 4 and 6 months of age. At 10 months of age, iba-1-positive microglial cells were more numerous (genotype effect F(2, 64)=19.2, p<0.001) and occupied a larger area (genotype effect F(1, 66)=19.4, p<0.001) in the Tg mouse hippocampus. This effect was also observed in the Tg mouse cortex (number of cells (genotype effect F(1,59)=61.9, p<0.001); cell area (genotype effect F(1,65)=36.3, p<0.001)). No infection effect was observed and there was no interaction between age and infection (**Figure 10**).

Results also showed more numerous GFAP-positive astroglial cells which occupied a higher area in the cortex of Tg mice compared to WT mice at 10 months of age (genotype effect area (F(1,54)=64, p<0.001); number (F(1, 52)=110, p<0.001)). Representative pictures are shown in **Figure 11**. In the hippocampus no difference between genotype was noticed. The infection was not associated with an increase in astroglial activation in the cortex or in the hippocampus (**Figure 12).**

Quantitative real-time PCR (q-PCR)

Results of quantitative real-time PCR in the cortex and the hippocampus are presented in **Figures 13** and **14**, respectively.

At 10 months of age, irrespective of the infectious status, Tg mice exhibited increased cortical messenger RNA (mRNA) levels of *iba1* ($F(1,54)=34.3$, $p<0.001$), *cd11b* ($F(1,54)=22$, $p<0.001$) *gfap* ($F(1, 54)=270$, $p<0.001$), *tnf-α* ($F(1, 54)=29$, $p<0.001$) and *il-6* ($F(1,54)=12.1$, $p<0.001$). These increases in Tg mice were also present from 6-months of age for *gfap* ($F(1, 54)=77$, $=<0.001$) and for *tnf-α* ($F(1, 54)=7$, $p=0.001$). Infections, irrespective of the genotype, were associated with a decrease in cortical mRNA levels of expression of *iba1* ($F(1, 51)=14$, $p<0.001$) from 6 months of age and of *gfap* ($F(1, 51)=3.4$, $p=0.038$), *nfkb* ($F(1, 51)=12.2$, $p<0.001$), *cox 2* ($F(1, 51)=23.2$, $p<0.001$) and *cd11b* ($F(1, 51)=15$, $p<0.001$) from 4 months of age. However infection was associated with an increase in cortical mRNA levels of *il-6* at 10 months of age irrespective of the genotype (infection effect $F(1, 24)=3.2$, $p=0.048$). Cortical or hippocampal human APP mRNA decreased in Tg infected mice (infection effect, cortex $F(2, 81)=10$, $p<0.001$; hippocampus $F(2, 79)=8.2$, $p<0.001$). Infection was associated with a decrease in *claudin-5* mRNA levels (infection effect $F(1, 53)=9.3$, $p<0.001$) at 6-months of age but with an increase at 10-month of age (infection effect $F(1, 53)=10$, $p<0.001$). Results in the hippocampus showed the same trends.

Discussion

Several epidemiological studies support a link between AD and *H. pylori* infection (27-33, 53) but potential confounding factors could explain such an association. To bypass these epidemiological elements, especially socioeconomic conditions, we studied the impact of the infection in a murine model of AD.

The main result of this study is the increase in the amyloid plaque number in the brain of *H. pylori* infected Tg mice compared to non-infected Tg mice from 6 months of age. However this result has to be considered cautiously. In fact, amyloid plaques were manually counted and the area occupied by these amyloid plaques was not available. In principle, this manual method can be considered suitable because indeed the number of plaques in brain samples of non-infected Tg mice is comparable to data previously published (37). However, the number of plaques is an indirect element of the amyloid burden. Moreover, the level of expression of the *human app* gene was lower in infected Tg mice. These preliminary histological results have to be confirmed by an automatic quantification (number and area) after slide scanning.

One of the several hypotheses explaining the link between *H. pylori* infection and AD is based on the possible increase in brain inflammation *via* an induced systemic inflammation. Whereas we found increased neuroinflammation in the brain of Tg mice compared to WT mice as previously described in this murine model (49), histological results showed no difference regarding infectious status and to the contrary, brain expression of several neuroinflammation genes (*iba-1*, *gfap*, *cd11b*, *tnf-α*, *nfκb*, *cox2*) measured by q-PCR was decreased due to the infection at 4 and 6 months of age. We do not have an explanation for this decrease. These results do not support our hypothesis of an impact of the inflammation induced by *H. pylori* on neuroinflammation. Thereby, the association between the *H. pylori*

infection and systemic inflammation is still debatable (54-63). Moreover, the choice of a reliable marker of systemic chronic inflammation is difficult because most of them have a short half-life. Two *Helicobacter* species were used in this study. *H. pylori* is the main species responsible for infection in humans and *H. felis* is known to induce higher gastric inflammation than *H. pylori* in mice (38). In the future, it would be interesting to test a correlation between gastric inflammation, amyloid burden, cognitive deficits and neuroinflammation and to measure several pro-inflammatory cytokines in mouse serum.

Another hypothesis regarding the *H. pylori*-AD link is a vascular association. Amyloid angiopathy was not examined in this study but the expression of two endothelial cell junction genes was considered without conclusive results whereas Aβ seems to influence endothelial cell tight junctions in the human brain (51) and the rat brain (52).

Although *H. pylori* infection was associated with more numerous brain amyloid plaques, its influence on behaviour was not detected in this study. In fact, infection was not associated with a behavioural deterioration. Among the four cognitive tests used, direct social interaction, novel object location and Y-maze presented a difference between Tg and WT mice at 10 months of age. The open field showed that WT and Tg mice had the same locomotor performance and emotional reactivity. A comparison of these results with previously published data is difficult because they were run under specific conditions. In fact, *H. pylori* is a class I human carcinogen according to the World Health Organization (64), so behavioural tests with infected experimental animals had to be carried out in a safety cabinet. Consequently we had to take several constraints into consideration, especially space, noise and light. Because of the ventilation under the safety cabinet, the odour recognition task was not carried out. The hippocampal-dependent spatial learning was evaluated by the Y-maze instead of the more widely used Morris water maze (40, 49) because it was not

feasible in our study. Direct social interaction was already carried out with double mutant AD Tg mice but not with our exact strain (43), however other social tests have been used with our strain (65). Finally, despite the technical difficulties, three tests were validated and no association between infection and behavioural deterioration was found.

The negative results of our study can be explained by several elements. First of all, *Helicobacter* species infection, despite positive epidemiological studies, does not have an impact on the severity of AD. Second, by the choice of three evaluation time points (4, 6 and 10 months of age) was debatable. In the APPswe/PS1dE9 murine model, amyloid plaques appeared between 4 and 6 months of age (34, 36, 37), and some cognitive deficits appeared before amyloid deposition like novel object location (66) and most the studies found cognitive deficits around 7-8 months of age (40, 49, 67). Therefore, by choosing 4 and 6 months of age, our aim was to determine whether the infection accelerates amyloid deposition and cognitive deficits. The end point at 10 months of age was established to confirm 4 and 6 month results. However, *a posteriori*, this endpoint seems too early. In fact, neuroinflammation and cognitive deficits were only present at 10 months of age. A later point would have possibly provided more information. Finally, this AD murine model only reproduces amyloid pathology and not Tau pathology, the other histological hallmark of AD. Thus we cannot exclude that *Helicobacter* infection is associated with the Tau pathology. In a previous study, we found that AD patients infected by *H. pylori* had a higher level of phosphorylated protein Tau in cerebrospinal fluid compared to non-infected AD patients (53).

In conclusion, this preliminary animal study explored for the first time a possible association between AD and *H. pylori* infection. *H. pylori* appears to be associated with an increased

amyloid burden but this result needs to be confirmed by an automated analysis. This increase in the amyloid burden was not associated with deteriorating behaviour or with an increased neuroinflammation in APPswe/PS1dE9 mice. More studies are needed to conclude whether there is an association or not between AD and *Helicobacter* infection.

Acknowledgments including sources of support

CR was a recipient of a fellowship from the French Alzheimer Plan. LB was a recipient of a studentship from the French Ministry for Research. The Cancéropole Grand Sud Ouest funded Alban Giese and the Experimental Histology Unit. This project was supported by the grant LABEX BRAIN-ANR-10-LABX-43.

Conflict of interest: none

References

1. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science;297(5580):353-356.
2. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. Science 256(5054):184-185.
3. Boche D, Nicoll JA. The role of the immune system in clearance of Abeta from the brain. Brain pathology2008;18(2):267-278.
4. Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, et al. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. Science;330(6012):1774.
5. Griffin WS, Barger SW. Neuroinflammatory Cytokines-The Common Thread in Alzheimer's Pathogenesis. US Neurol 2010;6(2):19-27.
6. McGuinness B, Todd S, Passmore AP, et al. Systematic review: Blood pressure lowering in patients without prior cerebrovascular disease for prevention of cognitive impairment and dementia. J Neurol, Neurosurg Psychiatry 2008 Jan;79(1):4-5.
7. Benarroch EE. Neurovascular unit dysfunction: a vascular component of Alzheimer disease? Neurology 2007;68(20):1730-1732.
8. Fischer O. Miliare Nekrosen mit drusigen Wucherungen der Neruofibrillen, eine regelmässige Veränderung der Hirnrinde bei seniler Demenz. Monarschr F Psychiat Neurol. 1907;22:361-372.
9. Balin BJ, Gerard HC, Arking EJ, et al. Identification and localization of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's brain. Med Microbiol Immunol 1998;187(1):23-42.
10. Gerard HC, Dreses-Werringloer U, Wildt KS, et al. *Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae* in the Alzheimer's brain. FEMS Immunol Med Microbiol 2006;48(3):355-366.
11. Hammond CJ, Hallock LR, Howanski RJ, et al. Immunohistological detection of Chlamydia pneumoniae in the Alzheimer's disease brain. BMC Neurosci 2010;11:121.
12. Itabashi S, Arai H, Matsui T, et al. Herpes simplex virus and risk of Alzheimer's disease. Lancet 1997;349(9058):1102.
13. Itzhaki RF, Lin WR, Shang D, et al. Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease. Lancet 1997;349(9047):241-244.
14. Jamieson GA, Maitland NJ, Wilcock GK, et al. Latent herpes simplex virus type 1 in normal and Alzheimer's disease brains. J Med Virol 1991;33(4):224-227.
15. Letenneur L, Peres K, Fleury H, et al. Seropositivity to herpes simplex virus antibodies and risk of Alzheimer's disease: a population-based cohort study. PLoS One 2008;3(11):e3637.
16. Loeb MB, Molloy DW, Smieja M, et al. A randomized, controlled trial of doxycycline and rifampin for patients with Alzheimer's disease. J Am Geriatr Soc 2004;52(3):381-387.
17. MacDonald AB. Borrelia in the brains of patients dying with dementia. JAMA 1986;256(16):2195-2196.
18. Miklossy J. Alzheimer's disease - a neurospirochetosis. Analysis of the evidence following Koch's and Hill's criteria. J Neuroinflammation 2011;8:90.
19. Alvarez G, Aldudo J, Alonso M, et al. Herpes simplex virus type 1 induces nuclear accumulation of hyperphosphorylated tau in neuronal cells. J Neurosci Res 2012;90(5):1020-1029.
20. Little CS, Hammond CJ, MacIntyre A, et al. *Chlamydia pneumoniae* induces Alzheimer-like amyloid plaques in brains of BALB/c mice. Neurobiol Aging 2004;25(4):419-429.

21. Miklossy J, Kis A, Radenovic A, et al. Beta-amyloid deposition and Alzheimer's type changes induced by Borrelia spirochetes. Neurobiol Aging 2006;27(2):228-236.
22. Piacentini R, Civitelli L, Ripoli C, et al. HSV-1 promotes Ca2+ -mediated APP phosphorylation and Abeta accumulation in rat cortical neurons. Neurobiol Aging 2010;32(12):2323 e2313-2326.
23. Wozniak MA, Itzhaki RF, Shipley SJ, et al. Herpes simplex virus infection causes cellular beta-amyloid accumulation and secretase upregulation. Neurosci Lett 2007 2010;429(2-3):95-100.
24. Zambrano A, Solis L, Salvadores N, et al. Neuronal cytoskeletal dynamic modification and neurodegeneration induced by infection with herpes simplex virus type 1. J Alzheimers Dis 2008;14(3):259-269.
25. Holmes C. Review: systemic inflammation and Alzheimer's disease. Neuropathol Appl Neurobiol. 2013;39(1):51-68.
26. Konturek SJ, Konturek PC, Konturek JW, et al. *Helicobacter pylori* and its involvement in gastritis and peptic ulcer formation. J Physiol Pharmacol 2006;57 Suppl 3:29-50.
27. Kountouras J, Tsolaki M, Gavalas E, et al. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and Alzheimer disease. Neurology 2006;66(6):938-940.
28. Malaguarnera M, Bella R, Alagona G, et al. *Helicobacter pylori* and Alzheimer's disease: a possible link. Eur J Intern Med 2004;15(6):381-386.
29. Roubaud Baudron C, Letenneur L, Langlais A, et al. Does *Helicobacter pylori* infection increase incidence of dementia? The Personnes Agees QUID Study. J Am Geriatr Soc 2013;61(1):74-78.
30. Beydoun MA, Beydoun HA, Shroff MR, et al. *Helicobacter pylori* seropositivity and cognitive performance among US adults: evidence from a large national survey. Psychosom Med 2013;75(5):486-496.
31. Chang YP, Chiu GF, Kuo FC, et al. Eradication of *Helicobacter pylori* Is Associated with the Progression of Dementia: A Population-Based Study. Gastroenterol Res Pract 2013; 2013:175-729.
32. Huang WS, Yang TY, Shen WC, et al. Association between *Helicobacter pylori* infection and dementia. J Clin Neurosci 2014.
33. Katan M, Moon YP, Paik MC, et al. Infectious burden and cognitive function: the Northern Manhattan Study. Neurology 2013;80(13):1209-1215.
34. Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, et al. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. Hum Mol Genet 2004;13(2):159-170.
35. Jankowsky JL, Slunt HH, Ratovitski T, et al. Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. Biomol Eng 2001;17(6):157-165.
36. Ruan L, Kang Z, Pei G, et al. Amyloid deposition and inflammation in APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res 2009;6(6):531-540.
37. Garcia-Alloza M, Robbins EM, Zhang-Nunes SX, et al. Characterization of amyloid deposition in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease. Neurobiol Dis 2006;24(3):516-524.
38. Varon C, Dubus P, Mazurier F, et al. *Helicobacter pylori* infection recruits bone marrow-derived cells that participate in gastric preneoplasia in mice. Gastroenterology 2012;142(2):281-291.

39. Fox JG, Rogers AB, Whary MT, et al. Accelerated progression of gastritis to dysplasia in the pyloric antrum of TFF2 -/- C57BL6 x Sv129 *Helicobacter pylori*-infected mice. Am J Pathol 2007;171(5):1520-1528.
40. Gimbel DA, Nygaard HB, Coffey EE, et al. Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein. J Neurosci 2010 5;30(18):6367-6374.
41. D'Amato FR, Pavone F. Reunion of separated sibling mice: neurobiological and behavioral aspects. Neurobiol Learn Mem 1996;65(1):9-16.
42. Ottoni EB. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. Behav Res Methods Instrum Comput 2000;32(3):446-449.
43. Pietropaolo S, Delage P, Lebreton F, et al. Early development of social deficits in APP and APP-PS1 mice. Neurobiol Aging 2012;33(5):1002 e1017-1027.
44. Paxinos G, Franklin K. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press 2001.
45. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987;162(1):156-159.
46. Favereaux A, Thoumine O, Bouali-Benazzouz R, et al. Bidirectional integrative regulation of Cav1.2 calcium channel by microRNA miR-103: role in pain. Embo J 2011;30(18):3830-3841.
47. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem 2009;55(4):611-622.
48. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 2001;25(4):402-408.
49. Zhang W, Bai M, Xi Y, et al. Multiple inflammatory pathways are involved in the development and progression of cognitive deficits in APPswe/PS1dE9 mice. Neurobiol Aging 2012;33(11):2661-2677.
50. Li W, Poteet E, Xie L, et al. Regulation of matrix metalloproteinase 2 by oligomeric amyloid beta protein. Brain Res 2011;1387:141-148.
51. Carrano A, Hoozemans JJ, van der Vies SM, et al. Neuroinflammation and blood-brain barrier changes in capillary amyloid angiopathy. Neurodegener Dis 2012;10(1-4):329-331.
52. Marco S, Skaper SD. Amyloid beta-peptide1-42 alters tight junction protein distribution and expression in brain microvessel endothelial cells. Neurosci Lett 2006;401(3):219-224.
53. Roubaud-Baudron C, Krolak-Salmon P, Quadrio I, et al. Impact of chronic *Helicobacter pylori* infection on Alzheimer's disease: preliminary results. Neurobiol Aging 2012;33(5):1009 e1011-1009.
54. Danesh J, Whincup P, Walker M, et al. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. BMJ 2000;321(7255):199-204.
55. Kanbay M, Gur G, Yucel M, et al. Does eradication of *Helicobacter pylori* infection help normalize serum lipid and CRP levels? Dig Dis Sci 2005;50(7):1228-1231.
56. Liu L, Liu Y, Tong W, et al. Pathogen burden in essential hypertension. Circ J 2007;71(11):1761-1764.
57. Lu YH, Yen HW, Lin TH, et al. Changes of coronary risk factors after eradication of *Helicobacter pylori* infection. J Med Sci 2002;18(6):266-272.
58. Patel P, Mendall MA, Carrington D, et al. Association of *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* infections with coronary heart disease and cardiovascular risk factors. BMJ 1995;311(7007):711-714.

59. Perri F, Clemente R, Festa V, et al. Serum tumour necrosis factor-alpha is increased in patients with *Helicobacter pylori* infection and CagA antibodies. Ital J Gastroenterol Hepatol 1999;31(4):290-294.
60. Russo F, Jirillo E, Clemente C, et al. Circulating cytokines and gastrin levels in asymptomatic subjects infected by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Immunopharmacol Immunotoxicol 2001;23(1):13-24.
61. Singh RK, McMahon AD, Patel H, et al. Prospective analysis of the association of infection with CagA bearing strains of *Helicobacter pylori* and coronary heart disease. Heart 2002;88(1):43-46.
62. Stone AF, Mendall MA, Kaski JC, et al. Effect of treatment for Chlamydia pneumoniae and *Helicobacter pylori* on markers of inflammation and cardiac events in patients with acute coronary syndromes: South Thames Trial of Antibiotics in Myocardial Infarction and Unstable Angina (STAMINA). Circulation 2002 3;106(10):1219-1223.
63. Torgano G, Cosentini R, Mandelli C, et al. Treatment of *Helicobacter pylori* and Chlamydia pneumoniae infections decreases fibrinogen plasma level in patients with ischemic heart disease. Circulation 1999;99(12):1555-1559.
64. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer 1994;61:1-241.
65. Cheng D, Logge W, Low JK, et al. Novel behavioural characteristics of the APP(Swe)/PS1DeltaE9 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Behav Brain Res 2013;245:120-127.
66. Bonardi C, de Pulford F, Jennings D, et al. A detailed analysis of the early context extinction deficits seen in APPswe/PS1dE9 female mice and their relevance to preclinical Alzheimer's disease. Behav Brain Res 2011;222(1):89-97.
67. Phillips M, Boman E, Osterman H, et al. Olfactory and visuospatial learning and memory performance in two strains of Alzheimer's disease model mice-a longitudinal study. PLoS One 2011;6(5):e19567.

Figures

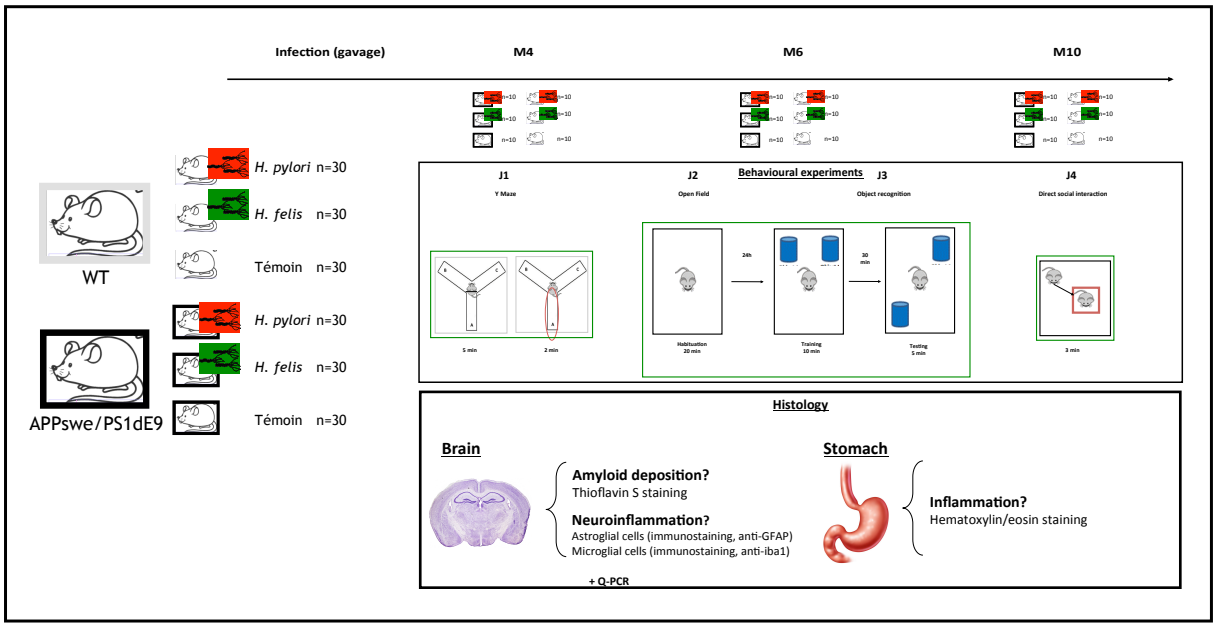


Figure 1. Behavioural procedure. Q-PCR, quantitative polymerase chain reaction; WT, wild type;

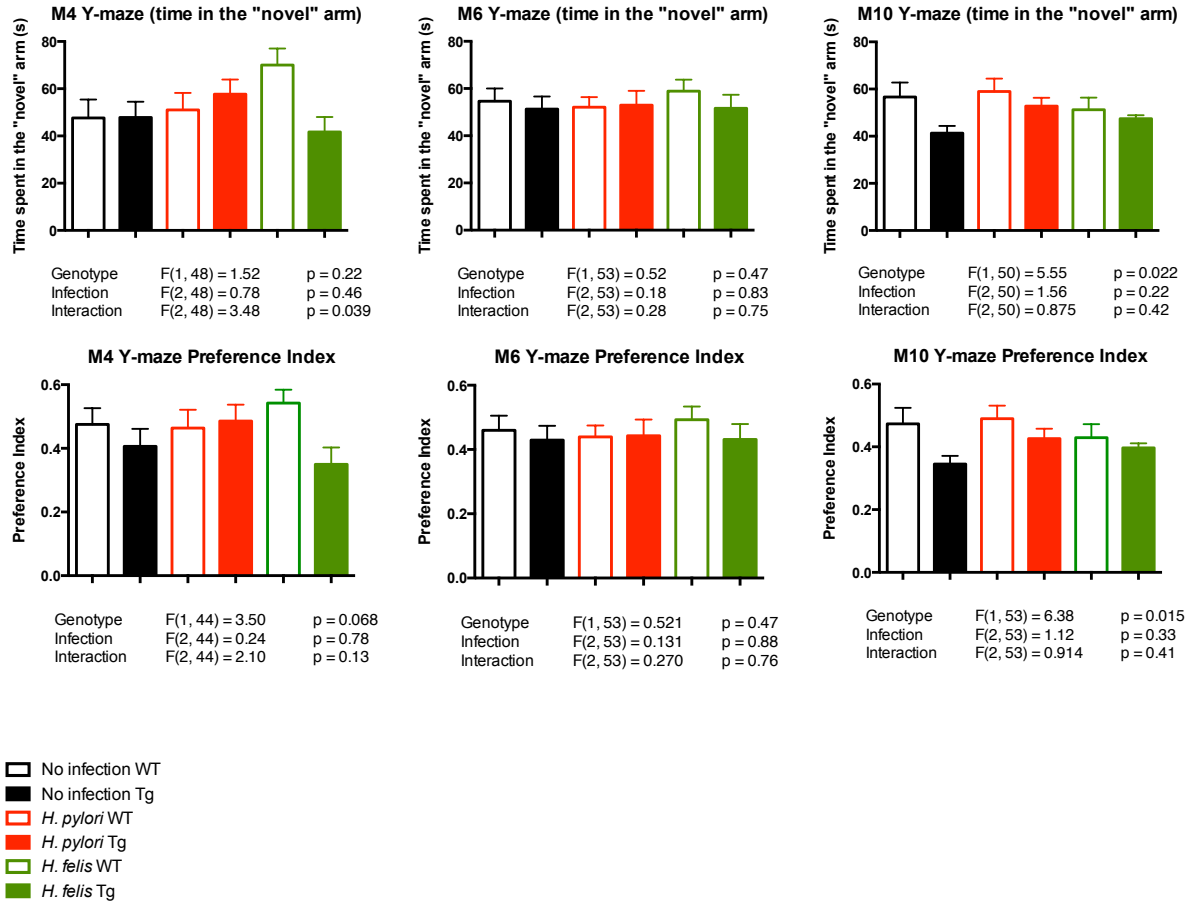


Figure 2. Y-maze. Time spent in the "new" arm (up) and Preference Index (Ratio of the time spent in the "new" arm divided by the time spent in the "new" + "familiar" + "start" arms) (down) at 4, 6 and 10 months of age. Error Bar: ± 1 Standard Error

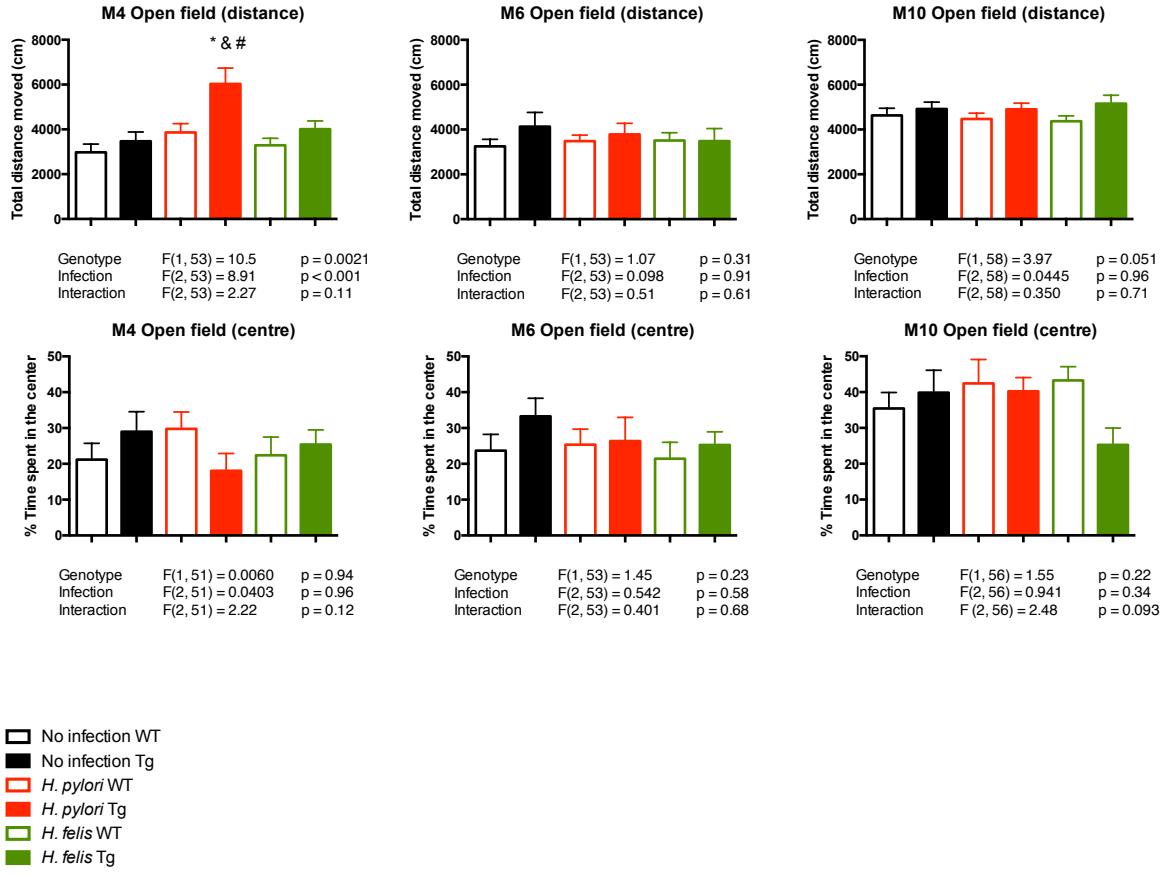


Figure 3. Open field. Total distance moved (up) and percentage of time spent in the centre (down) *<0.05, non-infected WT versus each other group; & p<0.05 *H. pylori* Tg and *H. felis* Tg versus non-infected Tg. # p<0.05 WT versus Tg within each infection group. Error Bar: ± 1 Standard Error

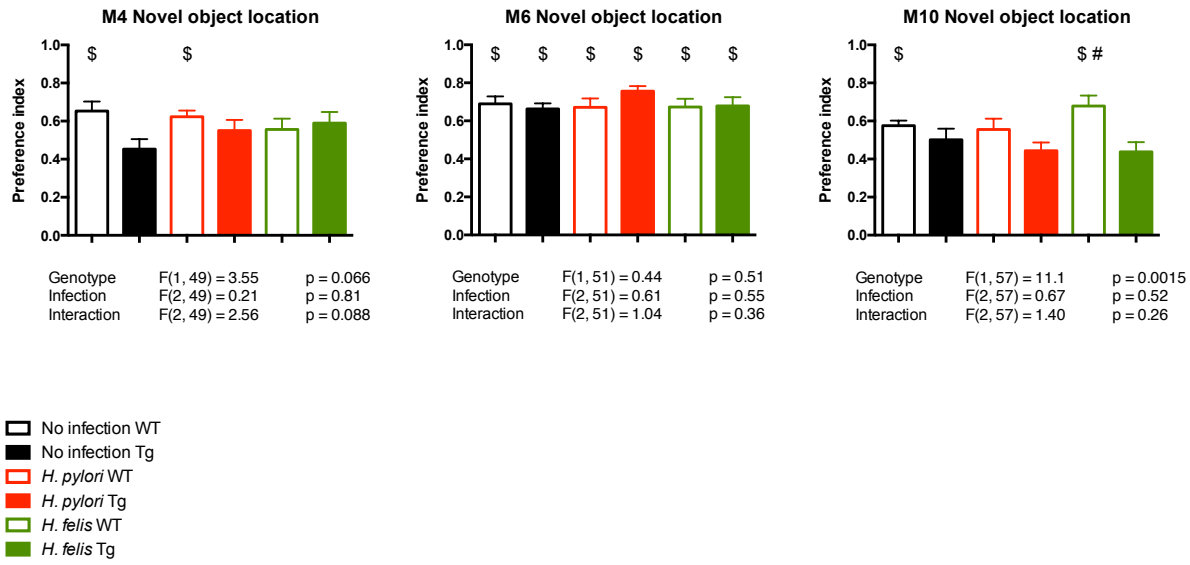


Figure 4. Novel object location. Preference index at 4, 6 and 10 months of age. # p<0.05 WT versus Tg within each infection group. $ p<0.05 is related to the comparison of the index preference to the chance level (0.5, one simple t-test). Error Bar: ± 1 Standard Error

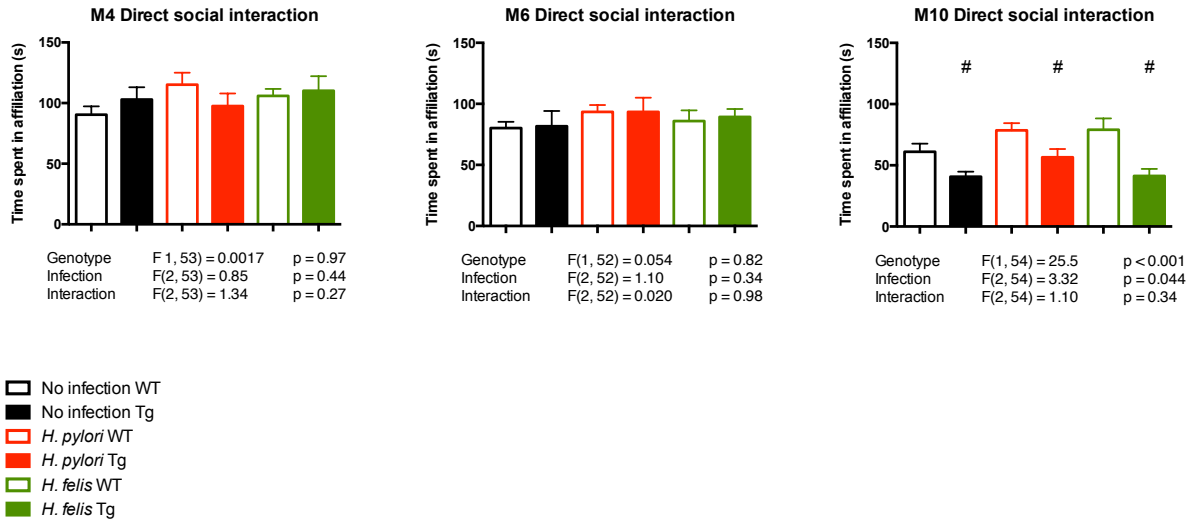


Figure 5. Direct social interaction. Time spent in affiliation 4, 6 and 10 months of age. # p<0.05 WT versus Tg within each infection group. Error Bar: ± 1 Standard Error

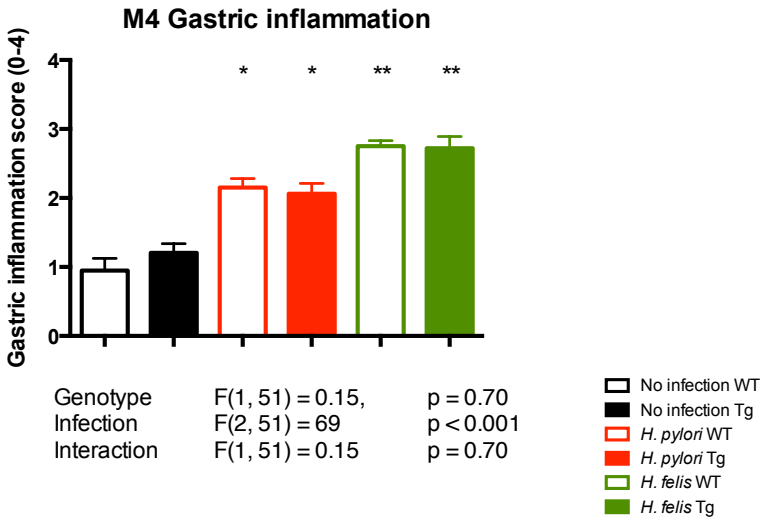


Figure 6. Gastric inflammation at 4 months of age. * p<0.05 versus non-infected WT mice, ** p<0.05 versus *H. pylori* infected WT mice. Error Bar: ± 1 Standard Error

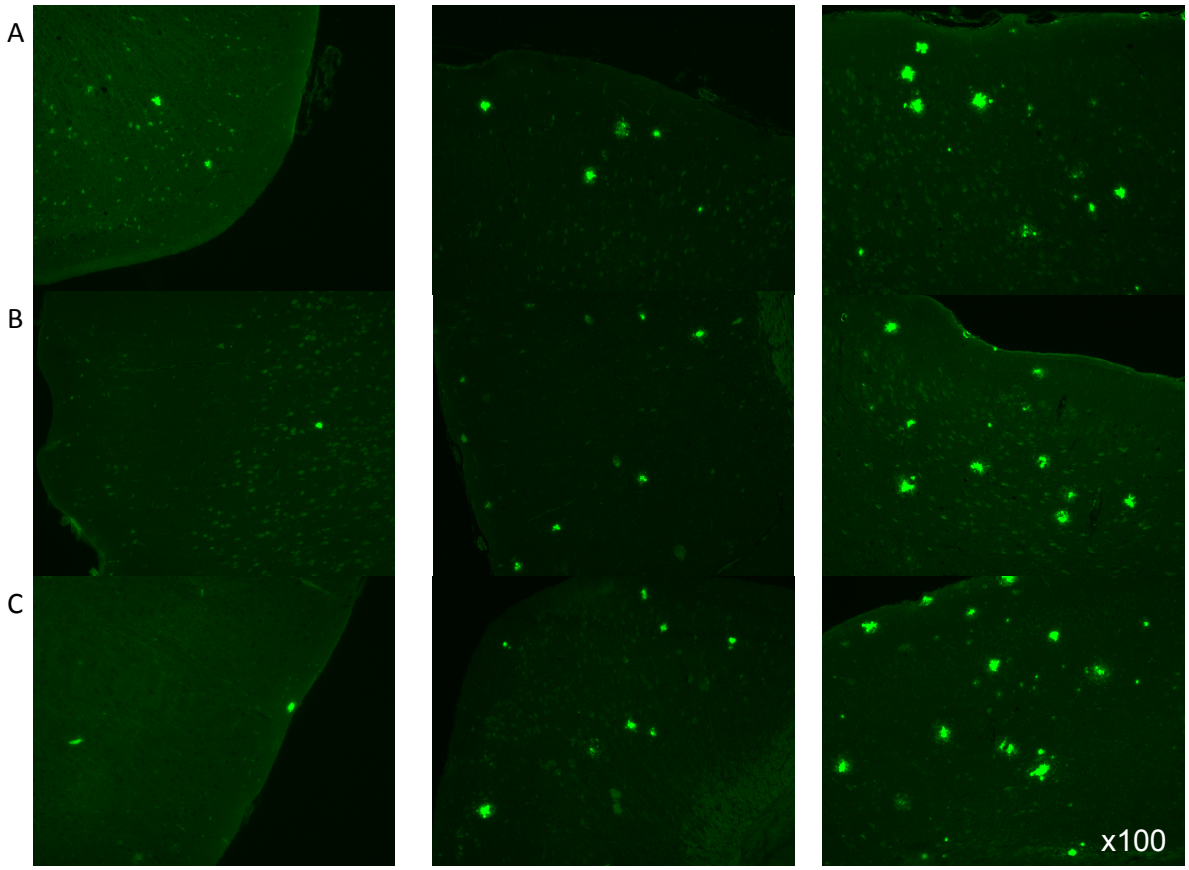


Figure 7. Amyloid deposition. Illustrative example of senile plaque evolution at 4 (left), 6 (middle) and 10 (right) months of age after thioflavin S staining in coronal sections of the cortex from non-infected (A) or infected by *H. pylori* (B) or *H. felis* (C) Tg mice.

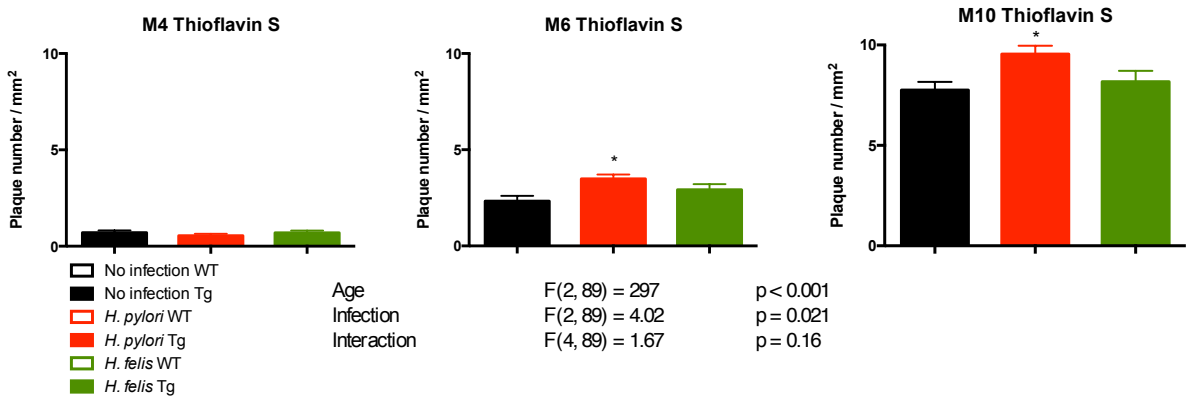


Figure 8. Amyloid load. Quantitative results of the amyloid plaques number regarding infectious status at 4, 6 and 10 months of age, * p<0.05 versus non-infected Tg mice. Error Bar: ± 1 Standard Error

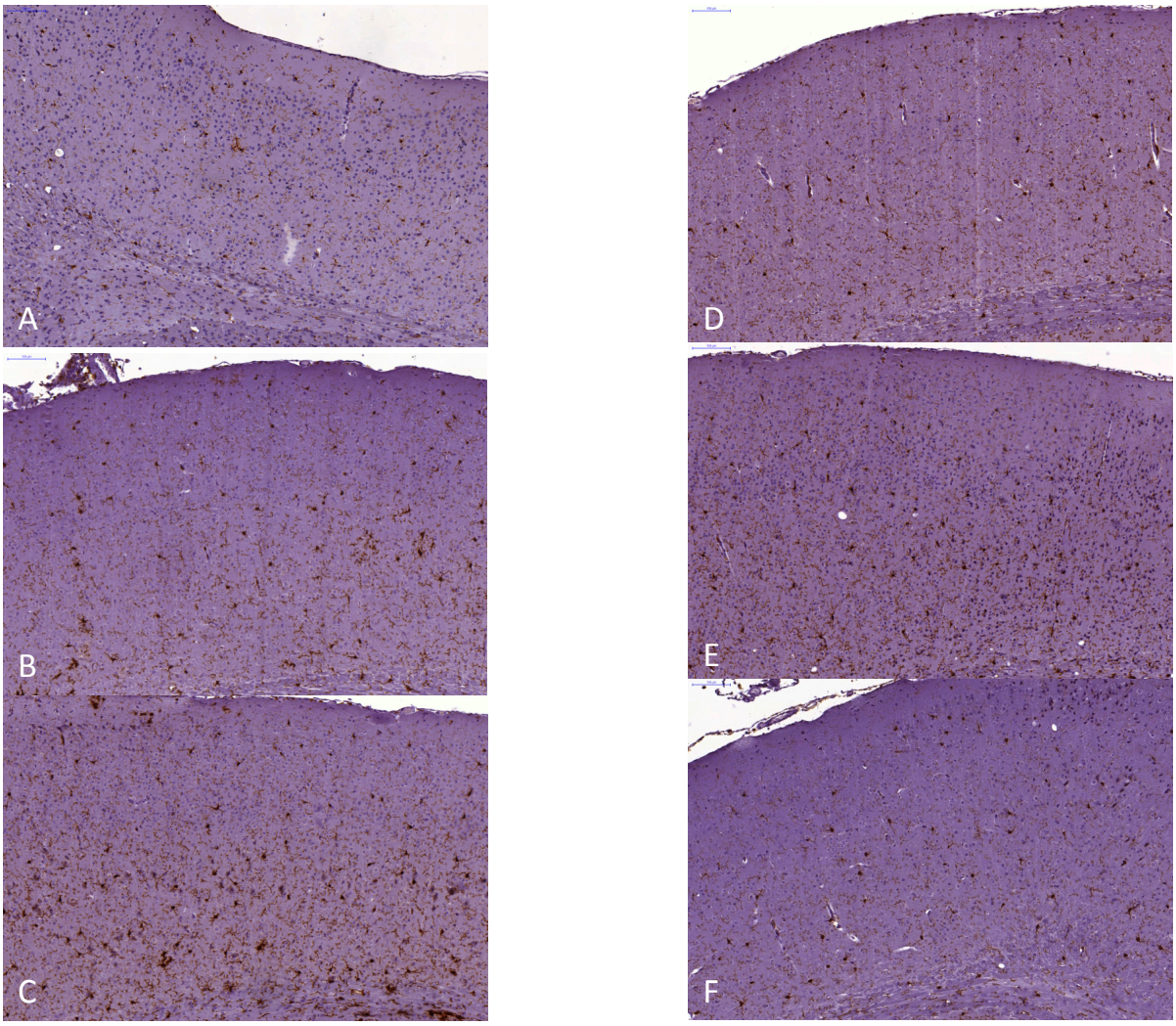


Figure 9A

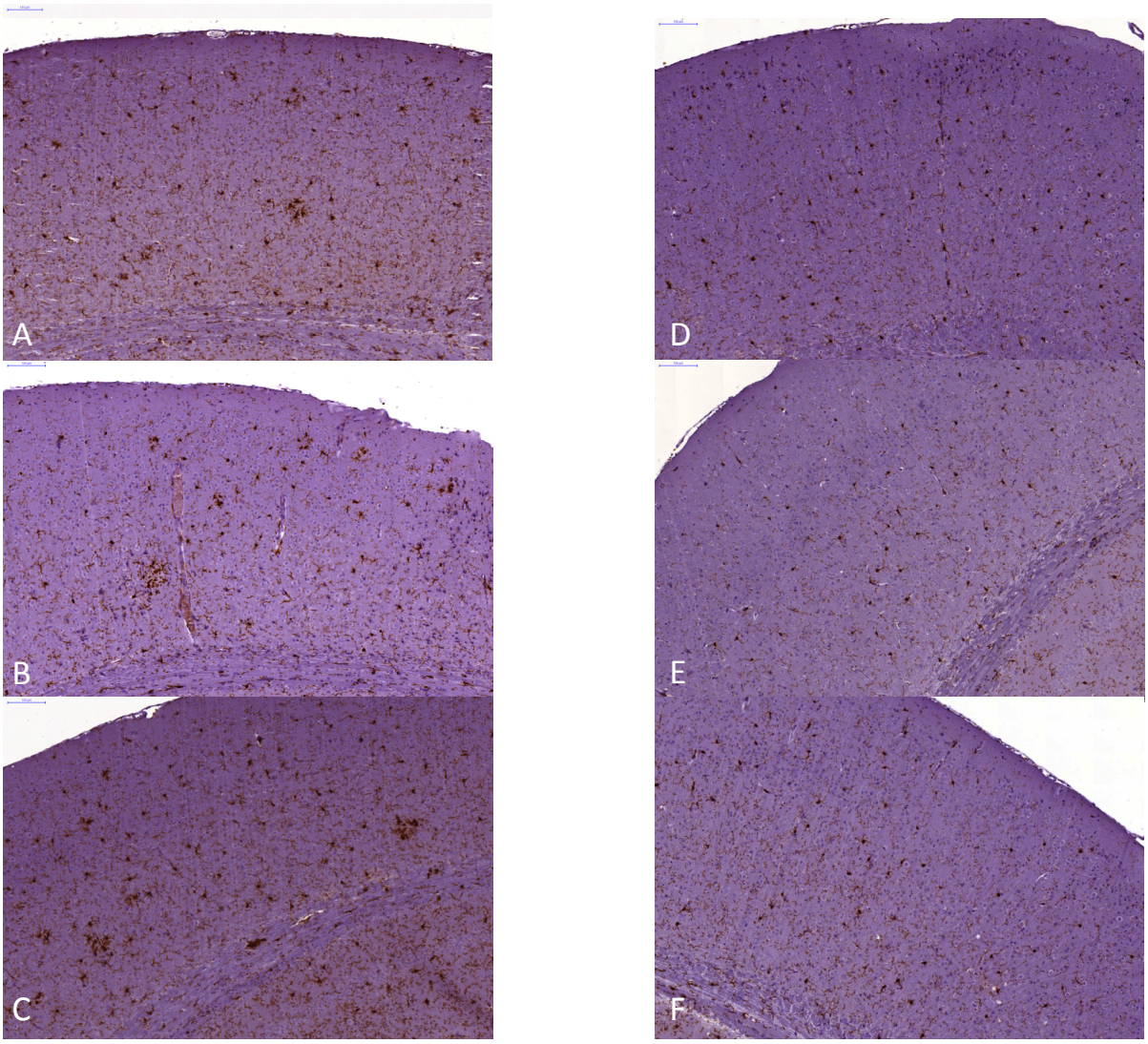


Figure 9B

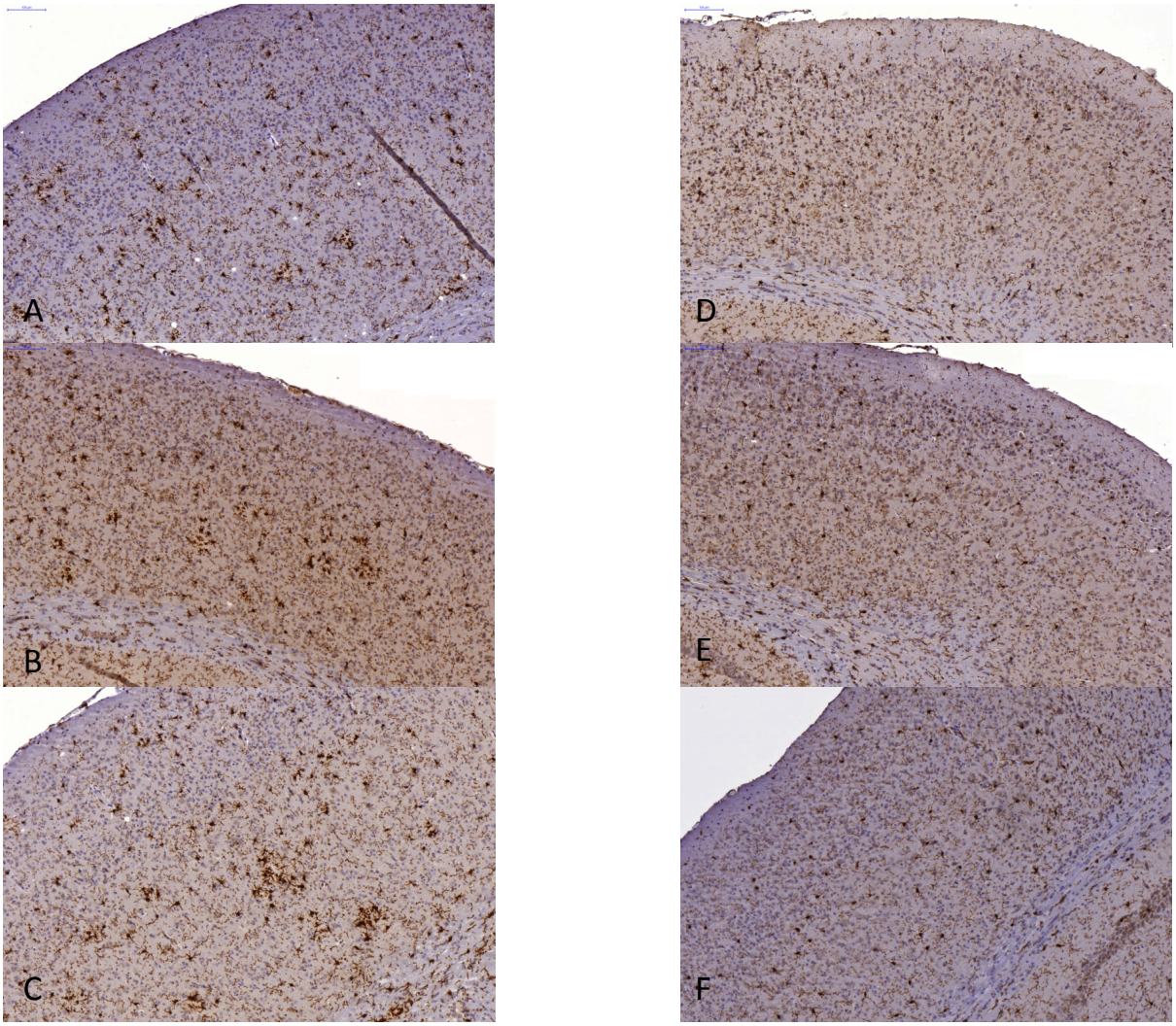


Figure 9C

Figure 9. **Microglial distribution.** Illustrative examples of microglial cell distribution after anti-iba-1 immunostaining of Tg (left) and WT (right) cortical brain sections of non-infected mice (A,D) and mice infected by *H. pylori* (B, E) or *H. felis* (C,F) at 4 (figure 9A), 6 (figure 9B) and 10 (figure 9C) months of age.

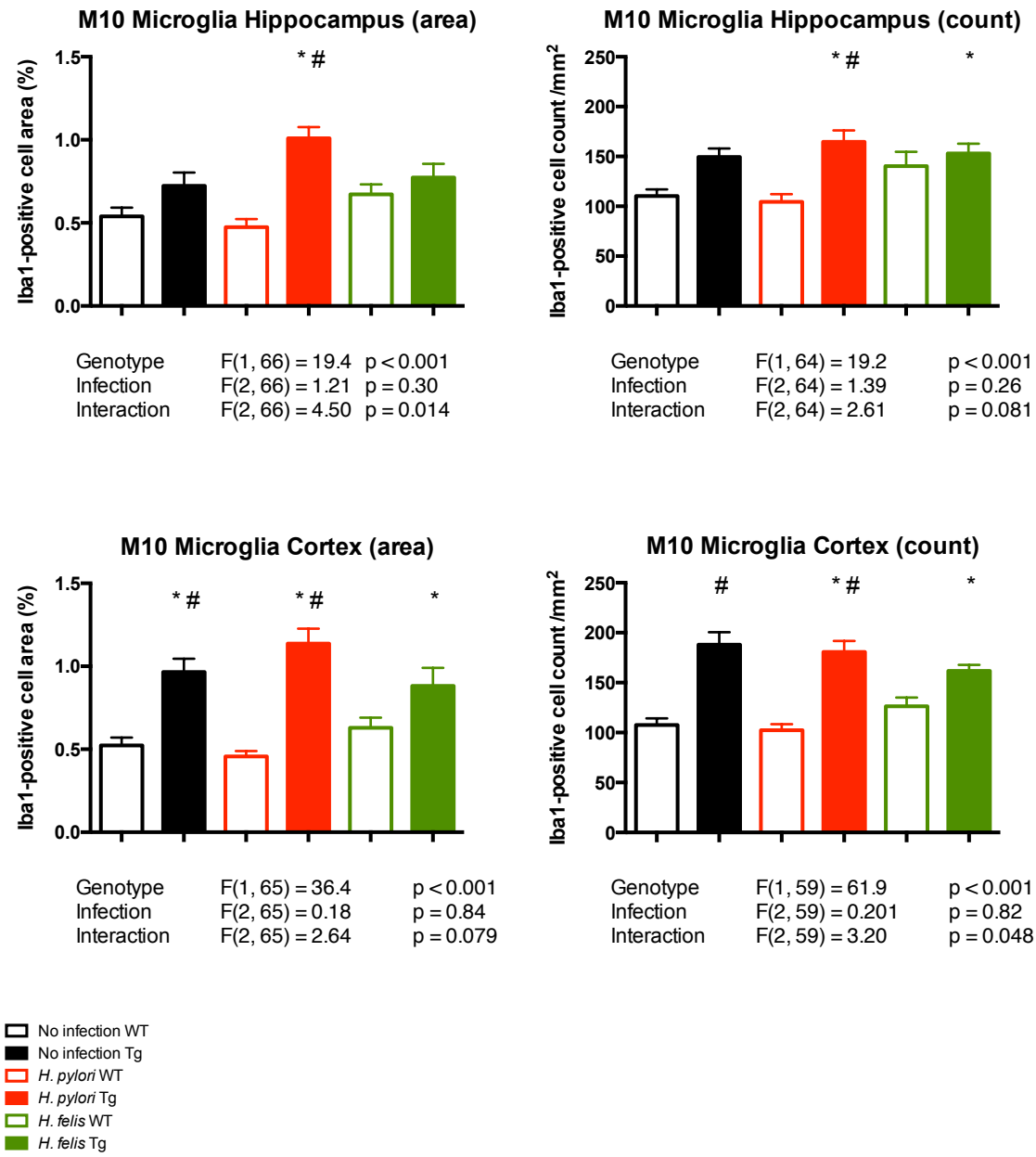


Figure 10. Microglia at 10 months of age. Hippocampal (up) and cortical (down) iba1-positive microglial cell counts and area regarding genotype and infectious status. . *p<0.05 versus non-infected WT mice. # p<0.05 Tg versus WT within each infection group. Error Bar: ± 1 Standard Error

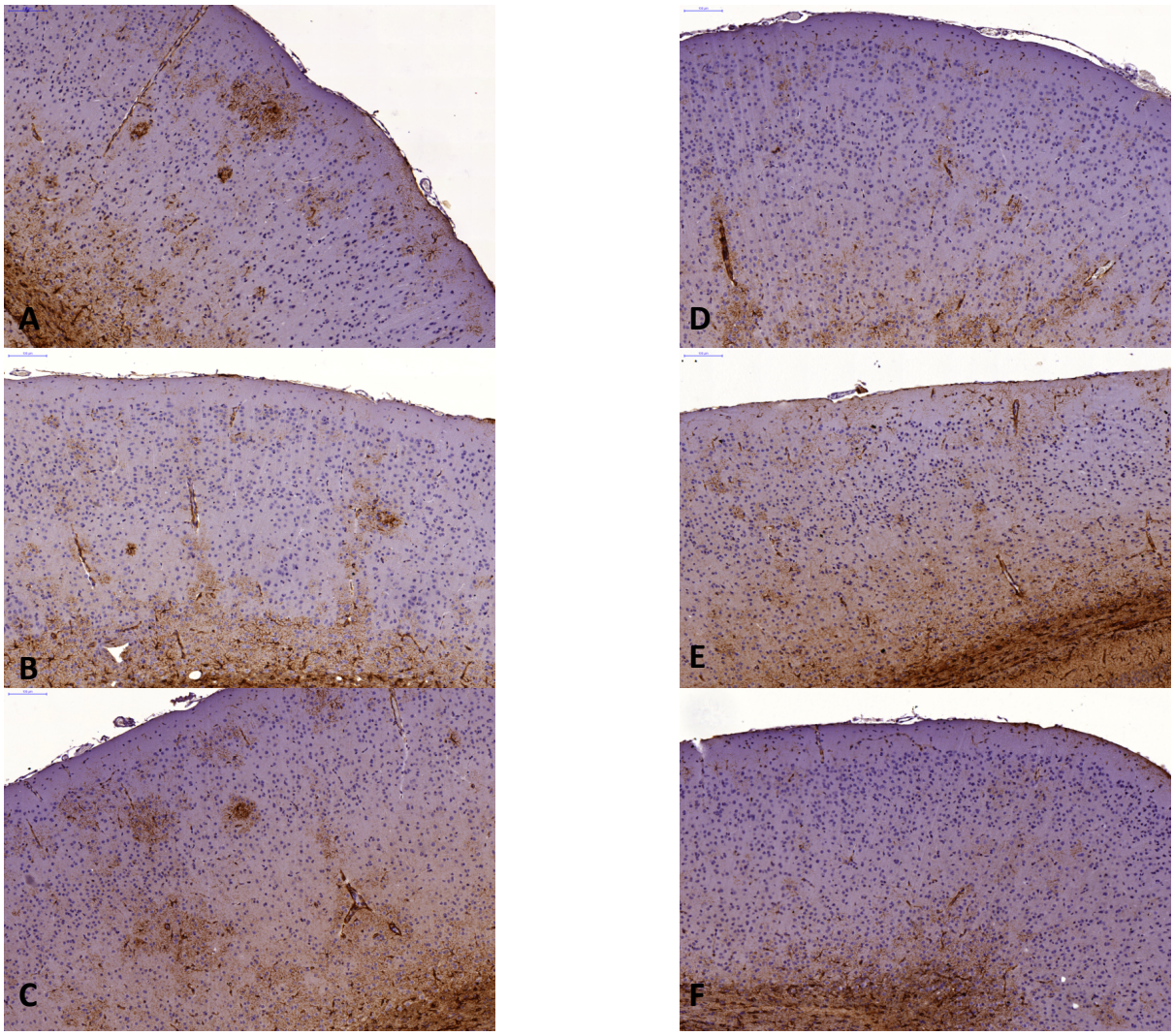


Figure 11A

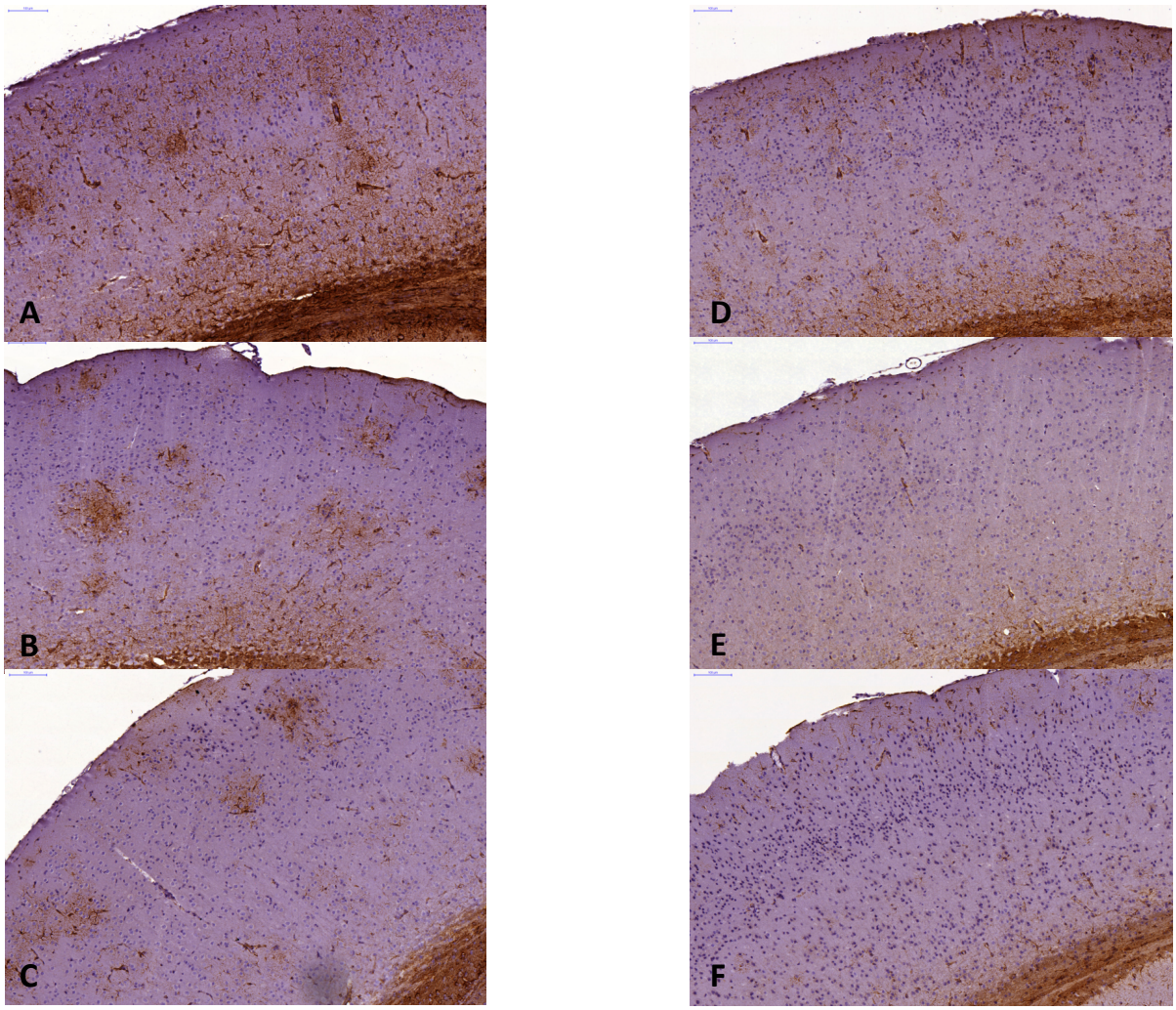


Figure 11B

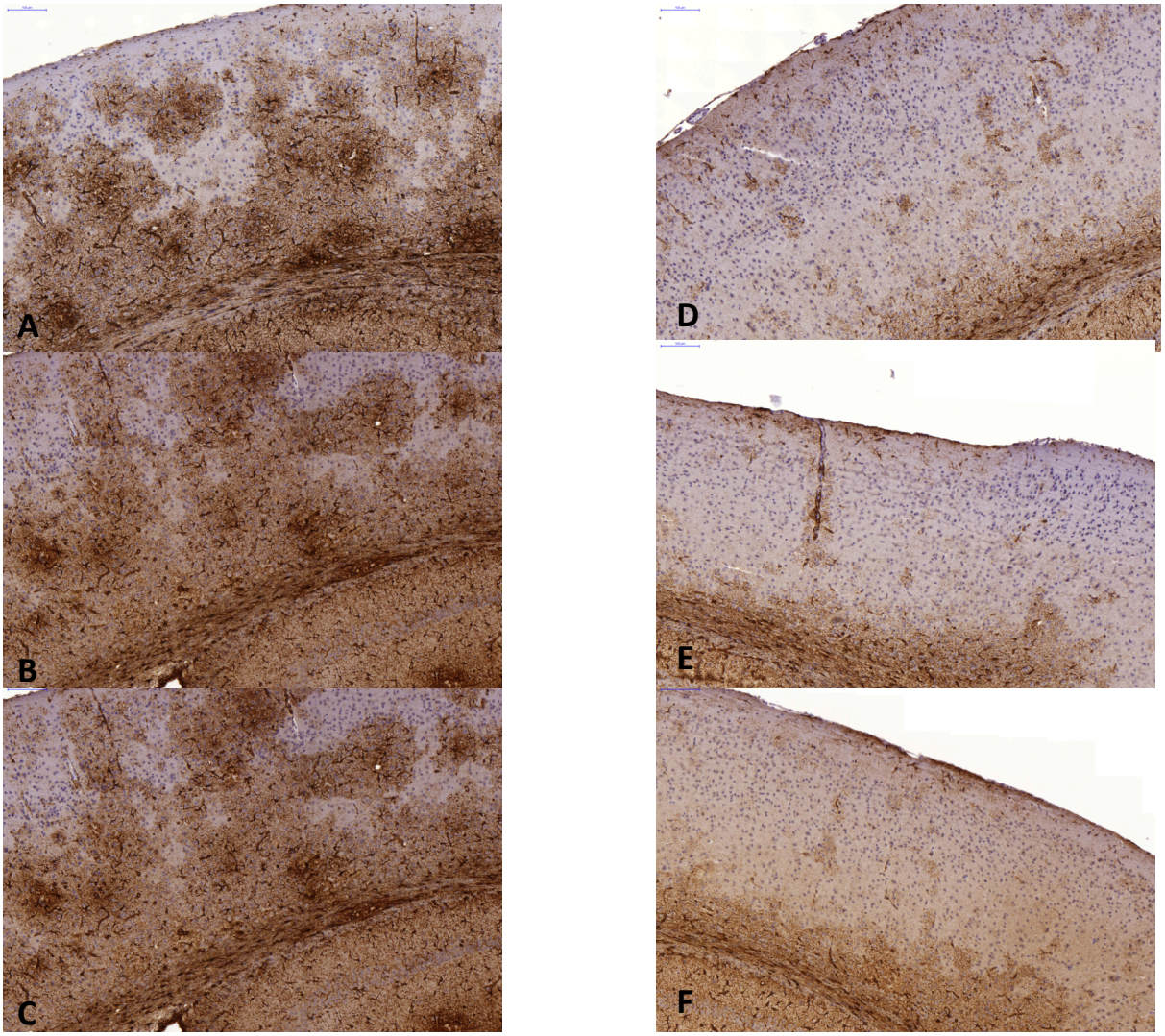


Figure 11C

Figure 11. Astrocyte distribution. Illustrative examples of astroglial cell distribution after anti-GFAP immunostaining of Tg (left) and WT (right) cortical brain sections of non-infected mice (A,D) and mice infected by *H. pylori* (B, E) or *H. felis* (C,F) at 4 (figure 11A), 6 (figure 11B) and 10 (figure 11C) months of age

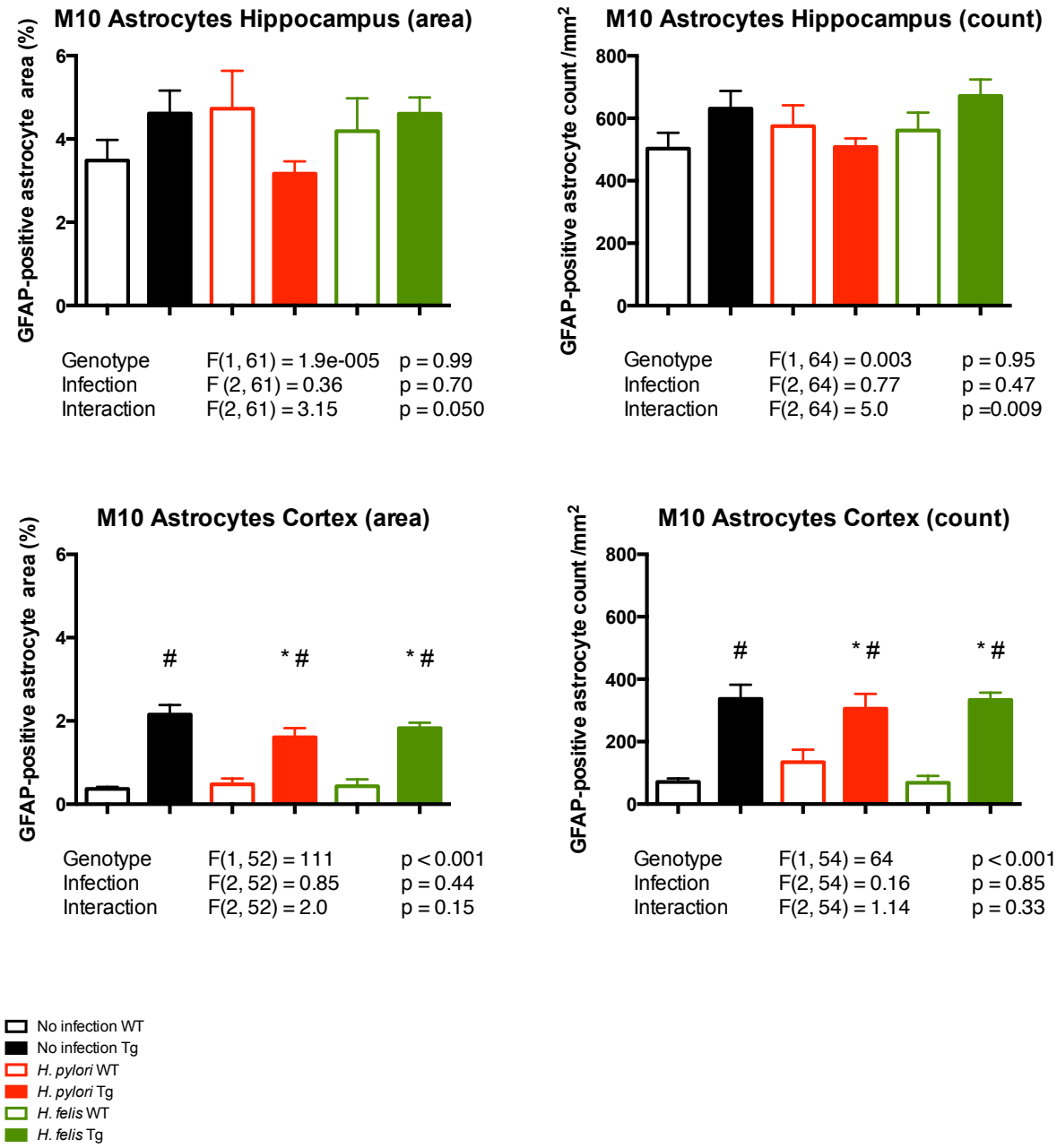
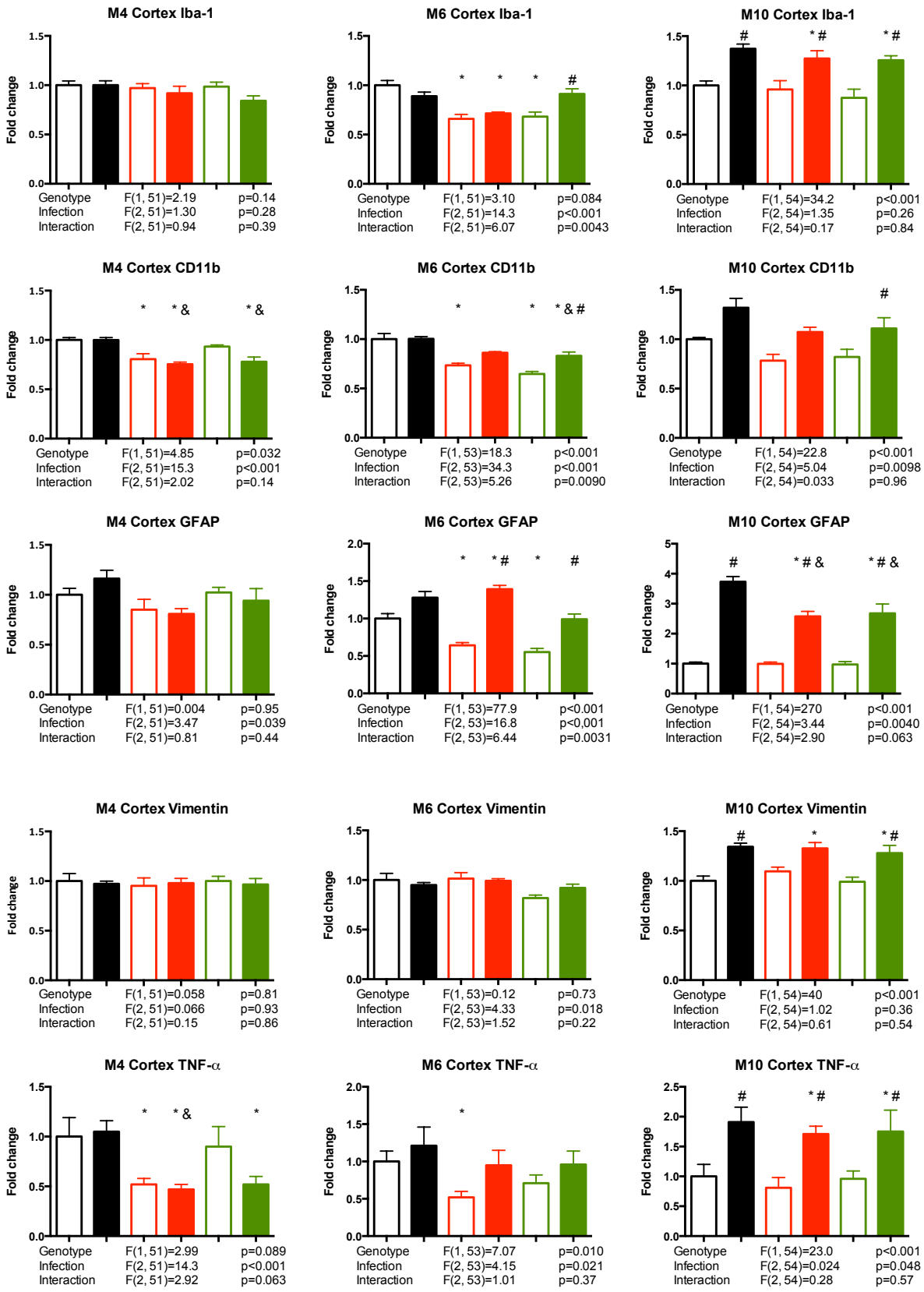
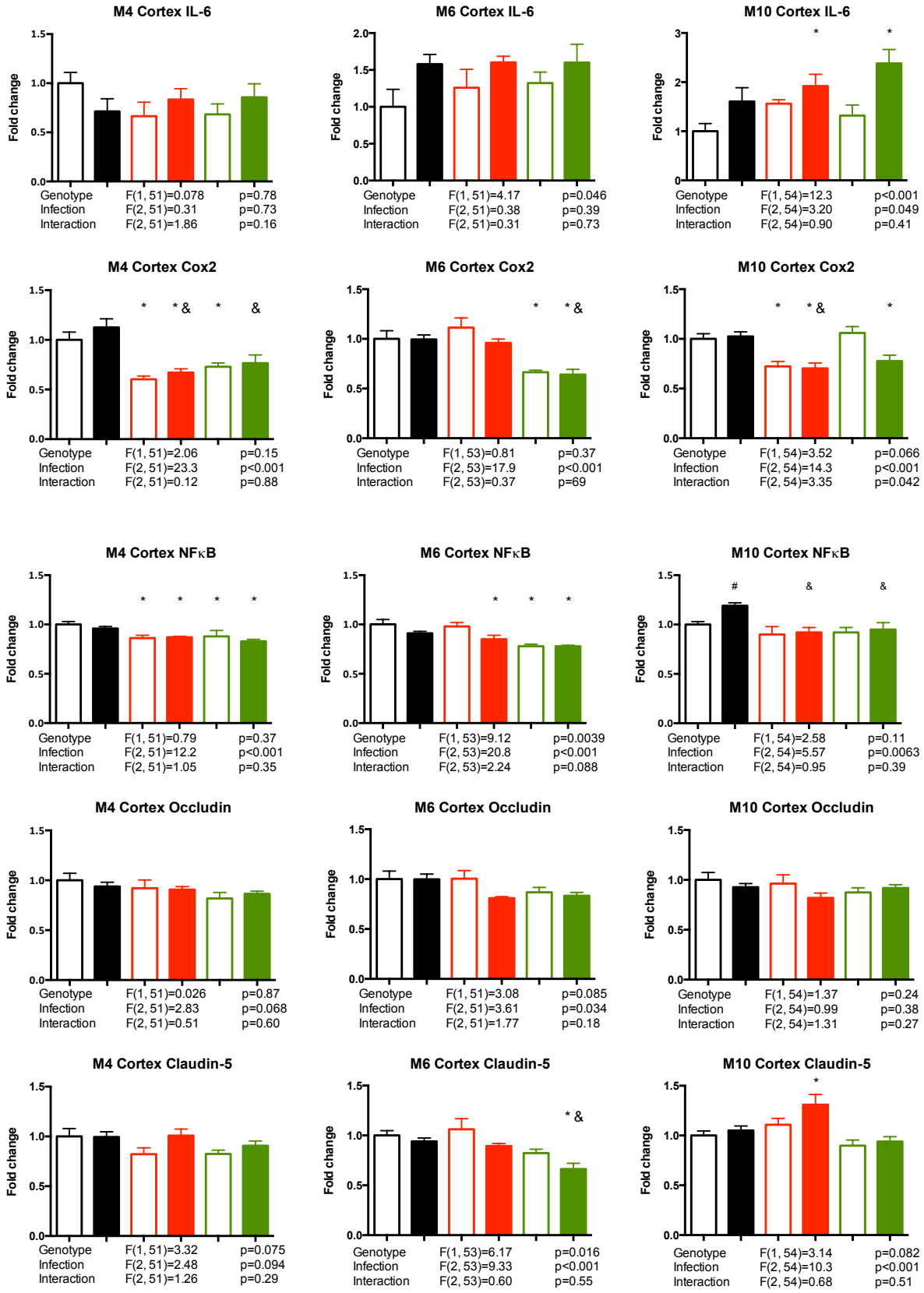


Figure 12. Astrocytes at 10 months of age. Hippocampal (up) and cortical (down) GFAP-positive astroglial cell count and area regarding genotype and infectious status. *p<0.05 versus non-infected WT mice. # p<0.05 Tg versus WT within each infection group. Error Bar: ± Standard Error


M4 Cortex Iba-1
Fold change
Genotype F(1, 51)=2.19 p=0.14
Infection F(2, 51)=1.30 p=0.28
Interaction F(2, 51)=0.94 p=0.39
M6 Cortex Iba-1
Genotype F(1, 51)=3.10 p=0.084
Infection F(2, 51)=14.3 p<0.001
Interaction F(2, 51)=6.07 p=0.0043
M10 Cortex Iba-1
Genotype F(1, 54)=34.2 p<0.001
Infection F(2, 54)=1.35 p=0.26
Interaction F(2, 54)=0.17 p=0.84
M4 Cortex CD11b
Genotype F(1, 51)=4.85 p=0.032
Infection F(2, 51)=15.3 p<0.001
Interaction F(2, 51)=2.02 p=0.14
M6 Cortex CD11b
Genotype F(1, 53)=18.3 p<0.001
Infection F(2, 53)=34.3 p<0.001
Interaction F(2, 53)=5.26 p=0.0090
M10 Cortex CD11b
Genotype F(1, 54)=22.8 p<0.001
Infection F(2, 54)=5.04 p=0.0098
Interaction F(2, 54)=0.033 p=0.96
M4 Cortex GFAP
Genotype F(1, 51)=0.004 p=0.95
Infection F(2, 51)=3.47 p=0.039
Interaction F(2, 51)=0.81 p=0.44
M6 Cortex GFAP
Genotype F(1, 53)=77.9 p<0.001
Infection F(2, 53)=16.8 p<0,001
Interaction F(2, 53)=6.44 p=0.0031
M10 Cortex GFAP
Genotype F(1, 54)=270 p<0.001
Infection F(2, 54)=3.44 p=0.0040
Interaction F(2, 54)=2.90 p=0.063
M4 Cortex Vimentin
Genotype F(1, 51)=0.058 p=0.81
Infection F(2, 51)=0.066 p=0.93
Interaction F(2, 51)=0.15 p=0.86
M6 Cortex Vimentin
Genotype F(1, 53)=0.12 p=0.73
Infection F(2, 53)=4.33 p=0.018
Interaction F(2, 53)=1.52 p=0.22
M10 Cortex Vimentin
Genotype F(1, 54)=40 p<0.001
Infection F(2, 54)=1.02 p=0.36
Interaction F(2, 54)=0.61 p=0.54
M4 Cortex TNF-α
Genotype F(1, 51)=2.99 p=0.089
Infection F(2, 51)=14.3 p<0.001
Interaction F(2, 51)=2.92 p=0.063
M6 Cortex TNF-α
Genotype F(1, 53)=7.07 p=0.010
Infection F(2, 53)=4.15 p=0.021
Interaction F(2, 53)=1.01 p=0.37
M10 Cortex TNF-α
Genotype F(1, 54)=23.0 p<0.001
Infection F(2, 54)=0.024 p=0.048
Interaction F(2, 54)=0.28 p=0.57


M4 Cortex IL-6
Fold change
Genotype F(1, 51)=0.078 p=0.78
Infection F(2, 51)=0.31 p=0.73
Interaction F(2, 51)=1.86 p=0.16
M6 Cortex IL-6
Fold change
Genotype F(1, 51)=4.17 p=0.046
Infection F(2, 51)=0.38 p=0.39
Interaction F(2, 51)=0.31 p=0.73
M10 Cortex IL-6
Fold change
Genotype F(1, 54)=12.3 p<0.001
Infection F(2, 54)=3.20 p=0.049
Interaction F(2, 54)=0.90 p=0.41
M4 Cortex Cox2
Fold change
Genotype F(1, 51)=2.06 p=0.15
Infection F(2, 51)=23.3 p<0.001
Interaction F(2, 51)=0.12 p=0.88
M6 Cortex Cox2
Fold change
Genotype F(1, 53)=0.81 p=0.37
Infection F(2, 53)=17.9 p<0.001
Interaction F(2, 53)=0.37 p=69
M10 Cortex Cox2
Fold change
Genotype F(1, 54)=3.52 p=0.066
Infection F(2, 54)=14.3 p<0.001
Interaction F(2, 54)=3.35 p=0.042
M4 Cortex NFκB
Fold change
Genotype F(1, 51)=0.79 p=0.37
Infection F(2, 51)=12.2 p<0.001
Interaction F(2, 51)=1.05 p=0.35
M6 Cortex NFκB
Fold change
Genotype F(1, 53)=9.12 p=0.0039
Infection F(2, 53)=20.8 p<0.001
Interaction F(2, 53)=2.24 p=0.088
M10 Cortex NFκB
Fold change
Genotype F(1, 54)=2.58 p=0.11
Infection F(2, 54)=5.57 p=0.0063
Interaction F(2, 54)=0.95 p=0.39
M4 Cortex Occludin
Fold change
Genotype F(1, 51)=0.026 p=0.87
Infection F(2, 51)=2.83 p=0.068
Interaction F(2, 51)=0.51 p=0.60
M6 Cortex Occludin
Fold change
Genotype F(1, 51)=3.08 p=0.085
Infection F(2, 51)=3.61 p=0.034
Interaction F(2, 51)=1.77 p=0.18
M10 Cortex Occludin
Fold change
Genotype F(1, 54)=1.37 p=0.24
Infection F(2, 54)=0.99 p=0.38
Interaction F(2, 54)=1.31 p=0.27
M4 Cortex Claudin-5
Fold change
Genotype F(1, 51)=3.32 p=0.075
Infection F(2, 51)=2.48 p=0.094
Interaction F(2, 51)=1.26 p=0.29
M6 Cortex Claudin-5
Fold change
Genotype F(1, 53)=6.17 p=0.016
Infection F(2, 53)=9.33 p<0.001
Interaction F(2, 53)=0.60 p=0.55
M10 Cortex Claudin-5
Fold change
Genotype F(1, 54)=3.14 p=0.082
Infection F(2, 54)=10.3 p<0.001
Interaction F(2, 54)=0.68 p=0.51

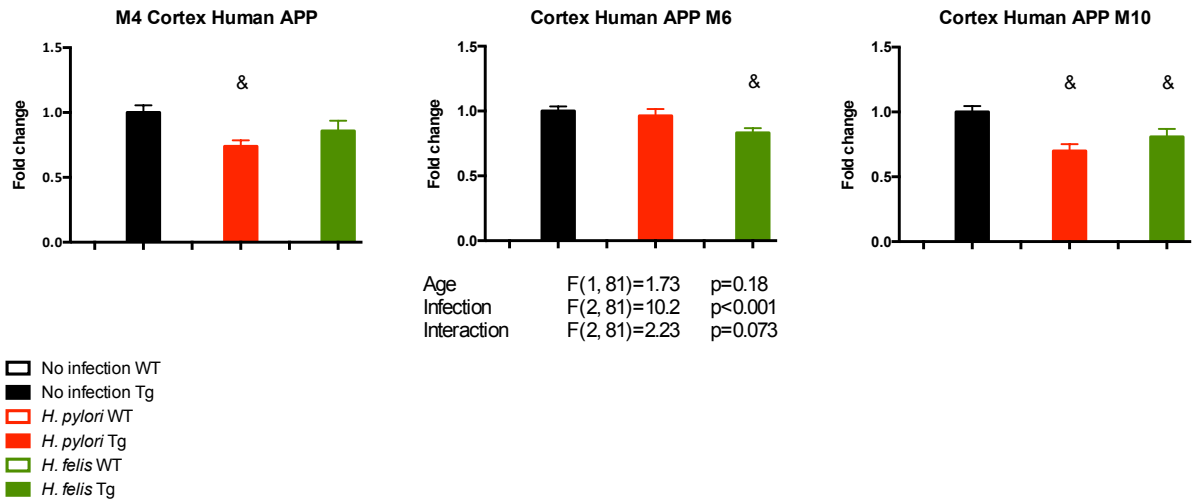
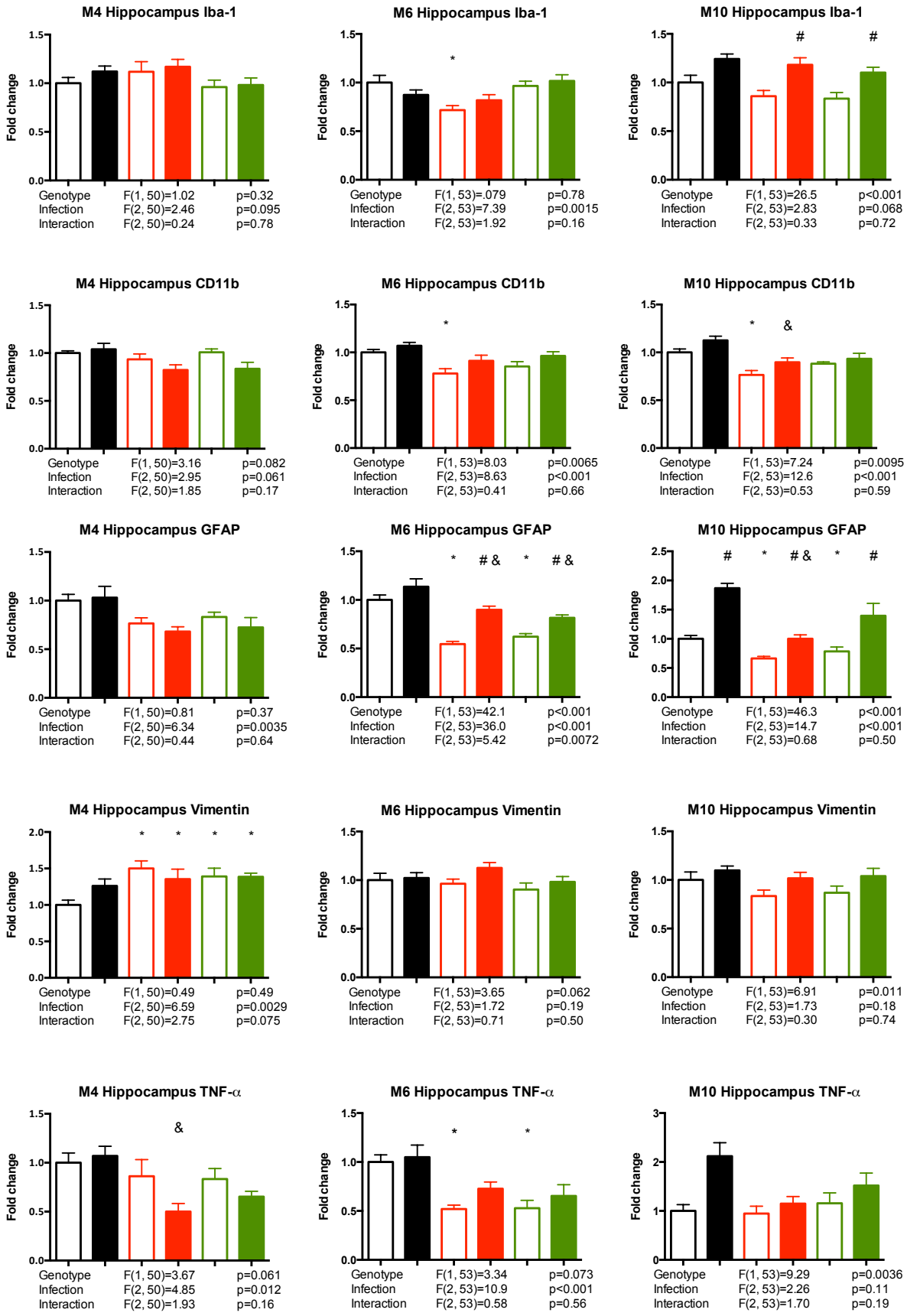
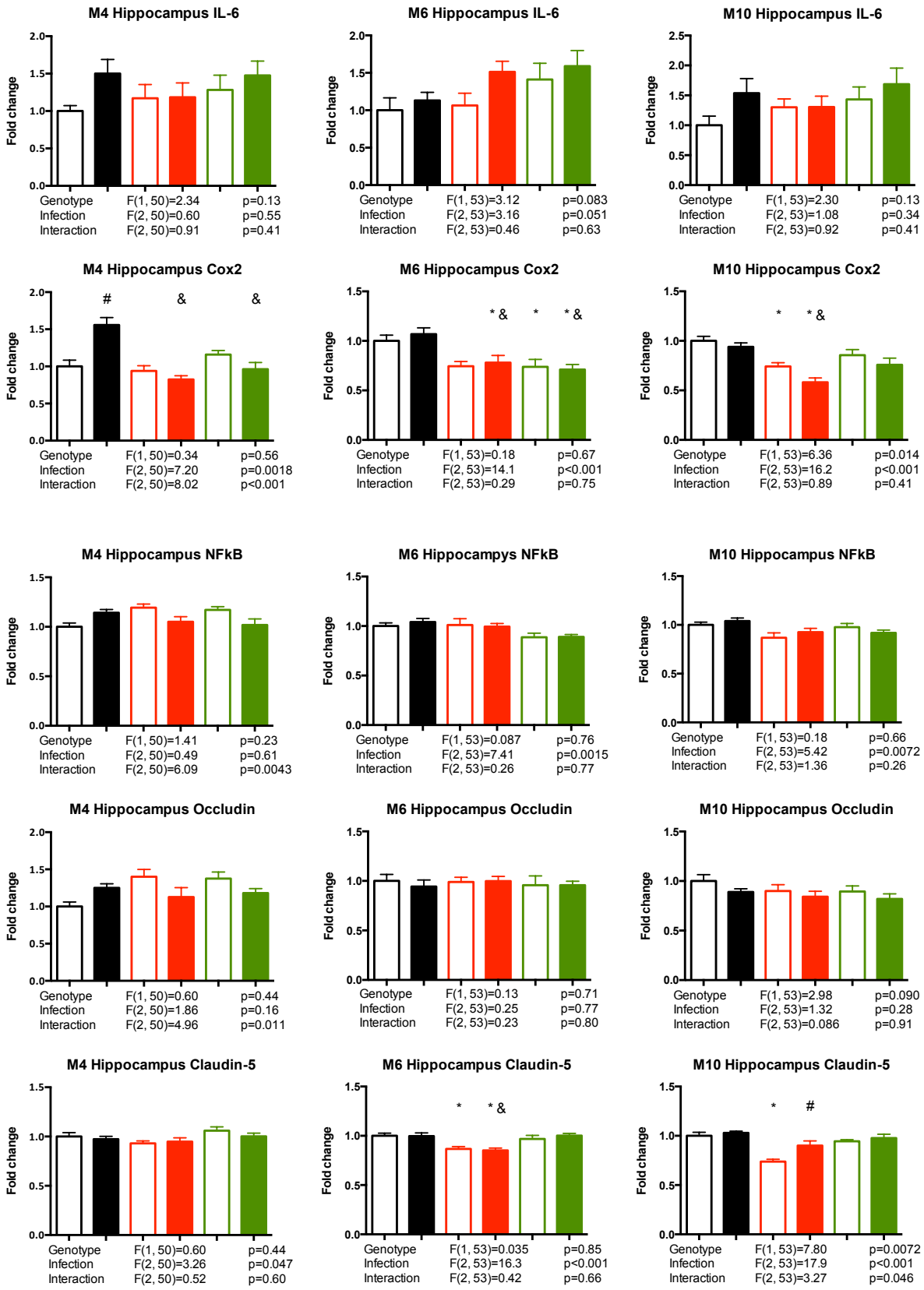


Figure 13. Quantitative real time PCR in cortex. * p<0.05 non infected WT mice versus the other groups. & p<0.05 *H. pylori* infected Tg and *H. felis* infected Tg versus non-infected Tg mice. # p<0.05 WT versus Tg within each infection group. Error Bar: ± 1 Standard Error


M4 Hippocampus Iba-1
Fold change
Genotype F(1, 50)=1.02 p=0.32
Infection F(2, 50)=2.46 p=0.095
Interaction F(2, 50)=0.24 p=0.78
M6 Hippocampus Iba-1
*
Genotype F(1, 53)=.079 p=0.78
Infection F(2, 53)=7.39 p=0.0015
Interaction F(2, 53)=1.92 p=0.16
M10 Hippocampus Iba-1
# #
Genotype F(1, 53)=26.5 p<0.001
Infection F(2, 53)=2.83 p=0.068
Interaction F(2, 53)=0.33 p=0.72
M4 Hippocampus CD11b
Genotype F(1, 50)=3.16 p=0.082
Infection F(2, 50)=2.95 p=0.061
Interaction F(2, 50)=1.85 p=0.17
M6 Hippocampus CD11b
*
Genotype F(1, 53)=8.03 p=0.0065
Infection F(2, 53)=8.63 p<0.001
Interaction F(2, 53)=0.41 p=0.66
M10 Hippocampus CD11b
* &
Genotype F(1, 53)=7.24 p=0.0095
Infection F(2, 53)=12.6 p<0.001
Interaction F(2, 53)=0.53 p=0.59
M4 Hippocampus GFAP
Genotype F(1, 50)=0.81 p=0.37
Infection F(2, 50)=6.34 p=0.0035
Interaction F(2, 50)=0.44 p=0.64
M6 Hippocampus GFAP
* # & * # &
Genotype F(1, 53)=42.1 p<0.001
Infection F(2, 53)=36.0 p<0.001
Interaction F(2, 53)=5.42 p=0.0072
M10 Hippocampus GFAP
* # & *
Genotype F(1, 53)=46.3 p<0.001
Infection F(2, 53)=14.7 p<0.001
Interaction F(2, 53)=0.68 p=0.50
M4 Hippocampus Vimentin
* * * *
Genotype F(1, 50)=0.49 p=0.49
Infection F(2, 50)=6.59 p=0.0029
Interaction F(2, 50)=2.75 p=0.075
M6 Hippocampus Vimentin
Genotype F(1, 53)=3.65 p=0.062
Infection F(2, 53)=1.72 p=0.19
Interaction F(2, 53)=0.71 p=0.50
M10 Hippocampus Vimentin
Genotype F(1, 53)=6.91 p=0.011
Infection F(2, 53)=1.73 p=0.18
Interaction F(2, 53)=0.30 p=0.74
M4 Hippocampus TNF-α
&
Genotype F(1, 50)=3.67 p=0.061
Infection F(2, 50)=4.85 p=0.012
Interaction F(2, 50)=1.93 p=0.16
M6 Hippocampus TNF-α
* *
Genotype F(1, 53)=3.34 p=0.073
Infection F(2, 53)=10.9 p<0.001
Interaction F(2, 53)=0.58 p=0.56
M10 Hippocampus TNF-α
Genotype F(1, 53)=9.29 p=0.0036
Infection F(2, 53)=2.26 p=0.11
Interaction F(2, 53)=1.70 p=0.19


M4 Hippocampus IL-6
Fold change
Genotype F(1, 50)=2.34 p=0.13
Infection F(2, 50)=0.60 p=0.55
Interaction F(2, 50)=0.91 p=0.41
M6 Hippocampus IL-6
Fold change
Genotype F(1, 53)=3.12 p=0.083
Infection F(2, 53)=3.16 p=0.051
Interaction F(2, 53)=0.46 p=0.63
M10 Hippocampus IL-6
Fold change
Genotype F(1, 53)=2.30 p=0.13
Infection F(2, 53)=1.08 p=0.34
Interaction F(2, 53)=0.92 p=0.41
M4 Hippocampus Cox2
& &
Fold change
Genotype F(1, 50)=0.34 p=0.56
Infection F(2, 50)=7.20 p=0.0018
Interaction F(2, 50)=8.02 p<0.001
M6 Hippocampus Cox2
* & * * &
Fold change
Genotype F(1, 53)=0.18 p=0.67
Infection F(2, 53)=14.1 p<0.001
Interaction F(2, 53)=0.29 p=0.75
M10 Hippocampus Cox2
* * &
Fold change
Genotype F(1, 53)=6.36 p=0.014
Infection F(2, 53)=16.2 p<0.001
Interaction F(2, 53)=0.89 p=0.41
M4 Hippocampus NFkB
Fold change
Genotype F(1, 50)=1.41 p=0.23
Infection F(2, 50)=0.49 p=0.61
Interaction F(2, 50)=6.09 p=0.0043
M6 Hippocampys NFkB
Fold change
Genotype F(1, 53)=0.087 p=0.76
Infection F(2, 53)=7.41 p=0.0015
Interaction F(2, 53)=0.26 p=0.77
M10 Hippocampus NFkB
Fold change
Genotype F(1, 53)=0.18 p=0.66
Infection F(2, 53)=5.42 p=0.0072
Interaction F(2, 53)=1.36 p=0.26
M4 Hippocampus Occludin
Fold change
Genotype F(1, 50)=0.60 p=0.44
Infection F(2, 50)=1.86 p=0.16
Interaction F(2, 50)=4.96 p=0.011
M6 Hippocampus Occludin
Fold change
Genotype F(1, 53)=0.13 p=0.71
Infection F(2, 53)=0.25 p=0.77
Interaction F(2, 53)=0.23 p=0.80
M10 Hippocampus Occludin
Fold change
Genotype F(1, 53)=2.98 p=0.090
Infection F(2, 53)=1.32 p=0.28
Interaction F(2, 53)=0.086 p=0.91
M4 Hippocampus Claudin-5
Fold change
Genotype F(1, 50)=0.60 p=0.44
Infection F(2, 50)=3.26 p=0.047
Interaction F(2, 50)=0.52 p=0.60
M6 Hippocampus Claudin-5
* * &
Fold change
Genotype F(1, 53)=0.035 p=0.85
Infection F(2, 53)=16.3 p<0.001
Interaction F(2, 53)=0.42 p=0.66
M10 Hippocampus Claudin-5
* #
Fold change
Genotype F(1, 53)=7.80 p=0.0072
Infection F(2, 53)=17.9 p<0.001
Interaction F(2, 53)=3.27 p=0.046

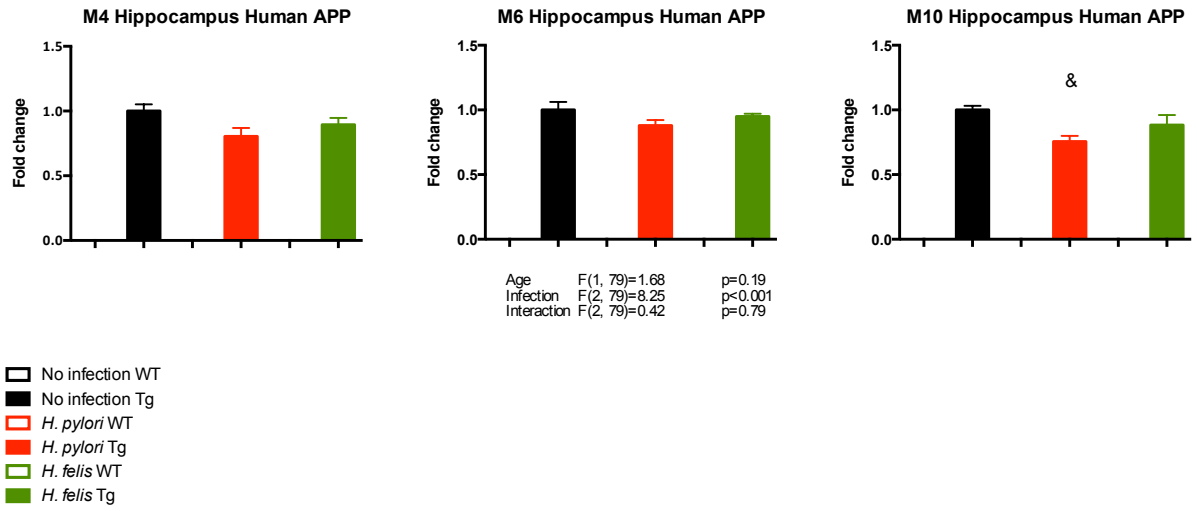


Figure 14. Quantitative real time PCR in hippocampus. * p<0.05 non infected WT mice versus the other groups. & p<0.05 *H. pylori* infected Tg and *H. felis* infected Tg versus non-infected Tg mice. # p<0.05 WT versus Tg within each infection group. Error Bar: ± 1 Standard Error

Table 1. Primers sequences used for quantitative real time PCR.

Nom	Gene	GenBank ID	Forward Sequence (5'-3')	Reverse Sequence (5'-3')	
amyloid beta precursor protein	APP	NM_001198823	ATGACTCAGGATATGAAGTTCAT	CCTTTGTTTGAACCCACATCTT	Humain
Tnf alpha	Tnf	NM_013693	GGCACTCCCCCAAAAGATG	GCCACAAGCAGGAATGAGAAG	Mouse
prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Ptgs2=cox2	NM_011198	AATCCTTGCTGTTCCAATCC	AGAATCCAGTCCGGGTACAG	Mouse
vimentin	Vim	NM_011701	GCCAACCTTTTCTTCCCTGAAC	TTTGAGTGGGTGTCAACCAGAG	Mouse
integrine alpha M (CD11b)	Itgam	NM_001082960	CTCATCACTGCTGGCCTATACAA	GCAGCTTCATTCATCATGTCCTT	Mouse
translation elongation factor 1	Eef1a1	NM_010106	TGAACCATCCAGGCCAAATC	GCATGCTATGTGGGCTGTGT	Mouse
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	NM_008084	TCAAGAAGGTGGTGAAGCAG	TGGGAGTTGCTGTTGAAGTC	Mouse
interleukin 6	Il6	NM_031168	TACTCGGCAAACCTAGTGCGT	ATTTTCTGACCACAGTGAGGAATG	Mouse
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	Nfkb1	NM_008689	CAAAGCCCTGACAGTCCATTG	GATTCTCCAGCACCTTTGGATT	Mouse
tubulin, alpha 4A	Tuba4a	NM_009447	CTGGACCACAAGTTTGACTTGATG	TCCATTCCCTCACCCACATAC	Mouse
glial fibrillary acidic protein	Gfap	NM_010277	AGGTCCGCTTCCTGGAACA	GGGCTCCTTGGCTCGAA	Mouse
succinate dehydrogenase complex subunit	Sdha	NM_023281	TACAAAGTGCGGGTCGATGA	TGTTCCCCAAACGGCTTCT	Mouse
occludin	Ocln	NM_008756	GGACCGGTATCATCACTTTTCC	AGACTTAGCCAAAACTGCCTTAGC	Mouse
allograft inflammatory factor 1 (iba-1)	Aif1	NM_019467	CAATTCCTCGATGATCCCAAATA	TTCACCTTGAAGGCTTCAAGTTT	Mouse
claudin 5	Cldn5	NM_013805	AACTGCCGCGAACAGTTCC	GCAGGTGCCACTGGACATTAA	Mouse