



Etude du développement postnatal des interneurones de la couche II interne dans le sous-noyau caudal du trijumeau chez le rat

Noémie Mermet-Joret

► To cite this version:

Noémie Mermet-Joret. Etude du développement postnatal des interneurones de la couche II interne dans le sous-noyau caudal du trijumeau chez le rat. Sciences agricoles. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2016. Français. NNT : 2016CLF1DD02 . tel-03395053

HAL Id: tel-03395053

<https://theses.hal.science/tel-03395053>

Submitted on 22 Oct 2021

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

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

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'Auvergne

Spécialité : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement le 21 octobre 2016 par

Noémie Mermet-Joret

**Etude du développement postnatal
des interneurones de la couche II interne
dans le sous-noyau caudal du trijumeau chez le rat**

MEMBRES DU JURY

Professeur Vincent Sapin	Université d'Auvergne	Président
Docteur Matilde Cordero-Erausquin	Université de Strasbourg	Rapporteur
Docteur Aziz Moqrich	Université d'Aix-Marseille	Rapporteur
Docteur Jérôme Busserolles	Université d'Auvergne	Examineur
Docteur Myriam Antri	Université d'Auvergne	Directeur

Cette thèse a été réalisée à l'université d'Auvergne, dans le laboratoire Neuro-Dol
(Douleur et biophysique neurosensorielle UMR1107 Inserm/UdA)
au sein de l'équipe « Douleur Trigéminal et Migraine ».

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse : le professeur Vincent Sapin pour avoir accepté de présider ce jury, les docteurs Matilde Cordero-Erausquin et Aziz Moqrich pour l'honneur qu'ils me font d'être les rapporteurs de mon travail de thèse, et le docteur Jérôme Busserolles qui a accepté de l'examiner.

Je souhaite remercier du fond du cœur ma directrice de thèse, le docteur Myriam Antri, de m'avoir fait confiance dès le début et de m'avoir prise sous son aile durant ces trois années de thèse. La liberté que tu m'as accordée dans le cadre de mon travail, mais aussi dans mes activités extra-thèses, ton dynamisme et ton enthousiasme solides à toute épreuve, m'ont encouragée tout au long de la thèse. Je suis également reconnaissante de ta qualité humaine et de la gestion subtile que tu as eu des moments critiques, des périodes de doutes et d'incertitudes. En particulier, sans ton soutien pendant l'écriture de ce manuscrit, la fin de thèse aurait probablement été beaucoup plus compliquée. Ta gestion de la recherche et d'une vie de famille bien remplie sont un modèle pour moi.

Je tiens ensuite à remercier le professeur Radhouane Dallel de m'avoir permis d'intégrer son équipe de recherche et de s'être impliqué dans mon travail. Merci de m'avoir indiqué les bonnes directions à suivre, et de m'avoir initiée à la nécessité de réfléchir profondément aux questions scientifiques et d'avoir un œil critique et vif. Je suis admirative de la passion indescriptible que vous avez pour la science.

Mes remerciements vont également à tous les membres de l'équipe Douleur Trigéminal et Migraine. Merci au professeur Alain Artola pour nos discussions scientifiques, souvent très courtes mais toujours pertinentes. Vous avez été pour moi un bon enseignant, m'encourageant à toujours creuser un peu plus loin la question posée. Je vous remercie aussi d'avoir pris le temps de relire chaque article. A Philippe, je t'en pris, garde la flamme de la vulgarisation scientifique qui t'habite ! Tu es une perle malheureusement bien rare, et pourtant tellement importante pour le monde de la science. Merci de m'avoir encouragée à m'investir dans la Semaine du Cerveau et Exposciences. A Jean-Louis, le bricolo du labo, tu t'es toujours rendu disponible pour réparer un matériel cassé ou m'ouvrir ma bouteille de gaz. Ton petit « salut la star ! » matinal me manquera. A Amélie et Karine, les deux terreurs de la blouse blanche ! Nous serions probablement tous morts intoxiqués au Xylène sans votre bienveillance. Merci à toutes les deux pour l'aide que vous avez pu m'offrir au cours de ma thèse et pour vos conseils techniques avisés. A Christelle, je suis admirative de ton courage et de la force que tu as en toi. Je te souhaite de garder ce magnifique sourire qui irradie ton visage. Merci du fond du cœur pour ta gentillesse. A Lénaïc, malgré ma timidité à ton égard, tu as été d'un grand soutien dans des moments chaotiques, je pense notamment à l'aide précieuse que tu m'as apportée pour l'impression de mon poster de la FENS ! Merci également de m'avoir permis de donner quelques cours de neuro à tes étudiants.

Anne-Marie, tu mérites un paragraphe à toi seule ! Je ne trouve pas les mots pour te dire à quel point tu es formidable ! Mille mercis pour ta gestion du laboratoire, ton efficacité exemplaire, ta bonne humeur et ton humour incroyable. Avec toi, j'ai ri et j'ai pleuré. Tu es le pilier sur lequel chacun d'entre nous peut se reposer et s'apaiser. Merci de tout cœur pour tes encouragements et ton investissement dans nos vies, qu'elles soient professionnelles ou personnelles.

A la Mojito Team : Céline, Sarah, Marine, Julie, Emilie, Gisella, Coco et Hien Luong, merci pour tous nos bons moments passés ensemble au labo et en dehors. Vous êtes des amies fantastiques ! Je remercie plus particulièrement Cristina. Merci de m'avoir épaulée, et de m'avoir indiqué la voie pour devenir « un bon chercheur ». Tu as été d'une aide précieuse au cours de ce travail de thèse. Je te souhaite le meilleur possible pour cette nouvelle vie qui t'attend. Je remercie également mes deux stagiaires Laura et Marion, de s'être investies à fond dans notre recherche. Enfin je tiens à remercier les mâles de l'équipe : Paul, Xavier, Christophe, Laurent et Jérémy, d'apporter un peu de testostérone dans ce labo de fille !

Je tiens également à remercier chaleureusement les membres de l'équipe pédagogique du Pr Vago et du BTS avec qui j'ai pu faire mes premiers pas dans l'enseignement. J'en profite pour remercier le directeur de l'école doctorale, Mr Jean-Marc Lobaccaro, pour sa disponibilité et ses engagements auprès de chaque étudiant. Je remercie également Mmes Catherine Barrière et Elisabeth Billard de m'avoir suivie lors de mes comités de thèse.

Selon moi, une thèse réussie, c'est lorsque l'on garde un peu de place pour faire autre chose que la thèse. Ainsi, je tiens à remercier mes amis et membres de notre association Doct'Auvergne : Barbara, Alice, Arthur, Claire, Alexis, Raksmei, Clément et j'en oublie forcément. Merci à vous de m'avoir offert une culture dans tous les domaines relatifs à vos thèses respectives que ce soit en droit pénale, en maths appliqués ou en économie. Nos échanges passionnés sur notre monde m'ont encouragée à renforcer mes principes de vie. Je garderai de très bons souvenirs de nos émissions sur les ondes de RadioCampus, de l'organisation du Puy de la Recherche ou encore du concours « Ma thèse en 180 secondes » que nous avons préparé ensemble.

Enfin, je tiens à remercier mes proches de m'avoir supportée dans cette aventure. Je remercie mes amis d'enfance qui m'ont vue grandir et devenir petit-à-petit le docteur que je suis devenue. En particulier je vous remercie, Léa et Cassandre, pour votre soutien incommensurable ces dernières années. Vous êtes des amies exemplaires. Vive le trio des « super-nanas » !

Je remercie ma maman, Evelyne, de m'avoir soutenue pendant toutes ces années. Merci pour les valeurs altruistes que tu m'as inculquées. Jusqu'au bout, tu étais prête à faire 400 km pour me soutenir à bout de bras. Tu es une femme forte et incroyablement courageuse. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est en partie grâce à toi. Je remercie également mon père Dominique et Annick, qui m'ont appris à n'avoir peur de rien, à ne jamais baisser les bras et à toujours repousser les limites pour réussir. Ces valeurs m'ont été précieuses pour garder la tête haute pendant ces longues années d'études. Un grand merci également à mes beaux-parents, Anna et Didier, et Jean-Yves et Christine, et à toute la famille Joret-Di Paolo and Co' pour leurs encouragements et leur réconfort. J'ai aussi une pensée pour mes deux grands frères Thomas et Timothé. Merci de m'avoir protégée et aidée à avancer. En cette fin de thèse, je prends conscience de toutes ces années que nous n'avons pas passées ensemble. Je promets d'y remédier. Je remercie également ma grand-mère Colette, de m'avoir encouragée à m'accrocher jusqu'au bout. Mes pensées tristes et affectueuses sont dédiées à mes aïeux, en particulier à mon grand-père Michel, parti bien trop tôt. De là où tu es, j'espère que tu es fière de moi.

Cette thèse, je la dédie à toi, mon amour. Tu partages ma vie depuis maintenant dix ans et c'est avec toi que je suis devenue la femme que je suis aujourd'hui. Tu m'as épaulée dès le début, m'as encouragée et soutenue dans mes études. Tu as été à mes côtés dans les moments les plus joyeux, comme les plus pénibles. Tu as toujours été prêt à m'accompagner, même jusqu'au bout du monde. Sans toi, je n'en serai pas là. Merci pour ce que tu fais, et pour ce que tu es. Cette thèse est tout autant la tienne.

à Yann

« -Si la vue d'un bureau encombré évoque un esprit encombré,
alors que penser d'un bureau vide ? »

Albert Einstein

Publications et communications apparentées à la thèse

Articles

Mermet-Joret, N., Chatila, N., Pereira B., Montconduit, L., Dallel, R., Antri, M., (2016) Lamina specific postnatal development of PKC γ interneurons within the rat medullary dorsal horn. *Developmental Neurobiology*.

Mermet-Joret, N., Alba-Delgado, C., Dallel, R., Antri, M., Development of morphological and electrophysiological features of inner lamina II interneurons within the rat medullary dorsal horn.

Posters

Alba-Delgado,C., **Mermet-Joret, N.**, Dallel, R., Antri, M. (2016). Acute and persistent inflammatory pain is associated with changes in intrinsic membrane properties and morphological features of PKC γ interneurons in adult rat medullary dorsal horn. IASP congress (Yokohama, Japan)

Mermet-Joret, N., Alba-Delgado, C., Dallel, R., Antri, M. (2016). Development of PKC γ interneurons within the medullary dorsal horn of rats: anatomical and electrophysiological studies. 10th FENS Forum (Copenhagen, Denmark)

Alba-Delgado,C., **Mermet-Joret, N.**, Dallel, R., Antri, M. (2016). Facial inflammation induces changes in electrophysiological and morphological properties of substantia gelatinosa interneurons in the medullary dorsal horn of adult rat. 10th FENS Forum (Copenhagen, Denmark)

Alba-Delgado,C., **Mermet, N.**, Dallel, R., Antri, M. (2015). Serotonergic modulation of PKC γ interneurons in the medullary dorsal horn. 12th Colloque of French Society (Montpellier, France).

Communications orales

Boyer M. et **Mermet-Joret N.**, Juillard L., Antri, M., Dallel, R. (2016) Influence de la maturation des afférences nociceptives dans le développement des interneurones PKC γ trigéminaux. Réunion du collège des dentistes (Clermont-Ferrand, France)

Mermet-Joret, N., Alba-Delgado, C., Dallel, R., Antri, M. (2016). Development of PKC γ interneurons within the medullary dorsal horn of rats: anatomical and electrophysiological studies. Journée de l'Ecole Doctorale (Clermont-Ferrand, France)

Mermet, N., Alba-Delgado, C., Dallel, R., Antri, M. (2015). Development of PKC γ interneurons within the medullary dorsal horn of rats: anatomical and electrophysiological studies. 5th Aspects of Neurosciences (Varsovie, Pologne)

Mermet, N., (2015) Le cerveau de l'enfant. La Semaine du Cerveau, 16e édition (Clermont-Ferrand, France)

Table des matières

Liste des figures	11
Liste des abréviations	13
Préambule : Le nouveau-né : un être sensible	15
Chapitre 1 : Introduction	18
I. Introduction à la sensibilité douloureuse	19
1.1 Pluralité de la douleur	19
1.1.1 Classification des douleurs selon la cause	19
1.1.2 Classification des douleurs selon la durée	20
1.1.3 Les douleurs trigéminales	21
1.2. Le paradoxe de la sensibilité douloureuse chez le jeune	21
II. Embryogenèse et maturation de la moelle épinière et du complexe sensitif du trijumeau	23
2.1. Les grandes lignes de l'embryogenèse du système nerveux central	23
2.1.1 Du disque embryonnaire à la neurulation	23
2.1.2 Le développement vésiculaire du système nerveux central	26
2.1.3 La moelle épinière et le complexe sensitif du trijumeau	28
III. Développement des connexions sensorielles centrales et des voies descendantes	32
3.1. Les protoneurones : premiers acteurs de la transmission sensorielle	32
3.1.1 Différentes catégories de protoneurones	32
3.1.2 La différenciation des protoneurones au cours du développement	33
3.2 Le développement des voies sensorielles centrales	34
3.2.1 Les fibres A β	36
3.2.2 Les fibres A δ	37
3.2.3 Les fibres C	38

3.3.	Le développement des contrôles descendants de la douleur : focus sur la sérotonine	41
3.3.1	La sérotonine	42
3.3.2	Le rôle de la sérotonine et des récepteurs 5-HT _{2A} dans la douleur	44
3.3.3	La maturation des voies descendantes sérotoninergiques et des récepteurs 5-HT _{2A}	45
IV.	Le développement phénotypique, morphologique et physiologique des neurones des couches superficielles de la corne dorsale	46
4.1.	Le développement phénotypique des interneurons de la corne dorsale	46
4.1.1	Une origine génétique	46
4.1.2	Les interneurons inhibiteurs	48
4.1.3	Les interneurons excitateurs : cas des interneurons PKC γ	52
4.2.	Le développement morphologique des neurones des couches superficielles	58
4.2.1	La morphologie somatique et neuritique	58
4.2.2	Le développement morphologique somatique et neuritique des neurones	61
4.3.	Le développement des propriétés électrophysiologiques et des courants ioniques	61
4.3.1	Propriétés membranaires et profils de décharge	61
4.3.2	Les courants ioniques	63
Chapitre 2 : Le développement postnatal des interneurons PKCγ au sein du Sp5C chez le rat		67
I.	Contexte de l'étude	68
II.	Matériels et méthodes	70
2.1	Analyse quantitative du développement des interneurons PKC γ et des neurones totaux	70
2.1.1	Préparations des tranches	70
2.1.2	Immunohistochimie	70
2.1.3	Poste d'imagerie	71

2.1.4.	Quantification	71
2.2	Etude de la prolifération cellulaire	72
2.2.1	Traitement pharmacologique : le BrdU	72
2.2.2	Immunohistochimie	73
2.2.3	Postes d'imagerie et analyse des spectres	73
2.3	Etude de l'implication des afférences sensorielles nociceptives dans le développement des interneurons PKC γ	74
2.3.1	Traitement pharmacologique : la capsaïcine	74
2.3.2	Test comportemental: le <i>eye-wiping test</i>	75
2.3.3	Immunohistochimie	75
III.	Article n°1	78

Chapitre 3 : Etude du développement postnatal des propriétés électrophysiologiques et morphologiques des interneurons de la couche Iii du Sp5C chez le rat 97

I.	Contexte de l'étude	98
II.	Matériels et méthodes	99
2.1	Enregistrements électrophysiologiques	99
2.1.1	Chambre d'enregistrements	99
2.1.2	Micropipettes et solution intracellulaire	100
2.1.3	Patch-Clamp : principes de la technique	101
2.1.4	Déroulement des enregistrements	102
2.1.5	Acquisition des données	102
2.1.6	Protocoles	103
2.2.	Procédures histologiques et microscopie confocale	108
2.3	Reconstruction et analyses morphologiques	108
2.4	Classification morphométrique des neurones	110
III.	Article n°2	112

Discussion générale	148
Annexes n°1	157
Annexe n°2	166
Références bibliographiques	170

Liste des figures

- Figure 1 :** Le processus de neurulation (P24)
- Figure 2 :** Deux catégories de signaux inductibles contrôlent la neurulation et la différenciation des cellules (P25)
- Figure 3 :** Le développement vésiculaire du système nerveux central au cours de l'embryogenèse (P26)
- Figure 4 :** La moelle épinière et le complexe sensitif du trijumeau (P29)
- Figure 5 :** Représentation schématique du développement des différents sous-types de protoneurones en périodes embryonnaire et post-natale (P33)
- Figure 6 :** Anatomie et organisation fonctionnelle de la sensibilité tactile et nociceptive (P35)
- Figure 7 :** Les projections ordonnancées des afférences primaires au sein de la corne dorsale spinale chez l'adulte (P37)
- Figure 8 :** Le développement des afférences primaires au sein de la corne dorsale spinale chez l'embryon (P40)
- Figure 9 :** Les contrôles descendants impliquant la substance grise périaqueducale (P41)
- Figure 10 :** Localisation des noyaux sérotoninergiques dans le système nerveux central (P42)
- Figure 11 :** Voie de signalisation impliquant les récepteurs 5-HT_{2A} (P43)
- Figure 12 :** L'origine génétique des neurones de la corne dorsale spinale (P47)
- Figure 13 :** Immunomarquage de la PKC γ visible en LIII dans le Sp5C de rat adulte (P54)
- Figure 14 :** La voie poly-synaptique sous-jacente de l'allodynie mécanique impliquant les interneurons PKC γ (P57)
- Figure 15 :** Microphotographies illustrant les cinq catégories de neurones de la lamina II (P60)
- Figure 16 :** Les cinq profils de décharge observés dans les neurones de la corne dorsale spinale suite à l'application de courant positif d'intensité croissante (P62)
- Figure 17 :** Protocole de quantification des interneurons (P71)
- Figure 18 :** Stratégie expérimentale de l'injection du BrdU (P72)
- Figure 19 :** Stratégie expérimentale de la délétion des fibres nociceptives par la capsaïcine (P76)
- Figure 20 :** Photographies d'une coupe transversale de Sp5C en fin d'expérimentation (P100)
- Figure 21 :** Les configurations de base du patch-clamp (P101)

- Figure 22 :** Représentation schématique du dispositif d'enregistrement en patch-clamp (P103)
- Figure 23 :** Protocole de mesure de la résistance d'entrée (R_{in}) (P104)
- Figure 24 :** Protocole permettant l'étude des propriétés membranaires actives (P105)
- Figure 25 :** Protocoles permettant de déterminer la présence de courants I_h et I_A (P107)
- Figure 26 :** Analyse morphométrique des neurones (P109)
- Figure 27 :** Principe de la mesure de la dimension fractale (P110)
- Figure 28 :** Classification des différentes morphologies de neurones (P111)

Liste des abréviations

3D : 3-dimensions

4-AP : 4-aminopyridine

5-HT : 5-hydroxytryptamine ou sérotonine

5-HT2A : récepteur 5-hydroxytryptamine de type 2A

ACSF : artificial cerebrospinal fluid

sACSF : saccharose-artificial cerebrospinal fluid

ADN : acide désoxyribonucléique

AMPA : a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

ARNm : ARN messenger

ATP : adénosine tri-phosphate

BDNF : brain-derived neurotrophic factor

BMPs : bone morphogenic protein

BRdU : 5-bromo-2-desoxyuridine

BSA : bovin serum albumin

CDS : corne dorsale spinale

CFA : complete freud's adjuvent

CGRP : calcitonin gene related peptide

Cy2 et Cy3 : cyanines, anticorps secondaires

DAG : diacylglycerol

DPX : résine à base de distyrene, d'un plastifiant et de xylène pour le montage des coupes

DRG : ganglion de la racine dorsale

DS : extension dorsale par rapport au soma

DV : dorsoventral

GABA : acide γ -aminobutyrique

GDNF : gliale cell derived neurotrophic factor

GTP : guanosine triphosphate

GlyT1 et GlyT2 : transporteurs de la glycine de type 1 et 2

GlyR : récepteurs glycinergiques

HCl : acide chlorhydrique

HCN1 : hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated type 1 channel

IASP : international association for the study of pain

IB4 : isolectine B4

IP3 : inositol triphosphate

MDH : medullary dorsal horn = Sp5C

ML : médiolatéral

NeuN : protéine nucléaire spécifique des neurones

NF-200 : neurofilament phosphorylé à 200 KDa

NGF : facteur de croissance neural

NGS : normal goat serum

NMDA : N-methyl-D-aspartate

nNOS : nitric oxide synthase neuronal

NPY : neuropeptide Y

NT : neurotrophine

P2X : récepteur purinergique à l'ATP

PAG : substance grise périaqueducule

Pax2 : paired box gene 2

PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-diphosphate

PIR : rebond post-inhibiteur

PKC γ : isoforme γ de la protéine kinase C

PLC : phospholipase C

RC : Rostrocaudal

RET : récepteur Ret tyrosin-kinase

SNC : système nerveux central

Sp5C : sous-noyau caudal

SP : substance P

TBS : tris-buffered saline

Tlx3 : T-cell leukemia homeobox 3

TrkA, TrkB, TrkC : récepteurs tyrosine kinase de type A, B et C

TRPV : transient receptor potential vanilloïde

VGLUT1 : transporteur vésiculaire du glutamate de type 1

VS : Extension ventrale par rapport au soma

Préambule

Le nouveau-né : un être sensible

Les mammifères nouveau-nés sont continuellement exposés à des stimulations tactiles. Les contacts physiques, qu'ils soient offerts au moment de l'allaitement ou lorsque les individus se blottissent les uns contre les autres, sont indispensables au développement du système nerveux central (SNC). Par exemple, un contact direct de « peau-à-peau » entre un nouveau-né prématuré et la mère ou le père pendant une à plusieurs heures quotidiennes est une technique couramment utilisée aujourd'hui dans les services de néonatalogie pour favoriser, entre autre, le bon développement de l'enfant (Moore et al., 2012). Par ailleurs, des études de privation maternelle réalisées chez le rongeur ont montré que l'absence de contact entre la mère et sa progéniture pendant quelques heures chaque jour entraîne chez cette dernière le développement de troubles cognitifs, en particulier de l'anxiété et des troubles de la mémoire et de l'apprentissage (van Oers et al., 1998 ; pour revue Tractenberg et al., 2016). Au cours de ces trente dernières années, des études ont montré que le développement du SNC est influencé par des stimuli tactiles en provenance de la périphérie du corps (Levine, 1994; Liu et al., 2000; van Oers et al., 1998). Ceci serait probablement dû à la sensibilité accrue des nouveau-nés. En effet, les réflexes cutanés induits par une stimulation tactile chez le nouveau-né sont exagérés et diffus, contrastant ainsi avec la réponse plus spécifique observée chez l'adulte (Andrews and Fitzgerald, 1994; Fitzgerald and Jennings, 1999; Marsh et al., 1999a).

Avant les années 80, on pensait que les nouveau-nés ne ressentait pas la douleur du fait de l'immaturité de leur système nerveux. C'est ainsi que certaines opérations chirurgicales nécessitant l'ouverture du thorax étaient réalisées chez des nouveau-nés prématurés sans anesthésie en dehors de l'administration de curare, un myorelaxant utilisé pour simplifier le travail du chirurgien. Heureusement, grâce aux travaux de quelques figures majeures de la reconnaissance de la douleur de l'enfant, on sait aujourd'hui que la douleur est déjà présente chez l'enfant avant même sa venue au monde. De plus, non seulement un nouveau-né ressent la douleur, mais il la ressent de façon beaucoup plus violente que chez l'adulte. En effet, une stimulation nociceptive provoque un réflexe de protection particulièrement important chez le nouveau-né par rapport à l'adulte (pour revue Fitzgerald, 2005).

Ainsi, il existe chez le nouveau-né une période au cours de laquelle les stimulations cutanées, qu'elles soient de natures tactiles ou nociceptives, induisent des réponses comportementales différentes de celles qui sont observées chez l'adulte. Pour bien comprendre

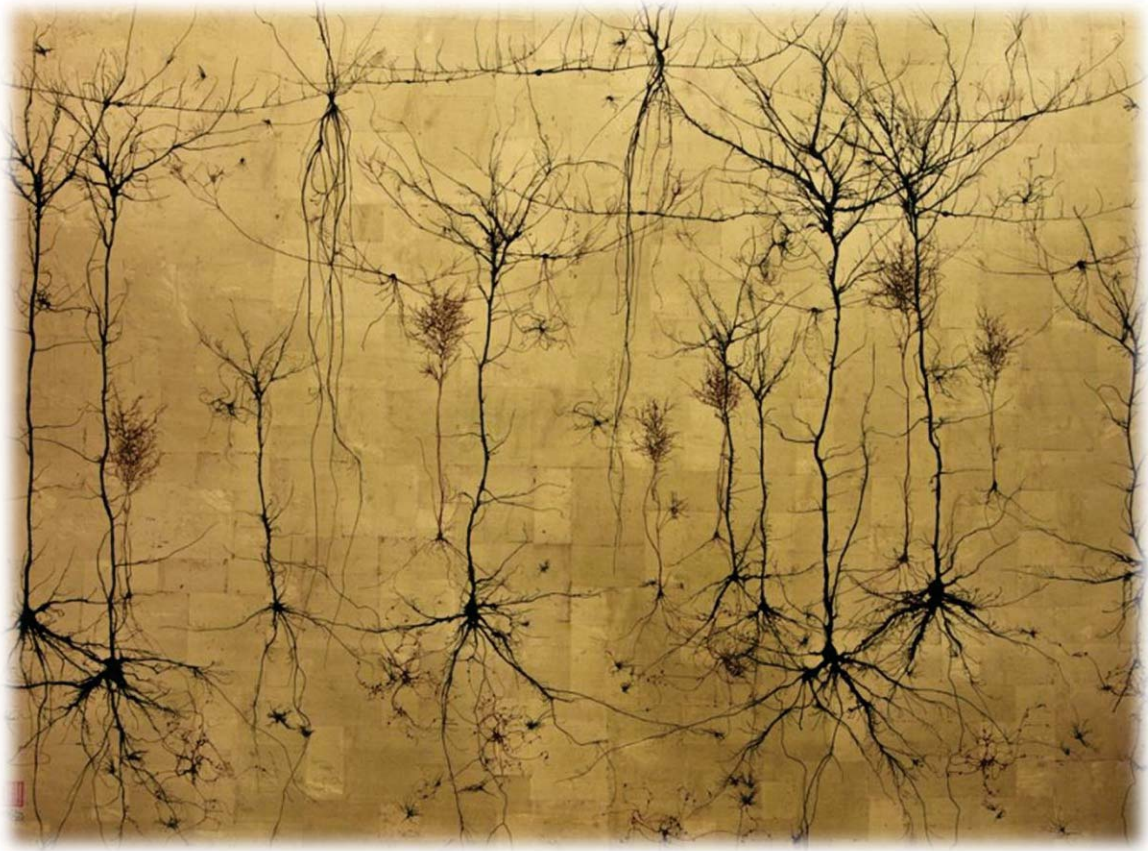
sur quoi reposent ces différences de sensibilité, il est nécessaire d'en appréhender l'ensemble des composants.

Le premier chapitre de cette thèse sera tout d'abord consacré à la sensibilité douloureuse chez l'adulte et au cours du développement. Puis, nous nous intéresserons à l'embryogenèse du système nerveux et à la maturation des relais de l'information sensitive : la moelle épinière et le complexe sensitif du trijumeau. Une troisième partie détaillera le développement des connexions sensorielles centrales et des voies descendantes sérotoninergiques. Et enfin une dernière partie sera consacrée au développement phénotypique, morphologique, et physiologique des neurones sensoriels des couches superficielles.

Les différents travaux réalisés au cours de ma thèse seront détaillés dans les second et troisième chapitres, et seront suivis d'une discussion générale.

Chapitre 1

Introduction



Greg A Dunn Design, Gold Cortex II

I. Introduction à la sensibilité douloureuse

L'IASP (International Association for the Study of Pain) donne une définition précise de la douleur : on appelle douleur « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à des lésions tissulaires réelles ou potentielles ou décrites en des termes évoquant de telles lésions ». La nociception constitue l'ensemble des mécanismes physiologiques permettant la détection d'un stimulus potentiellement dommageable pour les tissus.

1.1 Pluralité de la douleur

La douleur peut-être considérée comme une entité hétérogène tant elle est décrite selon sa cause, ses caractéristiques temporelles, ou encore sa localisation.

1.1.1 Classification des douleurs selon la cause

La « douleur adaptée » ou « **douleur nociceptive** » est déclenchée par la stimulation des nocicepteurs répondant spécifiquement aux stimuli de haute intensité, qu'ils soient mécaniques, thermiques, chimiques ou électriques (Woolf and Ma, 2007). Cette douleur est définie comme une douleur informative puisque sa finalité est d'induire une réaction physique, par exemple un réflexe de retrait, en vue de protéger l'intégrité de l'organisme. Cette douleur apparaît donc en réponse à un stimulus nocif et cesse lorsque celui-ci s'arrête.

Mais parfois, des douleurs sont déclenchées par des stimuli de faible intensité qui, en condition physiologique, sont peu ou pas perçus comme douloureux : on parle de « **douleurs inadaptées** ». Le terme « **allodynie** » est employé pour décrire une douleur induite par une stimulation normalement indolore. L'**hyperalgésie**, quant à elle, correspond à une douleur intense induite par une stimulation nociceptive de faible intensité qui va alors provoquer une réponse exagérée (Bennett et al., 2006). L'allodynie et l'hyperalgésie sont les acteurs clés de l'adaptation du SNC face à une lésion. Elles concernent trois types de douleur : inflammatoire, neuropathique et idiopathique.

La **douleur inflammatoire** est liée à une lésion tissulaire induisant une réaction inflammatoire. L'expression de cette douleur encourage l'individu à protéger le tissu lésé pour faciliter la cicatrisation. En effet, le système nerveux s'adapte en abaissant localement les seuils de sensibilité nociceptive, facilitant ainsi une réponse de défense pour protéger le tissu d'une éventuelle aggravation de la lésion.

La **douleur neuropathique** est une douleur induite par une lésion ou une maladie affectant le système nerveux. Elle apparaît au niveau périphérique dans le territoire innervé par la structure lésée, mais n'a ni un rôle de protection, ni de réparation du tissu périphérique et ne favorise pas non plus la guérison (Costigan et al., 2009). La douleur neuropathique survient dans des contextes cliniques variés tels que des traumatismes mécaniques, des chimiothérapies, une infection, ou encore une invasion tumorale, parmi d'autres exemples (Costigan et al., 2009). De plus, les douleurs neuropathiques se caractérisent par une diversité d'expression sur le plan sémiologique : les patients peuvent évoquer des douleurs spontanées continues (brûlures, sensations douloureuses au froid, etc), ou paroxystiques (décharge électrique, coups de couteau). Enfin, la **douleur idiopathique** est une douleur dont les causes sont encore mal expliquées (Costigan et al., 2009), puisqu'elle apparaît en l'absence de stimulus nociceptif, d'inflammation ou de lésion identifiable. Dans la plupart des cas, on ignore ce qui provoque la manifestation ou la persistance de la douleur. Cependant, tout comme les douleurs inflammatoires et neuropathiques, la douleur idiopathique peut entraîner des phénomènes d'hyperalgésie et d'allodynie.

1.1.2 Classification des douleurs selon la durée

En plus d'une sémiologie relative à sa cause, la douleur peut-être décrite selon sa durée. Comme l'indique son appellation, la douleur **aigüe** dure généralement quelques secondes à quelques minutes. Il s'agit d'un symptôme déclenché par le système nerveux pour alerter l'ensemble de l'organisme qu'un stimulus, qu'il soit thermique, chimique ou mécanique, porte atteinte à l'intégrité du corps. Mais parfois la douleur se prolonge. Dans une certaine mesure, une douleur prolongée peut-être vue comme une extension du processus normal de cicatrisation après une lésion tissulaire ou nerveuse afin de protéger le tissu affecté. Par exemple, un coup de soleil ou une coupure rendent la peau hypersensible. Cependant, lorsqu'une douleur perdure dans le temps, qu'elle devient persistante ou récurrente, elle perd sa finalité de signal d'alarme et devient en quelque sorte inutile et nuisible pour l'individu. On parle dans ce cas de douleur **chronique**. En général, le point de bascule entre la douleur aigüe et la douleur chronique est considéré à 3 mois. Les douleurs **chroniques** sont fréquemment recensées chez les patients souffrant d'un cancer, de fibromyalgie, de névralgie, d'arthrite ou encore de diabète. Dans de nombreux cas la perception de la douleur est alors altérée, incluant de l'hyperalgésie, de l'allodynie et des douleurs spontanées (Sandkühler, 2009).

1.1.3 Les douleurs trigéminales

La région orofaciale se distingue du reste du corps par des particularités anatomiques. En effet, les lèvres et la langue possèdent une densité de récepteurs périphériques plus grande que partout ailleurs dans le corps. De plus, tandis que les informations sensorielles en provenance du corps transitent par la moelle épinière avant d'être traitées au niveau cérébral, les récepteurs périphériques de la sphère orofaciale envoient les informations sensorielles au niveau du tronc cérébral, dans le complexe sensitif du trijumeau.

Les douleurs inflammatoires trigéminales sont liées à la stimulation excessive des nocicepteurs par les médiateurs libérés au cours du processus inflammatoire. C'est ainsi que sont déclenchées la plupart des douleurs bucco-dentaires.

Les douleurs neuropathiques trigéminales sont secondaires à une lésion du système nerveux périphérique provoquée par exemple par un traumatisme (fractures, plaies), par un acte chirurgical, ou par une infection (herpès, zona), ou du système nerveux central (accident vasculaire, pathologie affectant le SNC telle que la sclérose en plaque) (Dallel and Voisin, 2001).

Sur le plan clinique, l'allodynie est le symptôme qui accompagne la plupart des douleurs buccales aiguës ou inflammatoires de l'adulte, et souvent, elle accompagne les pathologies chroniques trigéminales telles que la névralgie essentielle du trijumeau, les névralgies post-traumatiques et post-zostériennes, l'algie faciale idiopathique persistante, ou encore l'algie vasculaire de la face et les migraines (Woda and Pionchon, 2001). Les douleurs trigéminales sont parmi les plus douloureuses et les plus invalidantes, et sont extrêmement difficile à traiter. Actuellement, leur traitement repose pour l'essentiel sur l'utilisation d'antidépresseurs et d'antiépileptiques, dont l'efficacité modeste est variable, additionnée d'effets secondaires considérables.

1.2. *Le paradoxe de la sensibilité douloureuse chez le jeune*

De nombreux travaux, chez l'Homme comme chez l'animal, ont montré que la sensibilité à la douleur chez le jeune est différente de celle de l'adulte. En effet, la réponse à une stimulation douloureuse aiguë est exagérée chez le nouveau-né par rapport à l'adulte (pour revue Fitzgerald, 2005), et pourtant nous allons voir que l'apparition des symptômes douloureux chroniques se fait tardivement au cours du développement.

Chez l'Homme, il semblerait que les douleurs neuropathiques se produisent plus tardivement chez les enfants et avec une incidence moindre que chez les adultes. Par exemple, une avulsion

du plexus brachial, qui provoque des douleurs neuropathiques sévères chez l'adulte, ne provoque pas de douleur neuropathique quand elle survient à la naissance (Anand and Birch, 2002). Une autre étude réalisée sur une cohorte d'une cinquantaine d'enfants victimes d'une lésion nerveuse au niveau des membres supérieurs a montré qu'il n'y avait pas de douleur neuropathique ni d'allodynie chez les enfants âgés de moins de cinq ans, et que des douleurs spontanées chroniques se développaient seulement chez les enfants âgés d'au moins 12 ans au moment de la lésion (Atherton et al., 2008). Par ailleurs, les douleurs trigéminales sont extrêmement rares chez les jeunes (Bender et al., 2011; Egemen et al., 2012). Par exemple, il a été rapporté que les névralgies trigéminales affectent 1 personne sur 25 000, et que 1 % de ces patients ont moins de 20 ans (Grazzi et al., 2005).

Chez l'animal, la sensibilité à la douleur chez le jeune est également bien différente de celle de l'adulte. Même si le nouveau-né répond aux stimuli douloureux, le seuil de sensibilité est plus bas (pour revue Fitzgerald, 2005), la susceptibilité aux traitements est différente (Marsh et al., 1999a, 1999b) et l'expression des symptômes varie en fonction du modèle de douleur et du moment de la lésion (pour revue Fitzgerald, 2005). Par exemple, une ligature du nerf spinal lombaire chez le rat nouveau-né entraîne une allodynie dès la deuxième semaine postnatale, or cette allodynie est temporaire puisqu'elle disparaît rapidement. En revanche, lorsque la lésion est réalisée plus tardivement, à 3 semaines postnatales, l'allodynie devient persistante (Lee and Chung, 1996). Les auteurs concluent en suggérant que les mécanismes indispensables à l'apparition et au maintien des douleurs neuropathiques se mettent en place entre la 2^e et la 3^e semaine postnatale. Cette conclusion a par la suite été appuyée par plusieurs études qui toutes aboutissent au fait qu'une allodynie induite par une lésion nerveuse devient persistante seulement lorsque la lésion est réalisée à partir de la troisième semaine postnatale (Howard et al., 2005; McKelvey et al., 2015; Moss et al., 2007; Vega-Avelaira et al., 2012).

Il semble donc que les mécanismes d'intégration et de traitement des stimulations sensorielles, qu'elles soient tactiles ou nociceptives, sont loin d'être achevés à la naissance de l'individu. Dans la suite de cette introduction, nous allons nous intéresser au développement du cerveau et des structures-relais de l'information sensorielle : la moelle épinière et le complexe sensitif du trijumeau, et ceci du stade embryonnaire jusqu'au stade mature.

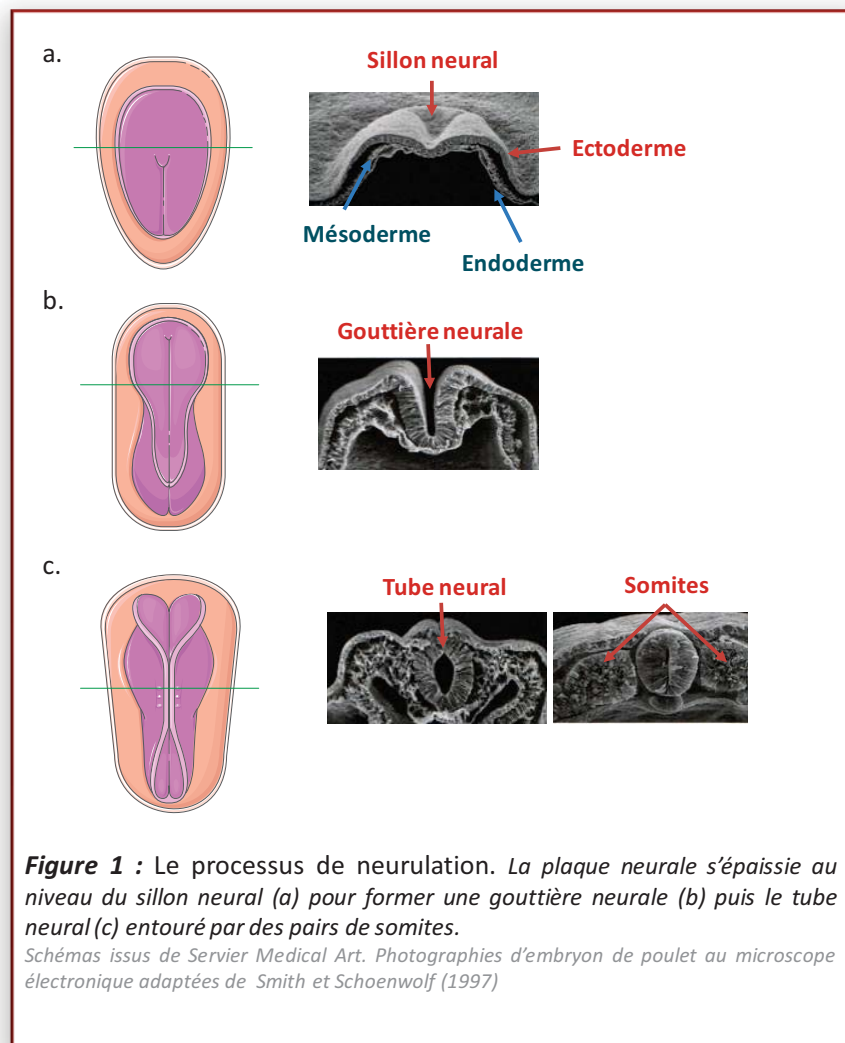
II. *Embryogenèse et maturation de la moelle épinière et du complexe sensitif du trijumeau*

La mise en place du système nerveux central est un mécanisme relativement bien conservé entre les différentes espèces vertébrées et survient très tôt au cours du développement embryonnaire.

2.1. Les grandes lignes de l'embryogenèse du système nerveux central

2.1.1 Du disque embryonnaire à la neurulation

Trois semaines après la fécondation, l'embryon humain a la forme d'un disque plat entouré du sac vitellin qui permet de le nourrir au début de son développement, et du sac amniotique qui le protège des vibrations et des chocs extérieurs. Ce disque est formé de trois couches de cellules distinctes (**Fig. 1**). L'un, l'**endoderme**, va donner naissance à la paroi des organes internes (i.e les viscères) ; un autre, le **mésoderme**, donnera naissance aux os et aux muscles. Enfin, l'**ectoderme** va se différencier pour donner la peau et le système nerveux. A ce stade, le cerveau n'est donc qu'une simple couche aplatie de cellules que l'on appelle la « plaque neurale ». Puis cette plaque neurale va subir une transformation prodigieuse : les parois de la plaque vont se gonfler et s'épaissir formant un sillon neural (**Fig. 1a**), puis une gouttière neurale (**Fig. 1b**). Cet épaississement se fera si bien que les deux parois vont fusionner, pour former le tube neural qui se fermera à la manière d'une fermeture éclair à double sens tout le long de l'embryon, intervenant d'abord en son milieu puis antérieurement et postérieurement ([Smith and Schoenwolf, 1997](#)) (**Fig. 1c**). L'ensemble de ce processus est dénommé « la neurulation ». Les bourrelets de mésoderme de chaque côté du tube neural vont former les somites d'où dériveront les vertèbres et les muscles, ainsi que les tissus sous-jacents de la peau, le derme et l'hypoderme.



Durant la neurulation, des cellules situées au niveau ventral du tube neural vont former la plaque du plancher, et celles situées au niveau dorsal formeront la plaque du toit. D'autres cellules vont migrer de la région dorsale du tube neural pour former les crêtes neurales d'où dériveront, entre autre, les ganglions de la racine dorsale (DRG) (**Fig. 2**). En dessous du tube neural se développe également une structure cartilagineuse rigide mais flexible, la notochorde. La notochorde et la plaque du plancher ont la particularité de sécréter la protéine inductrice et morphogène Sonic Hedgehog contrôlant l'identité des cellules du tube neural ventral (Tanabe and Jessell, 1996). Ce sont en quelque sorte le centre organisateur ventralisant du tube neural. Du côté opposé, la plaque du toit exprime une famille de protéines morphogénétiques osseuses

(BMPs, *Bone Morphogenetic Proteins*) responsables de la différenciation des différentes catégories d'interneurones sensoriels constituant la corne dorsale spinale (Lee et al., 2000).

La protéine Sonic Hedgehog et la famille des BMPs sont non seulement des acteurs indispensables au développement du tube neural, mais elles limitent également le développement aberrant du système nerveux. En effet, la morphogenèse du tube neural est affectée lorsque le niveau de BMPs est anormalement élevé ou réduit, conduisant à des malformations telles que la spina-bifida ou l'exencéphalie (Correia et al., 2007; Stottmann and Klingensmith, 2011). Les BMPs sont ainsi contrôlées par deux gènes, Noggin et Chordin, qui inhibent leur activité (Anderson et al., 2006). De la même manière, l'absence du gène codant pour la protéine Sonic Hedgehog entraîne des syndromes polymalformatifs tels que la formation d'un bec-de-lièvre, une cyclopie et une malformation des membres (Chiang et al., 1996).

Ainsi, Sonic Hedgehog et les BMPs sont des acteurs majeurs de la différenciation du tube neural, agissant à tous les niveaux rostrocaudaux, induisant le développement de la moelle épinière mais également de l'encéphale (Lumsden and Graham, 1995).

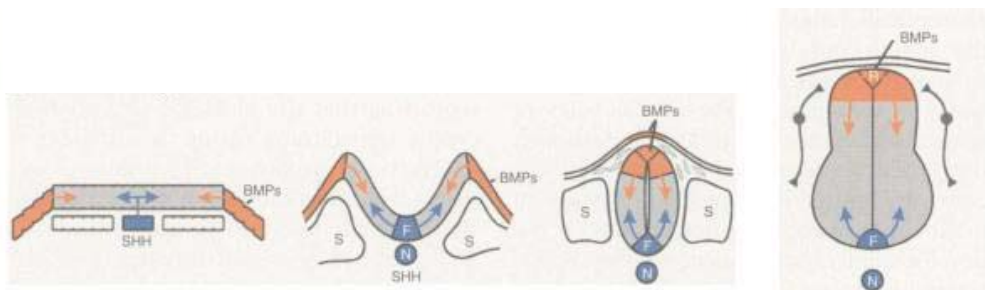


Figure 2 : Deux catégories de signaux inductibles contrôlent la neurulation et la différenciation des cellules. *Sonic Hedgehog (SHH)* dessine la partie ventrale du tube neural. Elle est exprimée par la notochorde (N) et par la plaque du plancher (F). La famille des protéines morphogénétiques osseuses (BMPs) élabore la partie dorsale du tube neural. Initialement, les BMPs sont synthétisées par les plis de l'ectoderme, puis après la fermeture du tube, elles sont exprimées par les cellules de la plaque du toit (R) et par la partie dorsale du tube neural.

Schémas issus de Tanabe et Jessel (1996)

2.1.2 Le développement vésiculaire du système nerveux central

Dans les secondes qui suivent la neurulation, les cellules nerveuses composant le système nerveux rudimentaire de l'embryon entament un processus de multiplication. Toutefois, l'étendue de la prolifération cellulaire n'est pas uniforme le long de l'axe rostrocaudal : certaines régions vont se développer de façon singulière pour donner les structures cérébrales spécialisées que l'on retrouvera chez l'individu mature.

La première étape de la différenciation du système nerveux central est le développement de trois renflements au niveau rostral, que l'on appelle les vésicules primitives : le **prosencephale**, le **mésencéphale**, et le **rhombencéphale**, le reste du tube neural donnant lieu à la moelle épinière. Puis en seulement quelques jours, ces trois vésicules primitives se différencient à leur tour pour donner au total cinq vésicules : le **télencéphale**, le **diencéphale**, le **mésencéphale**, le **métencéphale** et le **myélencéphale** (**Fig. 3**).

L'essentiel des structures dérivées de chacune de ces vésicules est décrit dans la **table 1**.

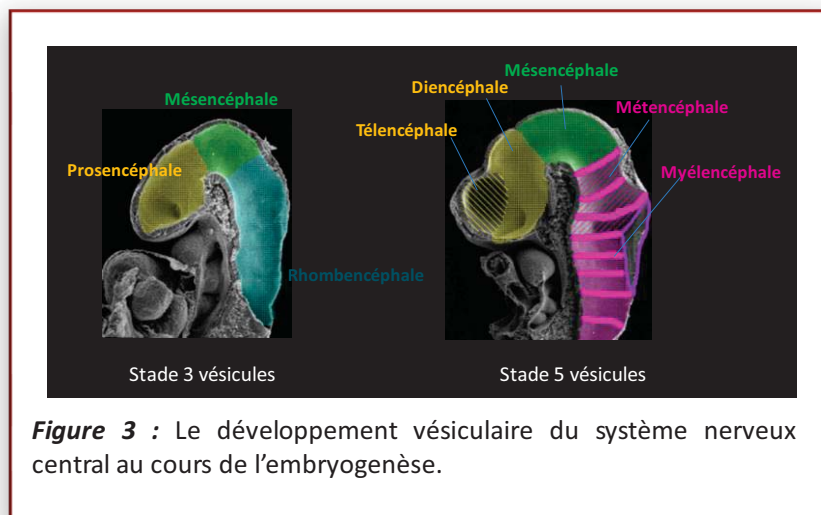


Table 1-Principales subdivisions du système nerveux central embryonnaire et structures dérivées

Stade 3 vésicules	Stade 5 vésicules	Structures dérivées
Prosencéphale	Télencéphale	Cortex cérébral, formation hippocampique, ganglion de la base, amygdale, bulbe olfactif
	Diencephale	Thalamus, hypothalamus, rétine, nerfs optiques
Mésencéphale	Mésencéphale	Tegmentum (contenant entre autre la substance grise périaqueducale (PAG), l'aire tegmentale ventrale (ATV) et le raphé médian mésencéphalique) Tectum (contenant les tubercules quadrijumeaux ou colliculi supérieurs et inférieurs)
	Métencéphale	Pont de Varol, cervelet, nerf trijumeau
Rhombencéphale	Myélencéphale	Medulla oblongata ou bulbe rachidien contenant le complexe sensitif du trijumeau
Partie caudale du tube neural	Partie caudale du tube neural	Moelle épinière

2.1.3 La moelle épinière et le complexe sensitif du trijumeau

2.1.3.1 *Une origine embryonnaire distincte*

La tête est un concentré d'organes indispensables à la vie quotidienne permettant de s'alimenter, de respirer, ou encore de communiquer. Chez l'Homme, le visage a une composante émotionnelle majeure par l'image qu'il renvoie à soi-même et à autrui au travers des traits physiques et des émotions qu'il véhicule. Tout ceci pourrait expliquer une évolution différente du complexe sensitif du trijumeau par rapport à la moelle épinière.

La moelle épinière dérive de la partie caudale du tube neural. Elle va être formée par l'élongation progressive de la plaque neurale (donc avant la formation du tube neuronal) selon une séquence rostro-caudale qui suit l'extension de l'axe du corps. L'élongation de la plaque neurale repose sur l'existence d'un pool de cellules progénitrices en intense prolifération au niveau de la plaque neurale caudale. Ces cellules vont alors peupler la plaque neurale entraînant ainsi son allongement (Mathis and Nicolas, 2000). Par la suite, la moelle épinière va se différencier en plusieurs segments cervicaux, thoraciques, lombaires et sacrés, du plus rostral au plus caudal.

Contrairement à la moelle épinière, le bulbe rachidien, contenant le complexe sensitif du trijumeau, est issu du myélencéphale, lui-même issu de la prolifération d'un autre pool de progéniteurs cellulaires (Mathis et Nicolas, 2000).

D'autre part, les ganglions sensoriels spinaux et le ganglion sensoriel trigéminal (ou ganglion de Gasser), qui contiennent respectivement les corps cellulaires des neurones sensoriels primaire de la moelle épinière et du complexe sensitif du trijumeau, ne dérivent pas des mêmes structures. Les premiers dérivent essentiellement des crêtes neurales, tandis que le ganglion de Gasser est issu de la fusion du ganglion ophtalmique et du ganglion maxillo-mandibulaire, eux-mêmes issus des placodes neurogéniques trigéminales et des cellules des crêtes neurales (pour revue, Streit, 2004). Les cellules issues des placodes neurogéniques trigéminales constituent les neurones sensoriels qui innervent les régions cutanées les plus éloignées du ganglion de Gasser tandis que celles issues de la crête neurale constituent les neurones sensoriels et proprioceptifs des régions proximales par rapport au ganglion de Gasser (Shigetani et al., 2008).

2.1.3.2 La corne dorsale spinale et son développement postnatal

Ainsi, dès la naissance, la **moelle épinière** est composée de différents segments rostro-caudaux (cervicaux, thoraciques, lombaires et sacrés) (**Fig. 4A1**). Sur le plan dorso-ventral, elle présente une organisation laminaire, c'est-à-dire qu'elle est divisée en couches (**Fig. 4B1**). Au total, la substance grise de la moelle épinière est divisée en dix couches. Les couches I à VI composent la corne dorsale spinale (CDS) qui contient les corps cellulaires des neurones sensoriels centraux (Todd, 2010). Le reste constitue la zone intermédiolatérale et la corne ventrale qui contiennent les corps cellulaires des motoneurones (neurones moteurs).

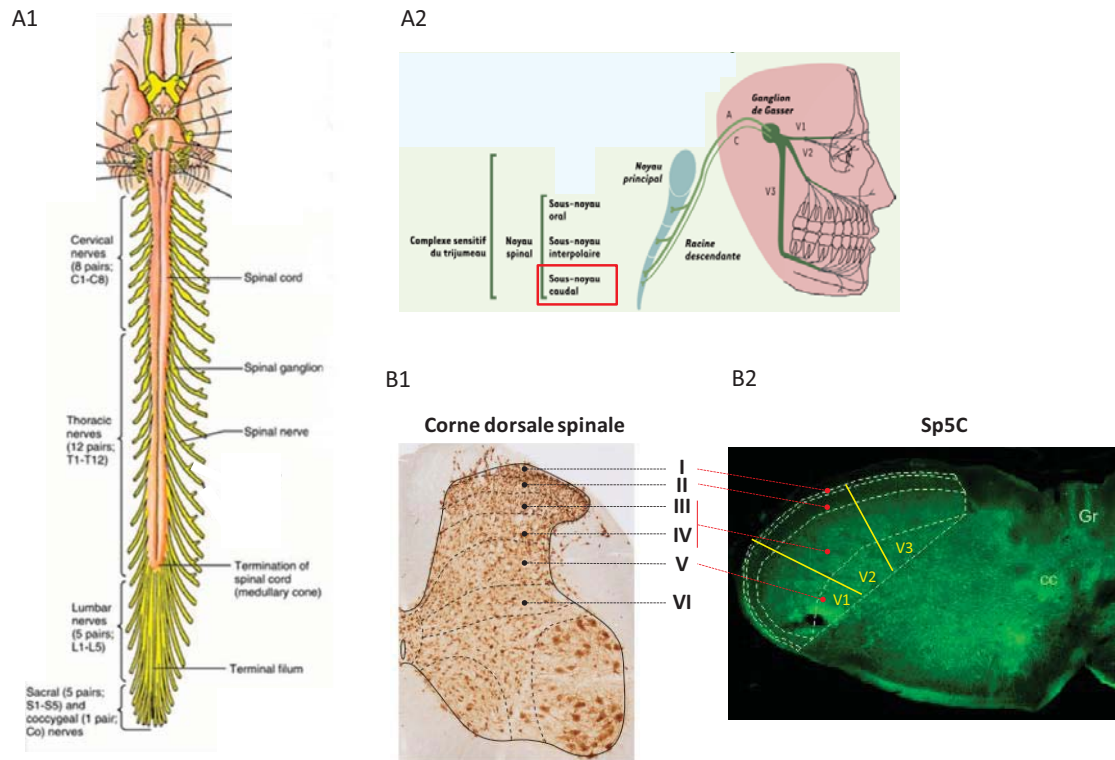


Figure 4 : La moelle épinière et le complexe sensitif du trijumeau. **A**, Organisation de la moelle épinière (A1) sur le plan rostrocaudal avec ses segments cervicaux, thoraciques, lombaires et sacrés. ; et du complexe sensitif du trijumeau (A2) dont le sous-noyau caudal (Sp5C) fait partie (d'après Dallel et al., 2003). **B**, Coupes transversales de moelle épinière (B1) et de tronc cérébral (B2) marquées avec un anticorps anti-NeuN sélectif des noyaux des neurones. Les lignes en pointillés délimitent les différentes couches de la corne dorsale spinale et du Sp5C, selon la classification de Rexed.

Abréviations : Gr, noyau gracile ; cc, canal central

CDS issue et adaptée de Todd (2010). Coupe de tronc cérébral issue des données du laboratoire.

D'après des critères établis dans la littérature de la deuxième moitié du 20^e siècle, notamment chez le chat par le neuroscientifique suédois Bror [Rexed \(1952\)](#) puis chez le rat par [Molander en 1984](#), la délimitation des couches les plus superficielles est aisée. La couche I, surmontée de la substance blanche, contient une faible densité de neurones ayant pour la plupart un soma fusiforme. La couche II, que l'on appelle aussi *substance gélatineuse*, possède une densité de neurones plus importante que la couche I, et peut être divisée en couche II externe (IIe) et II interne (IIi) : la couche IIe contient une grande densité de petits interneurons, tandis que les interneurons de la couche IIi sont plus diffus. La limite ventrale de la couche IIi est identifiable par la présence en couche III d'interneurons légèrement plus larges. Les couches les plus profondes sont constituées d'interneurons de grande taille plus isolés, et leur délimitation est plus difficile à discerner.

A la naissance (à P0), l'ensemble des couches superficielles I, IIe, et IIi sont clairement délimitées. L'architecture de ces couches va néanmoins subir de profondes modifications au cours des premières semaines après la naissance. En se basant sur les critères de délimitation des couches, Coimbra en 1986 et Lorenzo quelques années plus tard, décrivent une augmentation modérée de l'épaisseur de chacune des couches I, II et III au cours du développement ([Coimbra et al., 1986](#); [Lorenzo et al., 2008](#)). En regardant de plus près la couche II, Coimbra et ses collaborateurs constatent que la couche IIe diminue en taille tandis que la couche IIi augmente considérablement. Avant P5, la couche IIi est plus fine que la IIe, puis elle devient de plus en plus épaisse jusqu'à P20, âge auquel la taille relative des couches les plus superficielles (I et II) est similaire à celle observée chez l'adulte. En revanche, les couches III à VI continuent de s'épaissir après P20 jusqu'à P60 ([Lorenzo et al., 2008](#)).

2.1.3.3 *Le Sp5C et son développement postnatal*

Comme nous l'avons abordé en début de cette introduction, le complexe sensitif du trijumeau constitue le premier relais au sein du SNC pour les informations sensorielles orofaciales. Il est divisé en deux noyaux : le noyau principal et le noyau spinal. Ce dernier se divise à son tour en trois sous-noyaux : le sous-noyau oral (oralis ou Sp5O), le sous-noyau interpolaire (interpolaris ou Sp5I), et le sous-noyau caudal (caudalis ou Sp5C), respectivement du plus rostral au plus caudal (**Fig. 4A2**).

Le Sp5C présente une structure laminaire tout à fait similaire à celle de la CDS, à la différence près qu'il ne comporte que cinq couches (Kerr, 1970) (Fig. 4B2). En 1981, Gobel attribue d'ailleurs au Sp5C le nom de corne dorsale bulbaire (MDH, *medullary dorsal horn*) étant donné les similarités observées à l'époque entre la CDS et Sp5C (Gobel et al., 1981). Néanmoins, contrairement à la CDS de la moelle épinière, le Sp5C, est organisé selon une somatotopie médio-latérale bien définie. En effet, les territoires innervés par les branches ophtalmique (V1, innervation de la partie supérieure de la face), maxillaire (V2, innervation du tiers moyen jusqu'à la lèvre supérieur) et mandibulaire (V3, innervation de la partie inférieure de la face et remontant jusqu'à la bosse pariétale) du nerf trijumeau projettent de façon ordonnancée dans le Sp5C (Fig. 4B2).

Etant donné l'importance du Sp5C dans le traitement de l'information tactile et nociceptive en provenance de la sphère orofaciale, nous avons donc centré nos travaux sur cette région. Cependant, le Sp5C ayant longtemps été considéré comme le prolongement cervical de la moelle épinière, la plupart de nos connaissances sur le développement des connexions sensorielles, des voies descendantes et des neurones sensoriels, viennent d'études réalisées au niveau spinal, et qui plus est au niveau lombaire. Dans la suite de cette introduction, nous détaillerons donc ce développement sous le prisme de la CDS, en soulignant les différences, lorsqu'elles sont identifiées, avec le Sp5C.

III. *Le développement des connexions sensorielles centrales et des voies descendantes*

3.1. *Les protoneurones : premiers acteurs de la transmission sensorielle*

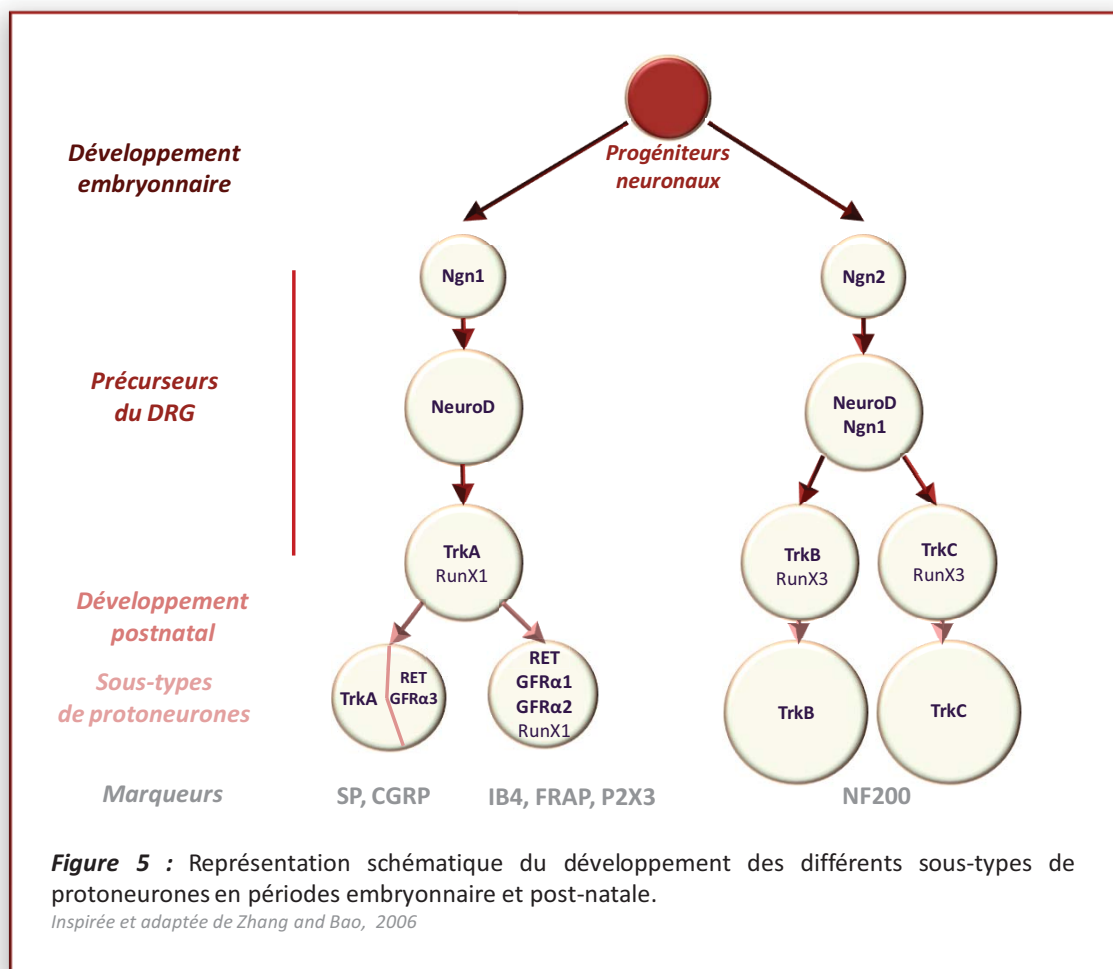
3.1.1 Différentes catégories de protoneurones

Les protoneurones (ou neurones sensoriels primaires) transmettent aux neurones de la CDS ou du Sp5C les informations sensorielles détectées à la périphérie. Ce sont des neurones pseudo-unipolaires en T dont les corps cellulaires sont localisés dans les ganglions des racines dorsales (DRG, pour les racines spinales) ou dans les ganglions de Gasser (pour le nerf trijumeau). Chez l'adulte, on distingue plusieurs catégories de protoneurones ([pour revue Zhang and Bao, 2006](#)). Parmi eux, on retrouve les protoneurones de petit diamètre. Certains sont peptidergiques puisqu'ils expriment le peptide « *Calcitonin gene-related peptide* » (CGRP) et la substance P (SP), ainsi que le récepteur *Tyrosine Kinase Receptor A* (TrkA). De plus, ils sont sensibles au facteur de croissance « Nerve Growth Factor » (NGF). Environ 40% expriment le récepteur GFR α 3 et le récepteur Ret tyrosin-kinase (RET) ayant pour ligands le facteur de croissance « *Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor* » (GDNF) et l'artemin, un facteur neurotrophique. D'autres petits protoneurones sont non peptidergiques et ont la caractéristique de fixer l'isolectine B4 (IB4). Ils expriment des composés glycoconjugués, comme les glycolipides ou les glycoprotéines et également les récepteurs GFR α 1 et GFR α 2, ainsi que le RET. Ils sont donc sensibles au GDNF et à la neurturin, un autre facteur trophique indispensable au développement et à la survie des neurones ([Golden et al., 1999](#)).

On distingue également les protoneurones de diamètre plus large. Ils expriment le récepteur *Tyrosine Kinase Receptor B* (TrkB) sensible au facteur de croissance « Brain-Derived Neurotrophic Factor » (BDNF) et aux Neurotrophin-3 et 4 (NT-3 et NT-4) ([Klein et al., 1991, 1992](#)), tous impliqués dans la différenciation et la survie des cellules). Ces protoneurones expriment aussi le récepteur *Tyrosine Kinase Receptor C* (TrkC) activé uniquement par NT-3 ([Kirstein and Fariñas, 2002](#)).

3.1.2 La différenciation des protoneurones au cours du développement

Plusieurs facteurs de transcription déterminant le phénotype des protoneurones ont été identifiés (**Fig. 5**). En particulier, les gènes de détermination neuronale Neurogenin (Ngns) agissent comme un facteur de détermination et régulent l'expression du gène NeuroD (*Neurogenic differentiation*), indispensable à la différenciation du système nerveux lors de l'embryogenèse. Le gène Ngn1 est nécessaire pour le développement des neurones exprimant TrkA, tandis que Ngn2 favorise le développement des neurones exprimant TrkB et TrkC.



De plus, les neurones du DRG expriment le facteur de transcription RunX (Runt-related transcription factor) indispensable au développement des neurones nociceptifs (Chen et al., 2006). L'expression de RunX1 est restreinte aux neurones de petit diamètre exprimant TrkA,

tandis que RunX3 est exprimé par les neurones de large diamètre exprimant TrkB et C (Kramer et al., 2006). C'est d'ailleurs une modification de l'expression de ces facteurs de transcription qui orientera le développement d'un type de protoneurone plutôt qu'un autre. En effet, au cours du développement postnatal, l'expression persistante de RunX1 va entraîner une transition quant à l'expression de TrkA ou RET : l'expression de RunX1 va s'éteindre dans les neurones du DRG exprimant TrkA. De plus RunX1 est nécessaire pour supprimer l'expression des neuropeptides CGRP et substance P (pour revue Zhang and Bao, 2006).

Le nombre de protoneurones évolue en deux phases : la première vague de neurogenèse concerne les neurones de gros diamètre TrkB et TrkC avec un pic à E14, suivie d'une deuxième vague concernant les neurones TrkA avec un pic à E15 (Kitao et al., 1996 ; pour revue Gascon and Moqrich, 2010) . De plus, la maturation des protoneurones semble se faire selon un gradient rostro-caudal puisque les protoneurones des DRG de la région cervicale apparaissent avant ceux de la région lombaire (Lawson and Biscoe, 1979). Le nombre final de protoneurones du DRG est déterminé par une balance entre neurogenèse et mort cellulaire, et leur survie est déterminée par un accès aux facteurs de croissance Neurotrophines (pour revues Kirstein and Farinas, 2002 ; Laquerrière, 2010). Le nombre de neurones du DRG augmente progressivement jusqu'à la naissance, puis il subit une phase de diminution de 15% au cours des premiers jours postnataux correspondant à l'innervation de la peau (Coggeshall et al., 1994).

3.2 Le développement des voies sensorielles centrales

Les protoneurones possèdent deux branches axonales (fibres), dont les terminaisons contactent pour l'une la périphérie, et pour l'autre les neurones de la CDS ou du complexe sensitif du trijumeau dans le tronc cérébral. Une fois détectés en périphérie, les stimuli sont transformés en messages électriques et acheminés au niveau central, via différents types de fibres sensorielles (**Fig. 6A**). On distingue les fibres A β , A δ et C, en fonction de leurs caractéristiques morphologiques, moléculaires et électrophysiologiques (pour revue Cordero-Erausquin et al., 2016) (**Fig. 6B**). Nous allons voir que chacune de ces fibres a un développement spatial et temporel qui lui est propre.

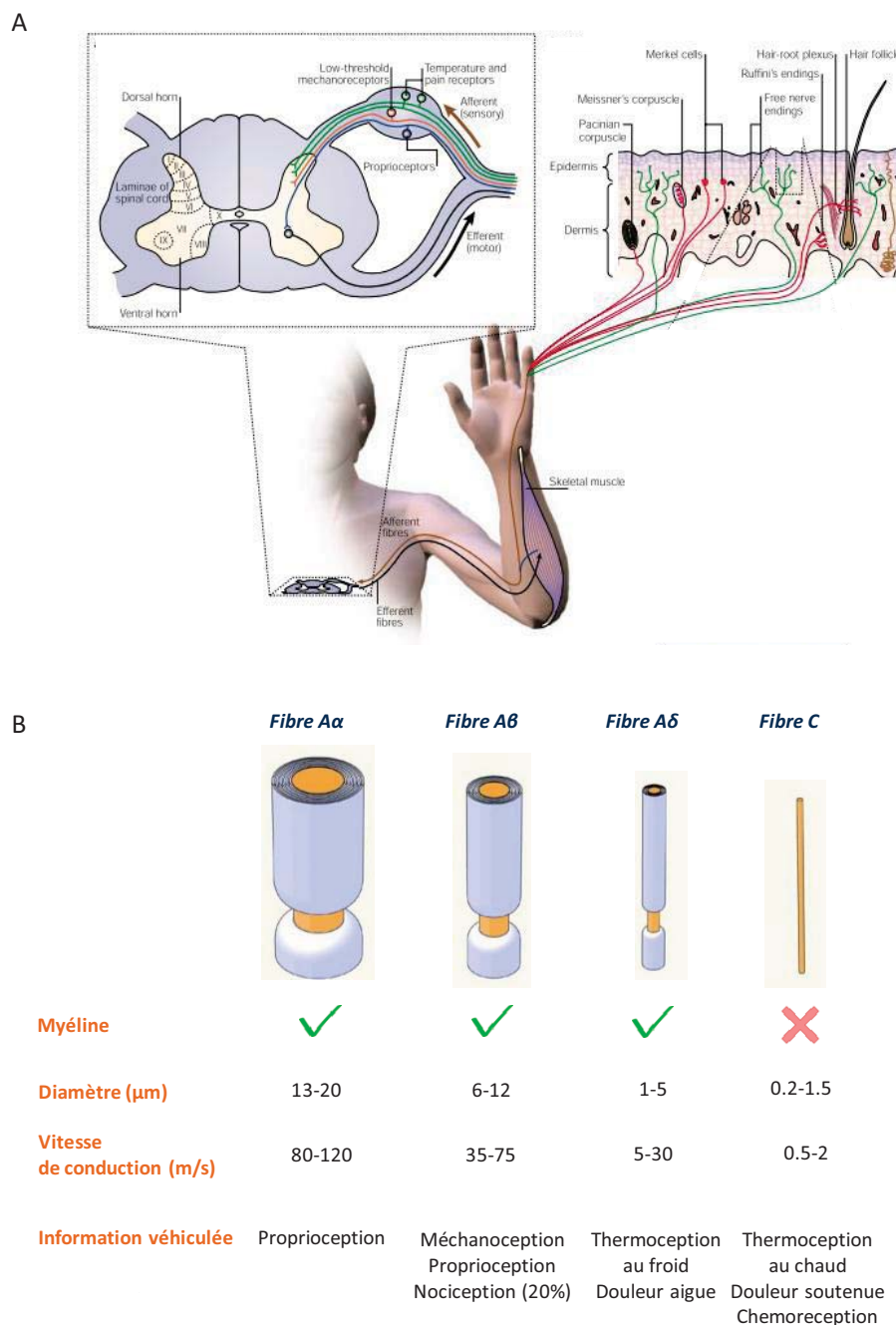


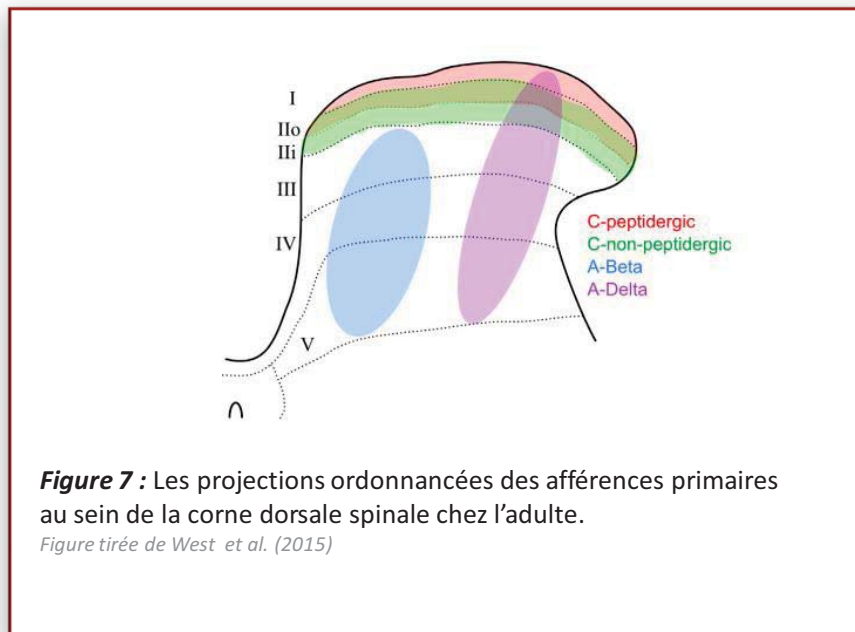
Figure 6: Anatomie et organisation fonctionnelle de la sensibilité tactile et nociceptive. **A.** Illustration schématique des projections sensorielles proprioceptives (bleu), tactiles (rouge) et nociceptives (vert) dans la moelle épinière. Les corps cellulaires des neurones sensoriels sont localisés dans le ganglion de la racine dorsale (DRG). Les afférences primaires cutanées se divisent en 5 groupes (corpuscules de Pacini, corpuscules de Meissner, disques de Merkel, corpuscules de Ruffini et terminaisons libres) (d'après Patapoutian et al, 2003) **B.** Classification des différentes fibres sensorielles selon leurs propriétés.

Inspirée du livre « Neuroscience : Exploring the Brain, 3e édition, Pradel »

3.2.1 Les fibres A β

Les fibres A β ont un diamètre large (5 à 15 μ m) et sont entourées d'une épaisse gaine de myéline. Elles transportent les informations tactiles non-nociceptives avec une vitesse de conduction de l'ordre de 36 à 72 m/s chez l'Homme (Lewin and Moshourab, 2004). D'un point de vue moléculaire, les fibres A β expriment une forme de neurofilament phosphorylé de 200 KDa (NF200), et expriment spécifiquement le transporteur vésiculaire du glutamate de type 1 (VGLUT1) (Todd et al., 2003). L'essentiel de ces fibres est impliqué dans la mécanoreception (pression, forme, texture, vibration), mais également dans la proprioception en contactant le fuseau neuromusculaire (Zigmond, 1999). Cependant, il est à noter que 20 % des fibres A β spinales véhiculent de l'information nociceptive (Djoughri and Lawson, 2004). Chez l'adulte, les terminaisons centrales des fibres A β sont principalement retrouvées dans les couches III à V (Fig. 7)(Li et al., 2011; Neumann et al., 2008).

Les fibres A β proviennent des protoneurones de large diamètre exprimant TrkB et TrkC. Le développement de ces fibres est relativement précoce au cours du stade embryonnaire. En effet, elles sont déjà présentes à E13 à la frontière entre la future CDS et la racine dorsale spinale (Fig. 8). A E14, elles descendent dans le neuro-épithélium dorsal. Puis une partie de ces fibres va projeter dans les couches profondes de la CDS dès E15. Entre E17 et E18, le papillon caractéristique de la moelle épinière se dessine et les fibres projettent de plus en plus en zone ventrale. Et finalement, à E19, on observe du marquage des fibres A β partout dans la corne dorsale (Jackman and Fitzgerald, 2000). Ainsi, à la naissance, les fibres A β ont des terminaisons dans toutes les couches de la CDS (Pignatelli et al., 1989; Woodbury and Koerber, 2003). A ce stade, leurs terminaisons forment des connexions fonctionnelles avec les neurones immatures, comme en témoignent leurs réponses monosynaptiques à des stimulations à bas seuil et l'expression du marqueur d'activité c-fos (Jennings and Fitzgerald, 1996; Park et al., 1999). Progressivement, ces fibres A β vont ensuite se rétracter des couches superficielles, via un processus dépendant des récepteurs glutamatergiques de type NMDA (Beggs et al., 2002) et de l'activité des fibres C (Torsney et al., 2000) jusqu'à atteindre leur place définitive 21 jours après la naissance.



3.2.2 Les fibres A δ

Les fibres A δ ont un diamètre inférieur aux fibres A β (1 à 5 μ m) et sont faiblement myélinisées. Elles transmettent à la fois des informations non nociceptives et nociceptives, avec une vitesse de conduction comprise entre 5 et 30 m/s (Lewin and Moshourab, 2004). Elles peuvent être identifiées par leur expression du facteur NT-4 et du récepteur TrkB sensible au BDNF (Li et al., 2011). Elles expriment également le transporteur vésiculaire 2 du glutamate (VGLUT2) (Todd et al., 2003). Les fibres A δ à bas-seuil répondent aux pressions tactiles et aux variations de température (thermoception au froid) (Li et al., 2011). On les retrouve principalement dans les follicules pileux (D-hair). Les fibres A δ à haut-seuil répondent aux stimuli mécaniques statiques de haute intensité (douleur aiguë). Les projections centrales des fibres A δ non nociceptives se retrouvent principalement dans les couches IIi et III (Li et al., 2011), alors que celles des fibres A δ nociceptives sont principalement localisées dans les couches I-IIe et V (Fig. 7) (Light and Perl, 1979; Woodbury and Koerber, 2003; Woodbury et al., 2008).

L'arrivée des fibres A δ au niveau central se fait tardivement au stade embryonnaire. En effet, elles pénètrent dans la CDS au niveau de la couche I à E19. Puis quelques heures vont suffire aux fibres A δ pour aller former des contacts synaptiques au sein de la couche IIe (E19.5) puis dans la couche IIi (E20) (Fig. 8) (Fitzgerald, 1987).

3.2.3 Les fibres C

Contrairement aux fibres C spinales qui représentent la grande majorité des fibres sensorielles des racines dorsales (70 à 80 %), la proportion de fibres C trigéminales est plus faible et correspond à environ 40% des fibres totales (Cadden and Orchardson, 2001). Les fibres C sont des fibres de petit diamètre ($< 1.5 \mu\text{m}$) et n'ont pas de gaine de myéline. Elles véhiculent les messages avec une vitesse de conduction lente (de 0,5 à 2 m/s chez l'homme; Lewin and Moshourab, 2004). On distingue des fibres C nociceptives et des fibres C non nociceptives. Classiquement, les fibres C nociceptives se divisent en deux catégories : les fibres C peptidergiques, exprimant le récepteur TrkA sensible au NGF et contenant des neuropeptides tels que la SP, la galanine et le CGRP; et les fibres C non peptidergiques exprimant le récepteur au GDNF, le récepteur P2X à l'ATP (notamment la sous-unité P2X3) et possédant des sites de liaison à l'IB4 (Averill et al., 1995). Ces fibres nociceptives sont impliquées dans la perception d'une douleur soutenue et dans la thermoception au chaud ($> 40^\circ\text{C}$) et au froid ($< 10^\circ\text{C}$), ce qui en fait des récepteurs dits polymodaux (pour revue, Lewin et Moshourab, 2004). Il existe également des fibres C non nociceptives dites à bas seuil (C-LTMR) (Delfini et al., 2013 ; Reynders and Moqrich, 2015), activées par des stimulations tactiles douces, telle que la caresse (Liljencrantz and Olausson, 2014) ou lors d'une allodynie mécanique induite par une inflammation ou une lésion nerveuse (Seal et al., 2009). Il est intéressant de noter que les fibres C-LTMR représentent en moyenne 15 % des fibres au niveau du tronc, contre 30 % au niveau de la région sacrée qui innerve, entre autre, les parties génitales (Li et al. 2011). Les fibres C non nociceptives expriment la tyrosine hydroxylase (TH) et le transporteur vésiculaire du glutamate de type 3 (VGLUT3) (Seal et al., 2009 ; Li et al., 2011).

D'un point de vue anatomique, les projections centrales des fibres C peptidergiques sont localisées principalement dans les couches I et IIe, avec quelques terminaisons dans la couche Iii (Fig. 7). Les terminaisons des fibres C non peptidergiques IB4 et les fibres C-LTMR sont principalement situées dans la couche Iii (Neumann et al., 2008 ; Seal et al., 2009 ; Li et al., 2011).

Toutefois, il peut exister des différences anatomiques entre les espèces animales. Notamment, chez le rat, les fibres IB4 projettent dans les couches IIe et Iii (Bailey and Ribeiro-da-Silva, 2006 ; Lorenzo et al., 2008), tandis que chez la souris les fibres IB4 projettent dans la couche IIe jusqu'à la moitié dorsoventrale de la couche Iii. Cette ségrégation des fibres IB4 indique que chez la souris, la couche Iii peut-être divisé en couche Iii ventrale et en couche Iii dorsale (Neumann et al., 2008).

III. Le développement des connexions sensorielles centrales

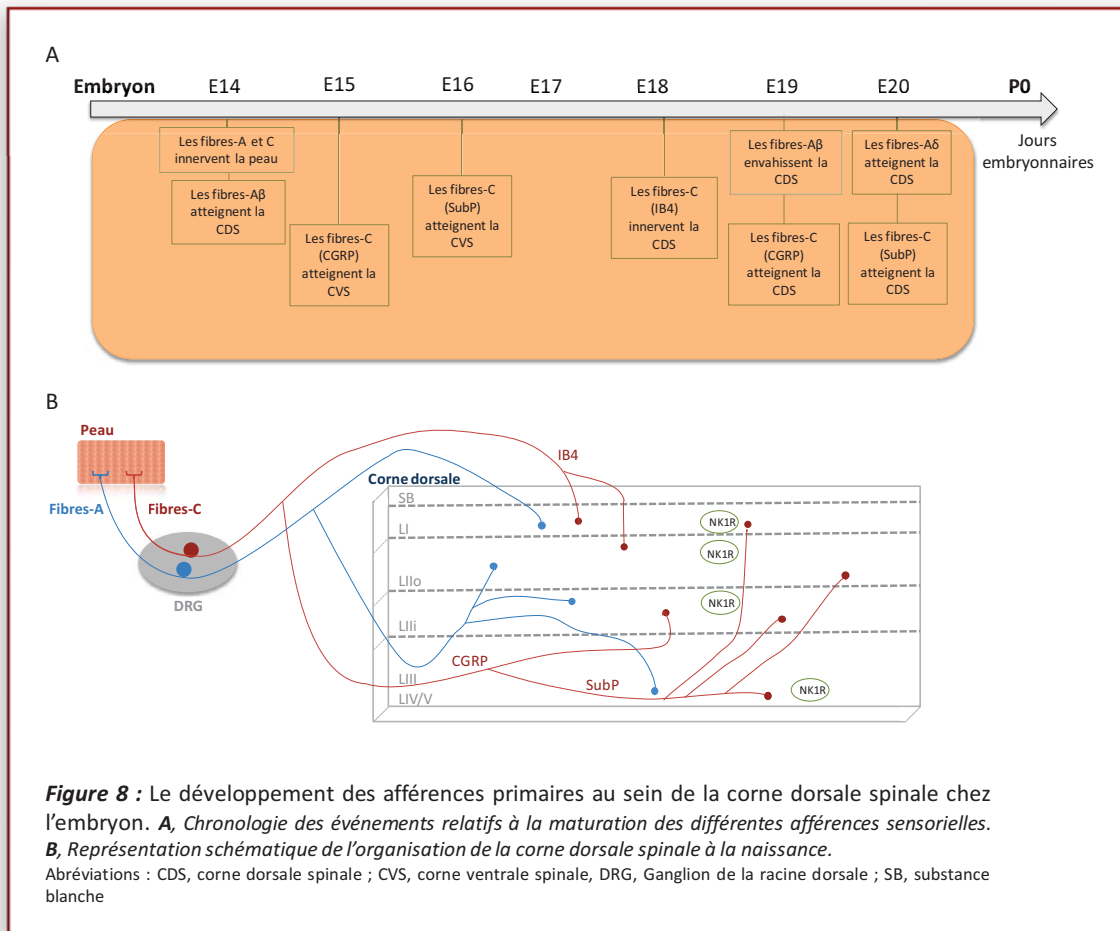
De manière générale, les fibres C apparaissent plus tardivement que les fibres A β (**Fig. 8**), mais leur développement est variable selon les marqueurs qu'elles expriment. Les fibres C peptidergiques qui expriment le **CGRP** apparaissent dans un premier temps dans la corne ventrale au niveau des motoneurones à E14, mais ne sont observées dans la CDS qu'à partir de E19 (Jackman and Fitzgerald, 2000).

Les fibres C-peptidergiques qui expriment la **SP** apparaissent d'abord dans la partie ventrale de la CDS (couches V-VI) à E16 et sont ensuite observées dans les couches superficielles à partir de E20, leur densité augmentant bien au-delà de la naissance pour atteindre un profil d'expression mature chez l'adulte (Senba et al., 1982). Dans le Sp5C, une étude a montré qu'à la naissance, la SP comme son récepteur spécifique NK1, sont présents dans les couches I et II mais également dans les couches profondes (couches V-VI). Pendant la période postnatale, l'expression de la SP diminue drastiquement à la 2^e semaine de vie pour finalement disparaître complètement des couches profondes à la 4^e semaine postnatale, tandis que le récepteur NK1 reste présent dans ces couches. Ceci suggère que la libération de SP peut s'effectuer via d'autres fibres que les afférences primaires peptidergiques (Aita et al., 2005a).

Les fibres C non-peptidergiques liant l'**IB4** apparaissent dans les couches superficielles à E18 et vont former un véritable réseau de fibres localisées uniquement en couche II (Jackman and Fitzgerald, 2000).

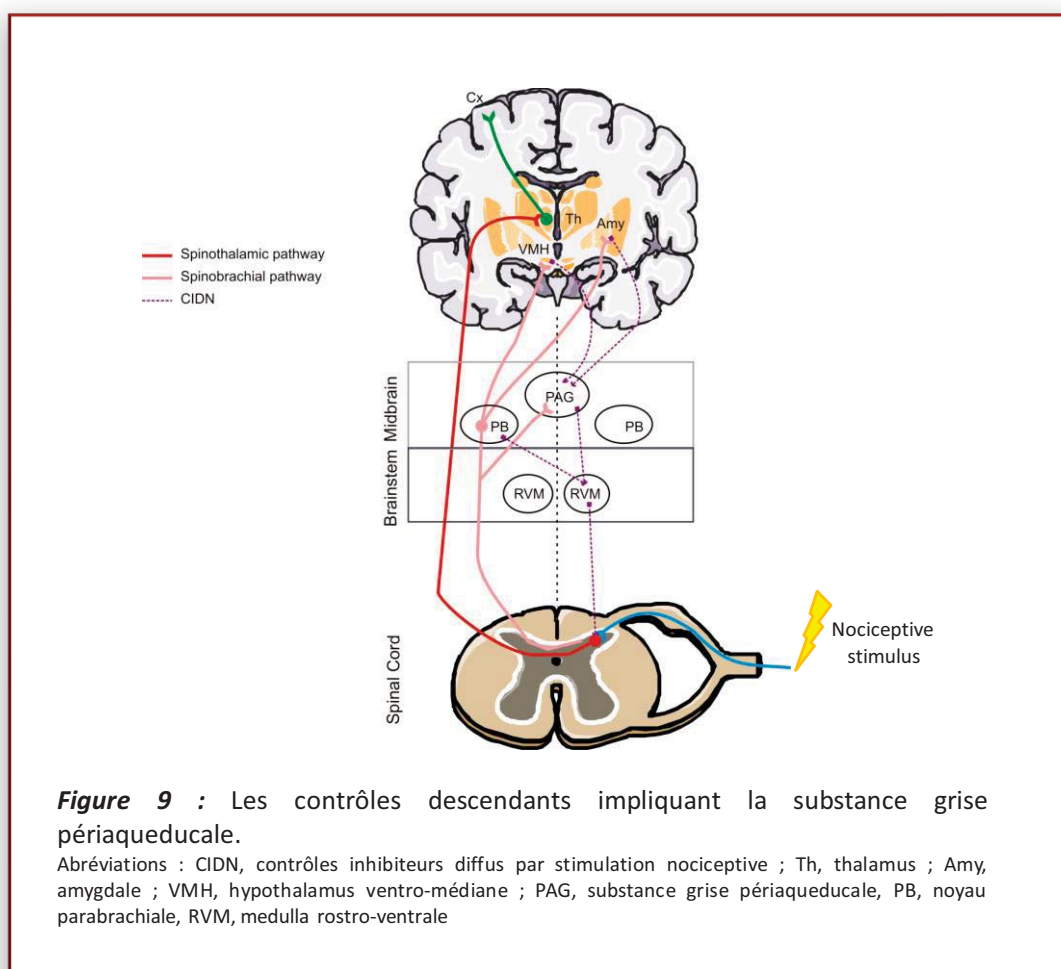
Dans une étude développementale réalisée au niveau de la CDS lombaire, Lorenzo et ses collaborateurs ont montré que la densité des fibres CGRP et IB4 évolue après la naissance. En effet, la taille du marquage IB4 et de CGRP diminue de près de la moitié entre la naissance et 60 jours postnataux (Lorenzo et al., 2008). Cette diminution pourrait s'expliquer par la mort cellulaire des neurones du DRG en période néonatale associée à une élimination des axones (Coggeshall et al., 1994).

De plus, même si les fibres C sont présentes à la naissance, cela ne signifie pas qu'elles sont opérationnelles. En effet, leur stimulation n'induit pas de décharge de potentiel d'action dans les neurones de la CDS avant 10 jours après la naissance (Jennings and Fitzgerald, 1998). Il semble donc que la maturation fonctionnelle des synapses des fibres C soit tardive et s'effectue au cours des premières semaines postnatales.



3.3. Le développement des contrôles descendants de la douleur : focus sur la sérotonine

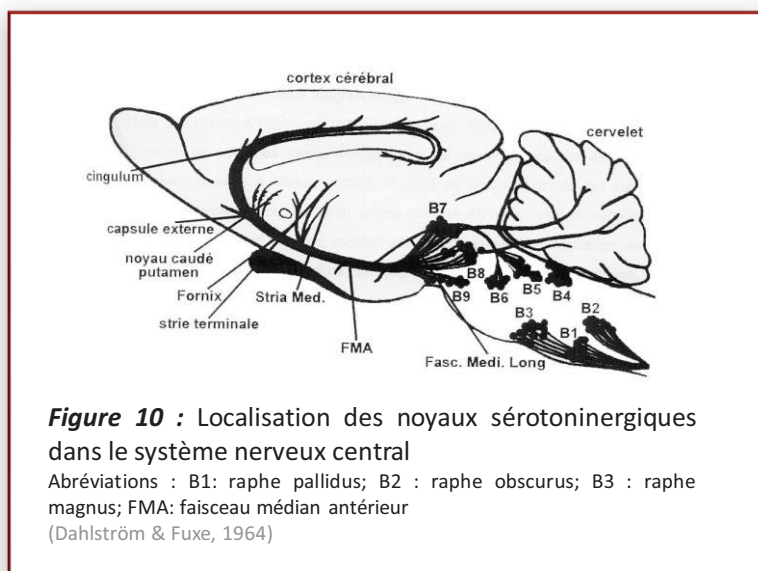
En plus d'être sous contrôle des afférences sensorielles, les circuits nociceptifs centraux (spinaux et du sp5C) sont sous contrôle des voies descendantes. Ces voies en provenance de différentes structures cérébrales (le cortex, l'hypothalamus, l'amygdale, le noyau cunéiforme, le noyau rouge, la substance noire, etc.) peuvent inhiber ou au contraire faciliter la transmission du message nociceptif au cerveau. Un des systèmes de modulation de la douleur le plus décrit dans la littérature passe par la substance grise périaqueducale (SGPA), et la région rostrale ventromédiale de la medulla (RVM) (pour revue [West et al., 2015](#); [Schwaller et al., 2016](#)) (**Fig. 9**). Cependant d'autres structures comme le locus coeruleus ou encore le raphé projettent dans les couches superficielles et sont aussi impliquées dans cette modulation, via la libération de plusieurs neuromodulateurs dont la noradrénaline, la dopamine et la sérotonine ([Fields et al., 1977](#); [Abdallah et al., 2015](#); [Lapirot et al., 2011](#) ; pour revue [West et al., 2015](#)). Etant donné le contenu expérimental de cette thèse, nous n'aborderons dans cette partie que le système sérotoninergique et son récepteur 5-HT_{2A}.



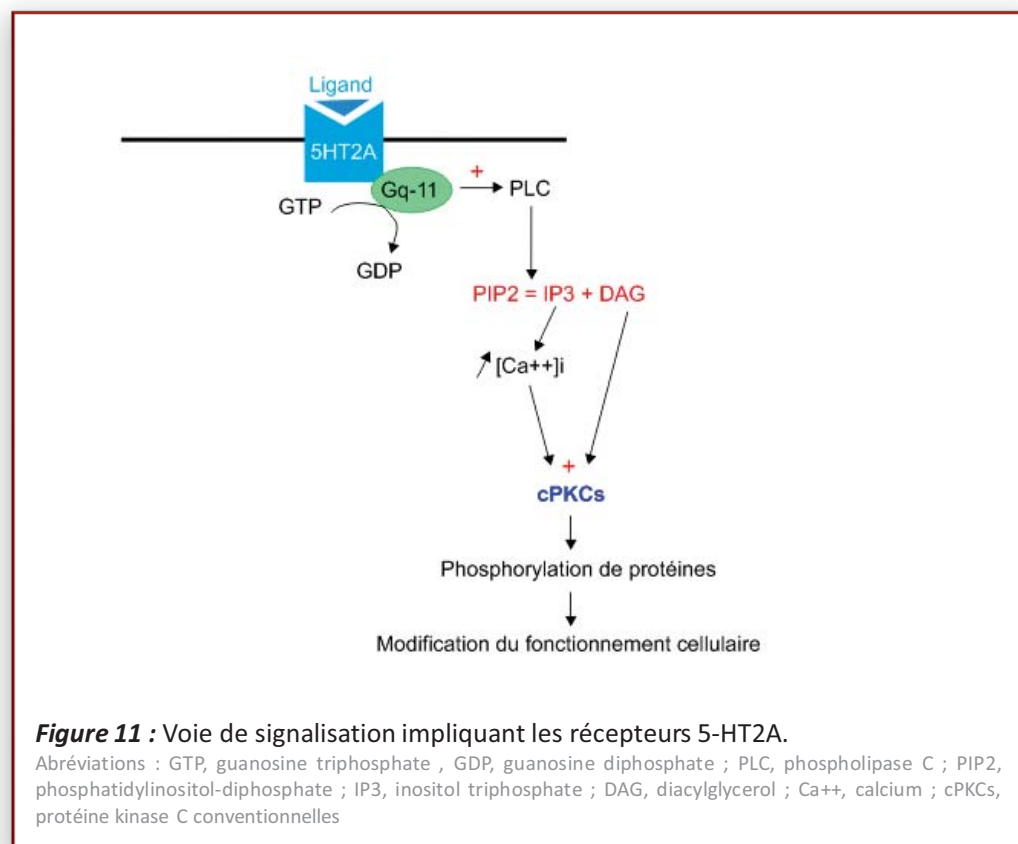
3.3.1 La sérotonine

La sérotonine (5-HT) est un des neuromodulateurs les plus importants du système nerveux central. Elle est impliquée dans de multiples fonctions physiologiques et pathologiques, et notamment dans la douleur.

Les neurones sérotoninergiques sont principalement situés dans la région du raphé et sont groupés en 9 noyaux (Dahlström and Fuxe, 1964). Les noyaux antérieurs du raphé (localisés dans le mésencéphale et le pont) sont composés de neurones dont les terminaisons sérotoninergiques aboutissent dans de nombreuses régions du cerveau antérieur, en particulier au niveau des structures limbiques impliquées dans les émotions (le cortex préfrontal, le septum, l'hippocampe, l'hypothalamus, le thalamus et les noyaux amygdaliens). Les fibres sérotoninergiques projetant dans la moelle épinière sont issues des noyaux du raphé localisé dans le bulbe rachidien et qui comprend trois régions: le raphe pallidus (B1), le raphe obscurus (B2) et le raphe magnus (B3) (Fig. 10) (Dahlström and Fuxe, 1964). Les terminaisons des axones sérotoninergiques ont été localisées longitudinalement dans tous les segments de la moelle épinière. Dans un plan coronal, les fibres issues des neurones du raphe magnus projettent essentiellement dans la corne dorsale (couches I et II), tandis que celles issues du raphe obscurus et pallidus projettent surtout dans les couches ventrales (VIII et IX), sur ou très près des motoneurones et dans la zone intermédiolatérale (Bowker et al., 1982; Skagerberg and Björklund, 1985).



Il existe deux grands types de récepteurs membranaires sérotoninergiques: d'une part les récepteurs couplés à des protéines G (métabotropiques) qui modulent les activités cellulaires via la production d'un second messenger et d'autre part un récepteur de type canal ionique (ionotropique) qui dépolarise rapidement la cellule en permettant le passage des cations. Actuellement, les récepteurs sérotoninergiques sont divisés en 7 groupes, eux-mêmes subdivisés en 15 sous-groupes dont certains ont été particulièrement impliqués dans la modulation de la douleur (voir revue [Bardin, 2011](#)). Parmi eux, le récepteur 5-HT_{2A} va nous intéresser plus particulièrement. Ce récepteur est un récepteur métabotropique couplé à une protéine Gq-11 ([Hannon and Hoyer, 2008](#)). Son activation par la sérotonine entraîne celle de la phospholipase C (PLC) qui hydrolyse le phosphatidylinositol-diphosphate (PIP₂) membranaire. L'inositol triphosphate (IP₃) alors produit, déclenche la mobilisation des stocks de calcium cellulaire. Le calcium et le diacylglycérol (DAG) vont entraîner à leur tour l'activation de cPKCs (**Fig. 11**). Ce récepteur est situé majoritairement sur des interneurons de type excitateur ([Wang et al., 2009](#)) et est localisé principalement dans la couche III de la CDS ([Doly et al., 2004](#)) et du Sp5C ([Fay and Kubin, 2000](#)).



3.3.2 Le rôle de la sérotonine et des récepteurs 5-HT_{2A} dans la douleur

La 5-HT a un effet extrêmement complexe sur la douleur. Au niveau du système nerveux périphérique, elle est libérée par les mastocytes, les plaquettes et les cellules endothéliales (chromaffines) en réponse à une lésion, et elle aurait plutôt un rôle pronociceptif (pour revue [Bardin, 2011](#)). En revanche, au niveau du système nerveux central, la 5-HT va être parfois pronociceptive ou au contraire antinociceptive. Par exemple, une stimulation électrique du raphé magnus va avoir un effet antinociceptif dans différents modèles de douleur aiguë ou chronique ([Le Bars, 1988 ; Yaksh, 1999](#)). A l'inverse, la diminution de la 5-HT, due à la suppression de son transporteur sur des souris knock-out 5-HTT^{-/-}, va provoquer une augmentation de l'allodynie mécanique sur un modèle de douleur neuropathique ([Vogel et al., 2003](#)). La sérotonine a donc, dans ce cas, un effet pronociceptif. De nombreuses autres études ont été réalisées depuis maintenant plusieurs années ([Bardin, 2011](#)) et lèvent le voile sur toute la complexité des effets de la sérotonine sur la douleur. Ces effets vont varier en fonction 1) de la localisation de la lésion (système nerveux central ou périphérique), 2) du modèle utilisé (modèle de douleur inflammatoire, ou neuropathique par exemple), 3) de la région étudiée (céphalique ou extracéphalique) ou encore 4) des récepteurs activés via l'utilisation d'agonistes ou d'antagonistes plus ou moins spécifiques.

Parmi les récepteurs à la 5-HT, les récepteurs 5-HT_{2A} jouent un rôle majeur dans la modulation de la douleur, même si des effets contradictoires ont aussi été observés. Par exemple, l'utilisation d'un agoniste des récepteurs 5-HT_{2A/2C} induit un effet antinociceptif sur des rats qui ont subi une ligature du nerf sciatique ([Obata et al., 2001, 2002](#)) ou sur des rats atteints de neuropathie diabétique ([Pichon et al., 2010](#)), tandis que ce même agoniste va avoir un effet pronociceptif après injection de formaline dans la patte ([Kjørsvik et al., 2001](#)). De même, l'activation du récepteur 5-HT_{2A} par la 5-HT endogène supprime l'hyperalgie mécanique induite par l'injection de carragénine chez le rat ([Wattiez et al., 2013](#)), alors qu'une injection épidurale d'un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A}, inhibe l'hyperalgésie mécanique chez des rats neuropathiques ([Van Steenwinckel et al., 2008; Thibault et al., 2008](#)). En ce qui concerne l'allodynie, les souris invalidées pour le récepteur 5-HT_{2A} ne développent pas d'allodynie après injection de formaline dans la patte ([Kayser et al., 2007](#)) , et, une injection épidurale d'un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A} inhibe l'allodynie chez des rats neuropathiques ([Van Steenwinckel et al., 2008; Thibault et al., 2008](#)). Dans ces exemples, le récepteur 5-HT_{2A} exerce alors une action pro-algique.

Enfin, sur des lésions périphériques localisées dans la région orofaciale, leur activation a un effet plutôt pronociceptif (Okamoto et al., 2005, 2006).

Au niveau central, l'existence de ces récepteurs dans le Sp5C a bien été observée (Fay and Kubin, 2000), et la seule étude qui se soit intéressée à leur implication dans les douleurs orofaciales a montré que l'administration intracisternale de DOI (agoniste non spécifique des récepteurs 5-HT_{2A}) chez des rats ayant reçu une injection de formaline dans le muscle masséter, diminuait leur comportement douloureux (Okamoto et al., 2007).

3.3.3 La maturation des voies descendantes sérotoninergiques et des récepteurs 5-HT_{2A}

Chez le rongeur, les neurones qui expriment la 5-HT sont parmi les premiers à être formés pendant le développement et apparaissent avant l'établissement des synapses excitatrices glutamatergiques (Gaspar et al., 2003; Tanaka et al., 2006). On trouve les premiers corps cellulaires qui expriment la 5-HT entre E11 et E15 (Altman and Bayer, 1980a, 1980b). Les voies descendantes apparaissent ensuite progressivement et subissent de profonds remaniements pendant les stades embryonnaires, mais également pendant les premières semaines postnatales. Les premières fibres descendantes sérotoninergiques sont détectées dans la substance blanche de la moelle épinière cervicale autour de E13-E14, au niveau des segments lombaires rostraux vers E14/E15 et caudaux à la naissance (Lakke, 1997). Dans la substance grise, les premiers axones des voies descendantes sont visualisés d'abord dans la corne ventrale vers E16/E17, puis dans la corne dorsale à la naissance (Ballion et al., 2002; Bregman, 1987; Rajaofetra et al., 1989). Environ 10 jours après la naissance, l'innervation sérotoninergique est déjà dense mais elle continue d'augmenter pour atteindre une organisation et un degré d'expression adulte autour de 21 jours postnataux.

Même si à ce jour, aucune étude ne s'est intéressée au développement des récepteurs 5-HT_{2A} spécifiquement dans le Sp5C ou la CDS, l'ARN messager (ARNm) qui code pour ce récepteur est retrouvé dès la naissance en faible quantité dans les noyaux moteurs orofaciaux et en grande quantité dans la corne ventrale cervicale (Volgin et al., 2003). Puis, l'expression de l'ARNm va évoluer différemment selon la région : elle va augmenter au niveau des noyaux moteurs et diminuer au niveau spinal.

IV. *Le développement phénotypique, morphologique et physiologique des neurones des couches superficielles de la corne dorsale*

Une fois détectés en périphérie, l'information sensorielle est acheminée vers les neurones de la CDS ou du complexe sensitif du trijumeau. Ces neurones d'une formidable hétérogénéité peuvent être caractérisés selon un certain nombre de critères (pour revue [Cordero-Erausquin et al., 2016](#)).

Cette dernière partie du chapitre 1 sera consacrée aux différentes caractéristiques génétiques et neurochimiques, morphologiques et électrophysiologiques de ces neurones ainsi qu'à leur évolution au cours du développement.

4.1. Le développement phénotypique des interneurones de la corne dorsale

4.1.1 Une origine génétique

La spécificité des neurones de la CDS est déterminée par plusieurs facteurs de transcription jouant un rôle indéniable durant l'embryogenèse (**Fig. 12A**). Au commencement, des progéniteurs exprimant le facteur de transcription Olig3 (Olig3+) vont donner naissance aux neurones de classe A. D'autres, n'exprimant pas Olig3 (Olig3-) donneront naissance aux neurones de classe B, qui ont la particularité d'exprimer le gène Lbx1. Les neurones de classes A expriment la protéine Tlx3 (*T-cell leukemia homeobox 3*), un récepteur nucléaire indispensable au développement des neurones excitateurs glutamatergiques. En effet, la famille Tlx joue un rôle majeur dans la prolifération ou le maintien en leur état des cellules souches neurales, y compris chez l'adulte, et ceci en réprimant leur différenciation vers un phénotype glial ([Shi et al., 2004](#)).

Les neurones de classes A sont dépendants des signaux émis par la plaque du toit (i.e, les BMPs). Les neurones de classe B, quant à eux, sont indépendants de ces signaux. Ils sont divisés en neurones excitateurs et inhibiteurs. Les neurones programmés pour devenir excitateurs expriment Tlx3 qui antagonise le gène Lbx1 et favorise la différenciation de ces neurones en neurones excitateurs glutamatergiques. En revanche, l'autre population de neurones qui deviendra inhibitrice exprime le gène homéobox Pax2 (*Paired box gene 2*) ([Cheng et al., 2004](#); [Xu et al., 2013](#)).

Au total, 8 populations distinctes d'interneurones vont dériver de ces deux classes A et B (**Fig. 12B**): les interneurones de la corne dorsale (dI) dI1, dI2 et dI3 dériveront de la classe A, tandis

que les dI4, dI5, dI6 et les interneurons au développement tardif (dIL) dILA et dILB dériveront de la classe B (Xu et al., 2013, pour revue Helms and Johnson, 2003).

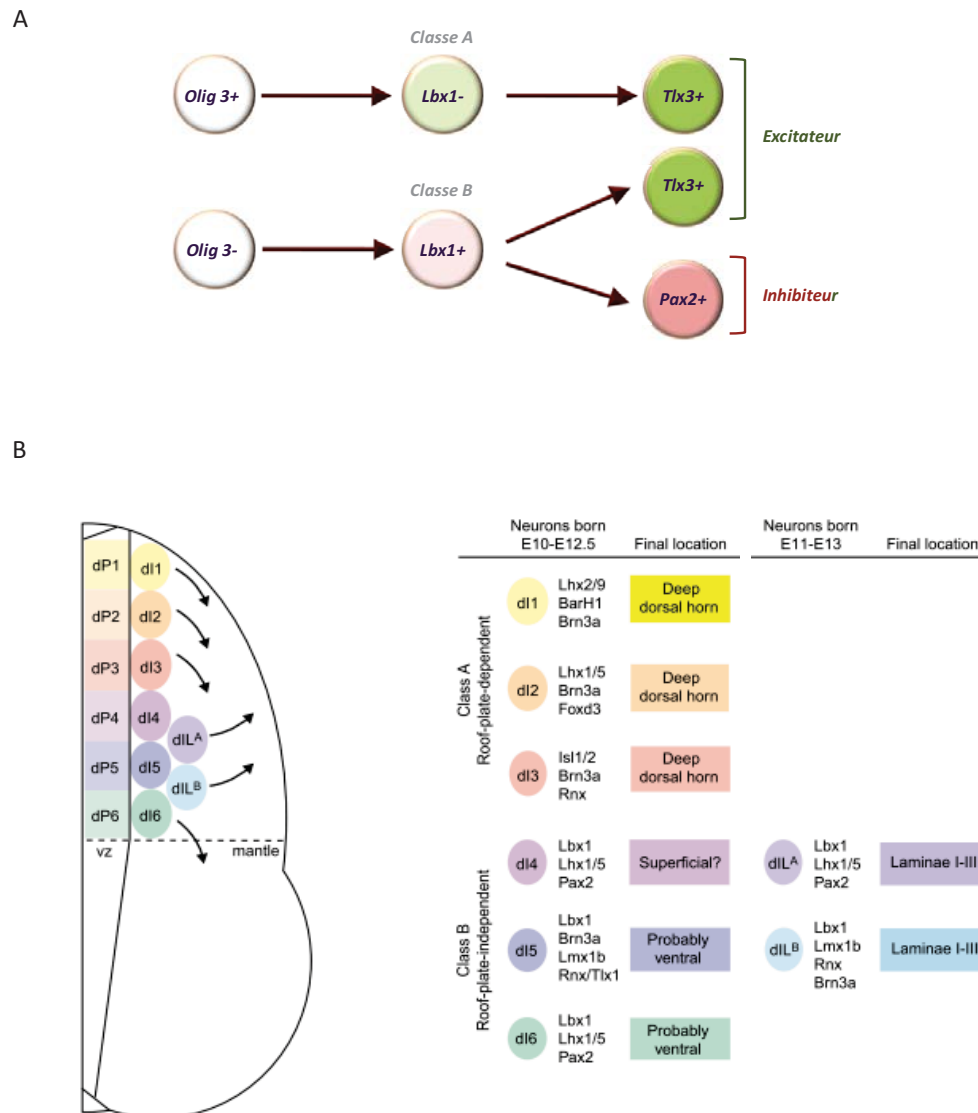


Figure 12 : L'origine génétique des neurones de la corne dorsale spinale. **A**, Représentation schématique du développement des différents sous-types de neurones de la corne dorsale spinale (Inspirée et adaptée de Xu et al, 2013). **B**, Les huit populations d'interneurones au sein du tube neural dorsal. Ces interneurons se distinguent par l'expression de différents marqueurs, l'origine de leurs progéniteurs, leur dépendance ou non au signaux de la plaque du toit, leur date de naissance et leur localisation finale (Adaptée de Helms and Johnson, 2003) Abréviations : dP, progéniteurs, dI, interneurons de la corne dorsale, dIL, interneurons à développement retardé, VZ, zone ventrale

Les différentes sous-populations d'interneurones localisées dans les couches superficielles de la CDS sont donc identifiées par l'expression de marqueurs génétiques spécifiques, mais aussi par l'expression de marqueurs neurochimiques (Gutierrez-Mecinas et al., 2016). Parmi eux, certains ont été impliqués plus spécifiquement dans la douleur. Nous nous intéresserons dans un premier temps aux interneurones inhibiteurs puis à une population d'interneurones excitateurs, les interneurones exprimant l'isoforme γ de la protéine kinase C (PKC γ).

4.1.2 Les interneurones inhibiteurs

4.1.2.1 *Caractérisation des interneurones inhibiteurs*

a. Généralités

Comme mentionné précédemment, les interneurones inhibiteurs sont issus des neurones de classe B exprimant Lbx1 et Pax2 (Fig. 12) (Bröhl et al., 2008). Ils peuvent exprimer les deux neurotransmetteurs principaux impliqués dans la transmission inhibitrice : l'acide gamma-aminobutyric (GABA) et la glycine. L'utilisation d'anticorps dirigés contre ces deux acide-aminés a permis de mettre en évidence la proportion de neurones GABAergiques et glycinergiques dans la CDS. Ainsi, chez le rat, les neurones GABAergiques sont présents dans les couches I (~25%), II (~20-30%) et III (~40 %). La glycine, quant à elle, est présente en grande quantité dans les neurones de la couche III (~30%) et en moindre quantité dans les couches superficielles I (~10%) et II (~15%). Toutefois, quelle que soit la couche, la glycine est souvent présente conjointement avec le GABA, suggérant que la majorité des interneurones inhibiteurs co-libèrent le GABA et la glycine (Polgár et al., 2003; Todd and Sullivan, 1990; pour revue Todd, 2010).

Chez l'adulte, les interneurones inhibiteurs sont activés par les trois types de fibres A β , A δ et C. Les interneurones purement glycinergiques ou mixtes (GABA/Glycine) sont préférentiellement contactés par les afférences myélinisées de petit diamètre et à bas seuil, tandis que les interneurones GABAergiques sont majoritairement contactés par des fibres myélinisées et non-myélinisées (Narikawa et al., 2000; pour revue Zeilhofer et al., 2012). Cependant, l'activation des interneurones GABAergiques par les fibres C non-myélinisées ne veut pas forcément dire que ceux-ci sont activés par une stimulation nociceptive. En effet, il a été montré que certains neurones GABAergiques sont contactés par des fibres-C à bas seuil, vectrices des messages tactiles agréables (Grudt and Perl, 2002; Löken et al., 2009; Yasaka et al., 2007).

En plus de recevoir des contacts synaptiques en provenance des afférences primaires, les interneurons inhibiteurs sont également contactés par des fibres descendantes issues de structures supra-spinales, qui libèrent par exemple de la noradrénaline ou de la sérotonine (pour revue [Zeilhofer et al., 2012](#)).

Sur le plan neurochimique, les interneurons inhibiteurs sont hétérogènes. En effet, en plus d'être GABAergiques et/ou glycinergique, ils peuvent également exprimer d'autres marqueurs neurochimiques comme le neuropeptide Y (NPY), le nNOS (oxyde nitrique synthase neuronal), la parvalbumine, l'énképhaline, la galanine et la dynorphine. Contrairement aux peptides contenus dans les interneurons excitateurs dont nous parlerons plus bas, le NPY, la parvalbumine, le nNOS et la galanine/dynorphine ne colocalisent pas au sein des interneurons inhibiteurs ([Kardon et al., 2014](#); [Polgár et al., 2013](#); [Sardella et al., 2011](#)).

b. Les récepteurs GABA_AR et GlyR

Le récepteur GABA_A (GABAR) est un pentamère formé d'un répertoire de 19 sous-unités ($\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, δ , ϵ , π , θ , et $\rho 1-3$) qui délimitent un canal perméable préférentiellement aux ions Cl⁻, au bicarbonate et accessoirement aux ions Br⁻. En plus des sites de fixation au GABA, le GABA_AR comporte d'autres sites secondaires pour des molécules modulatrices de l'effet du GABA telles que la picrotoxine, la bicuculline, la gabazine, les benzodiazépines, ou encore l'alcool (pour revue, [Zeilhofer et al., 2012](#)). L'étude du profil d'expression des différentes sous-unités du récepteur GABA_AR dans la moelle épinière montre que, chez l'adulte, les sous-unités $\alpha 2$ et $\alpha 3$ sont particulièrement abondantes dans les couches superficielles de la CDS ([Zeilhofer et al., 2012](#)).

Comme le récepteur GABA_AR, le récepteur glycinergique (GlyR) est un récepteur pentamérique perméable au Cl⁻. Mais sa composition en sous-unité n'est pas aussi pléthorique que celle des GABA_AR puisque les GlyR sont composés de seulement 4 sous-unités α ($\alpha 1-4$) et d'une sous-unité β . En plus de la glycine, les GlyR peuvent fixer la strychnine et la taurine ([Zeilhofer et al., 2012](#)). Si le GABA_AR est un récepteur ubiquitaire du SNC, le GlyR a une distribution plus restreinte. Toutefois, il est retrouvé en grande quantité dans les cornes ventrales et dorsale de la moelle épinière, et dans plusieurs noyaux du tronc cérébral incluant le noyau trigéminal ([Zeilhofer et al., 2012](#)).

c. Le rôle des interneurons inhibiteurs dans la douleur

Melzack et Wall (1965), par leurs travaux sur le « Gate control », ont été les premiers à poser l'hypothèse que les systèmes inhibiteurs jouaient un rôle pivot dans la modulation de la douleur. Les messages douloureux qui transitent par cette porte peuvent être augmentés ou réduits. Par exemple, la mise en jeu des afférences de gros diamètre A β par l'application de stimulations tactile, inhibe la douleur en augmentant l'activité des interneurons inhibiteurs localisés dans la couche II de la CDS. En revanche, la perturbation de ces contrôles inhibiteurs peut conduire au développement de symptômes douloureux chroniques. Plusieurs études ont montré que des symptômes douloureux associés aux douleurs neuropathiques, tels que les douleurs spontanées ou l'allodynie, sont dus en partie à un dysfonctionnement des contrôles inhibiteurs segmentaires au sein de la CDS (Castro-Lopes et al., 1993; Moore et al., 2002). En effet, le blocage des contrôles GABAergiques et/ou glycinergiques dans la CDS ou le Sp5C entraîne l'expression d'une allodynie mécanique (Miraucourt et al., 2007, 2009; Sherman and Loomis, 1996; Yaksh, 1989). Dans ces études, la désinhibition glycinergique et/ou GABAergique permet aux informations tactiles véhiculées par les fibres A β de pouvoir accéder aux circuits de la douleur, et la transformation d'un tact en douleur (allodynie). Plus récemment, l'équipe de Réza Sharif-Naeini a montré que l'ablation sélective des interneurons inhibiteurs exprimant la parvalbumin entraîne une allodynie mécanique (Petitjean et al., 2015).

4.1.2.2 *La maturation de l'inhibition*

a. Le développement des interneurons inhibiteurs

Dans les couches superficielles, le GABA est détecté tardivement au stade embryonnaire, à partir de E17-18 (Ma et al., 1993). Puis le nombre de neurones GABAergiques augmente au cours des deux premières semaines postnatales (50 % de la totalité des neurones) puis diminue à la troisième semaine postnatale (Schaffner et al., 1993). Le patron d'expression de la glycine est, quant à lui, mature bien avant la naissance et coïncide avec celui de ses transporteurs GlyT1 et GlyT2 (Berki et al., 1995; Poyatos et al., 1997; Zafra et al., 1995). A E13 chez la souris, le niveau de glycine est plus élevé que le GABA indiquant une forte abondance des interneurons glycinergiques au stade embryonnaire (Miranda-Contreras et al., 2002). Cependant, la première

semaine post-natale correspond à une période de perte massive des synapses glycinergiques (Miranda-Contreras et al., 2002).

Enfin, comme nous l'avons vu précédemment, environ la moitié des neurones exprimant le GABA expriment également la glycine, et ceci dès les stades précoces puisque la proportion de neurones co-exprimant GABA/glycine semble rester stable tout au long du développement (Todd and Sullivan, 1990 ; Berki et al., 1995).

b. Les récepteurs GABA_AR et GlyR au cours du développement

Dans la corne dorsale le profil d'expression de sous-unités des récepteurs est différent aux stades précoces par rapport à l'adulte. En particulier, l'ensemble des sous-unités du récepteur GABA_A apparaissent à partir de E13 puis vont progressivement se développer selon un gradient ventro-dorsal, pour atteindre un pic d'expression à la première semaine postnatale (Ma et al., 1993). Puis l'expression des sous-unités $\alpha 4-5$, $\beta 1-2$, et $\gamma 1-3$ va progressivement diminuer en période postnatale pour ne devenir qu'à peine détectable chez l'adulte. Seul l'ARNm de la sous-unité $\alpha 6$ est absent de la moelle épinière, quelle que soit la période développementale. Au niveau du DRG, les sous-unités $\alpha 2-3-5$, $\beta 2-3$ et $\gamma 2$ sont présentes au stade embryonnaire tandis que chez l'adulte, on ne retrouve que les sous-unités $\alpha 2$, $\beta 3$ et $\gamma 2$ (Ma et al., 1993). Concernant le récepteur GlyR, ils sont majoritairement composés d'hétéromères $\alpha 1/\beta$ chez l'adulte, tandis que les GlyR immatures sont constitués d'homomères $\alpha 2$. Malgré leur présence à la naissance, les récepteurs glycinergiques ne sont pas fonctionnels avant la fin de la première semaine postnatale (Baccei and Fitzgerald, 2004). Ainsi, au stade précoce, l'activité des récepteurs GABAergiques domine sur celle des récepteurs glycinergiques.

c. Développement du gradient chlorure

Dans le SNC de l'adulte, l'ouverture des GABAR et des GlyR entraîne un flux d'ions Cl^- à l'intérieur de la cellule, diminuant ainsi le gradient électrochimique en faveur d'une hyperpolarisation de la membrane plasmique. En période néonatale, le transporteur KCC2 au Cl^- est sous-exprimé. Son action de pompage du Cl^- en dehors de la cellule ne se fait pas, ce qui a pour conséquence une accumulation du Cl^- dans la cellule : l'activation des GABAR entraîne une sortie de Cl^- et donc une dépolarisation suffisante de la cellule pour activer les récepteurs NMDA

(pour revue [Fiumelli and Woodin, 2007](#)). Ceci a pour conséquence de faciliter l'activité spontanée caractéristique des structures en développement, de favoriser la neurogenèse, la migration neuronale, la synaptogenèse et l'élagage de l'arborisation ([Fiumelli and Woodin, 2007](#)). L'expression de KCC2 apparaît 10 jours après la naissance dans la corne dorsale superficielle, et atteint un niveau adulte à 3 semaines ([Harrop E and Fitzgerald, unpublished data](#)). Cette *upregulation* de KCC2, entraîne une sortie du Cl⁻ et donc un shift du potentiel d'inversion du Cl⁻ : le GABA devient inhibiteur. Il est intéressant de noter que, même si le shift du gradient chlore se fait à la fin de la première semaine postnatale chez le rat, la capacité optimale d'extrusion du chlore observée chez les adultes n'est pas atteinte avant la troisième semaine postnatale ([Cordero-Erausquin et al., 2005](#)). Ainsi, il semble clair que chez le jeune, l'action desinhibitrice des interneurones GABAergiques contribue à augmenter la sensibilité.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les GlyR ne sont pas fonctionnels en période néonatale ([Baccei and Fitzgerald, 2004](#)). En 2012, l'équipe de Maria Fitzgerald confirme ces résultats en montrant dans une élégante étude que les contrôles glycinergiques sont loin d'être fonctionnels chez le nouveau-né ([Koch et al., 2012](#)). En effet, ils apparaissent dans la CDS seulement à la deuxième semaine de vie, et leur maturation est dépendante de l'activation des afférences sensorielles de type C. Le blocage sélectif de ces fibres entraîne un retard de maturation à la fois des sous-unités GlyR, mais aussi de l'inhibition glycinergique. Dans ces conditions, la CDS est maintenue dans un état immature où les réponses tactiles sont facilitées ([Koch et al., 2012](#)).

4.1.3 Les interneurones excitateurs : cas des interneurones PKC γ

Les interneurones excitateurs représentent la majorité des neurones des couches superficielles de la corne dorsale. Ils sont issus des neurones des classes A et B exprimant le gène de transcription Tlx3 (**Fig. 12**). Différentes sous-populations d'interneurones excitateurs sont aussi identifiées dans les couches les plus superficielles (I-II), grâce à l'expression de marqueurs neurochimiques. Ainsi, certains interneurones exciteurs expriment la somatostatine, la neurotensine, la neurokinine B, le gastrin-releasing peptide (GRP) la calbindine ou encore la protéine kinase C γ (PKC γ) (**Table 2**, [Gutierrez-Mecinas et al., 2016](#); [Polgár et al., 1999](#)). Contrairement aux interneurones inhibiteurs dans lesquels les peptides ne colocalisent pas ([Bröhl](#)

et al., 2008; Polgár et al., 2013), les interneurones excitateurs peuvent contenir plusieurs peptides dans une seule cellule.

Parmi les interneurones qui expriment plusieurs marqueurs, certains ont été impliqués plus spécifiquement dans les circuits nociceptifs. Une attention toute particulière sera portée aux interneurones qui expriment la PKC γ .

Table 2-Les différentes populations d'interneurones excitateurs en LI-II (Glutamatergiques)

	<i>Somatostatin</i>	<i>Neurotensin</i>	<i>Neurokinin B</i>	<i>GRP</i>	<i>Calbindin / Calretinin</i>	<i>PKCγ</i>
<i>Somatostatin (43,8%)</i>		9.5	20.6	15.4	52.7	34.6
<i>Neurotensin (6,7%)</i>	73.4		12.6	1.7	–	96.8
<i>Neurokinin B (11,6%)</i>	90.5	5.7		0	–	60.3
<i>Gastrin-releasing peptide (GRP) (11%)</i>	59	1.5	0		–	
<i>Calbindin / Calretinin</i>	67	–	–	–		–
<i>PKCγ (21%)</i>	74.2	31.7	31.3		–	
<i>Substance P</i>						

Signifie : "dans les neurones *Somatostatin*+, 34,6% sont *PKC γ* +" et "dans les neurones *PKC γ* +, 74,2% sont *Somatostatin*+"

Les chiffres entre-parenthèses dans la colonne de gauche indiquent le pourcentage de neurones exprimant le marqueur correspondant par rapport à la population totale

4.1.3.1 Caractérisation de la PKC γ

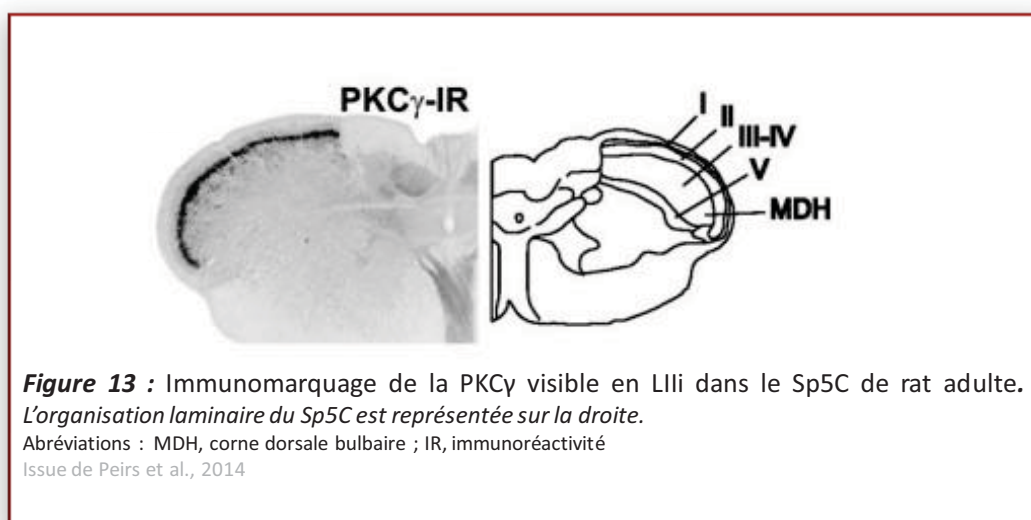
a. Voie d'activation de la PKC γ

La PKC γ fait partie des PKCs conventionnelles (cPKCs), au même titre que les isoformes α , β I, et β II. Elles ont besoin de calcium et de diacylglycerol (DAG) pour être activées en présence de phosphatidyl sérine. L'activation de ces kinases passe par le recrutement de récepteurs métabotropiques, qui peuvent ensuite activer plusieurs voies de signalisation, comme les voies des phospholipases C (PLC), ou D ou A2 (Codazzi et al., 2006). Pour activer la PKC γ via la voie des PLC, il est donc nécessaire qu'un ligand se fixe sur le récepteur métabotrope puis active une protéine G intracellulaire. Comme lors de l'activation des récepteurs 5-HT_{2A}, il va y avoir formation d'un complexe protéique avec la Guanosine Triphosphate (GTP) qui va à son tour activer la PLC. Celle-ci hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP₂)

membranaire pour donner du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol triphosphate (IP3). L'IP3 interagit avec un récepteur spécifique de la membrane du réticulum endoplasmique, déclenchant la mobilisation des stocks de calcium cellulaire. Le calcium interagit avec le DAG pour activer la cPKC, qui en réponse à son activation, va migrer du cytoplasme vers la membrane plasmique où elle sera accrochée par une protéine d'encrage. Cette translocation permet à l'enzyme d'acquérir sa compétence catalytique (Parekh et al., 2000).

b. Localisation des interneurones PKC γ

A l'instar de l'ensemble des PKCs conventionnelles, les neurones qui expriment la PKC γ sont largement représentés dans le tissu nerveux (Saito and Shirai, 2002; Tanaka and Saito, 1992). Son expression est particulièrement abondante dans les neurones du néocortex, du thalamus, de l'amygdale, du noyau cochléaire, dans les cellules pyramidales de l'hippocampe et les cellules de Purkinje du cervelet (Kose et al., 1990; Tanaka and Saito, 1992). Dans la CDS et le Sp5C, les neurones PKC γ sont majoritairement situés dans les couches III et IIIe (Martin et al., 1999; **Fig. 13**), tandis que la kinase est faiblement présente dans les couches I et IIe (Tanaka and Saito, 1992 ; Polgàr 1999; Peirs et al., 2014). La PKC γ est localisée exclusivement dans les neurones (Mori et al., 1990; Narita et al., 2004) et on la retrouve en post-synaptique dans le cytoplasme, le noyau, les épines dendritiques, et aussi dans les axones et les terminaisons post-synaptiques (Kose et al., 1990 ; Tanaka and Saito, 1992 ; Mori et al., 1990).



c. Neurochimie des interneurons PKC γ dans la corne dorsale

Les interneurons PKC γ sont pour la grande majorité des interneurons excitateurs exprimant le transporteur au glutamate vGluT2 (Punnakkal et al., 2014). Ils représentent 21% des neurones des couches I et II (Gutierrez-Mecinas et al., 2016). L'analyse du phénotype montre que dans la couche II de la CDS, seuls 8,4% sont de types GABAergiques (Polgàr et al., 1999) et qu'ils n'expriment ni la glycine, ni la dynorphine (Gardell et al., 2004), ni la parvalbumine (Martin et al., 1999). En revanche, la majorité de ces interneurons PKC γ sont immunoréactifs à la somatostatine, et près d'un tiers sont immunoréactifs à la neurotensine et à la neurokinin B (Table 2, Gutierrez-Mecinas et al., 2016). D'après Hugues et collaborateurs, ils sont également immunopositifs pour la calbindine (25%) et quelques neurones expriment également la nNOS (11%) (Hughes et al., 2008). Certains récepteurs ont également été identifiés au niveau des interneurons PKC γ dont les récepteurs glycinergiques (Miraucourt et al., 2007; Peirs et al., 2014) et GABAergiques (Peirs et al., 2014), et 55% des neurones expriment les récepteurs au glutamate GluR2-3 (Hughes et al., 2008). Dans la couche I, 22% des interneurons PKC γ présents sont des neurones de projection qui expriment le récepteur NK1 (Polgàr et al., 1999), et la majorité émettent des prolongements vers le thalamus (Li et al., 2001). Enfin, les interneurons PKC γ sont contactés par des afférences myélinisées de type A β exprimant le transporteur vGLUT1 (Neumann et al., 2008; Lu et al., 2013; Peirs et al., 2014), mais pas par des terminaisons nociceptives amyéliniques (Peirs et al., 2014 ; Neumann et al., 2008). Au niveau de la couche III, les interneurons PKC γ peuvent également communiquer entre eux (Neumann et al., 2008).

d. Implications des interneurons PKC γ dans l'allodynie

L'implication de la PKC γ dans la nociception a été démontrée dans de nombreuses études utilisant différents modèles de douleur, comme les douleurs neuropathiques ou inflammatoires (Gardell et al., 2004; Malmberg et al., 1997a; Martin et al., 2001; Ohsawa et al., 2001; Wang et al., 2004; Zhao et al., 2011). Dans ces études, une lésion du nerf sciatique (Labombarda et al., 2008; Mao et al., 1995; Miletic et al., 2000), du nerf infraorbitaire (Nakajima et al., 2011), ou encore une inflammation (Complete Freund's Adjuvant, Cheng et al., 2008; Honore et al., 2000; Martin et al., 1999) provoquent une surexpression de la PKC γ ainsi que l'apparition d'une hyperalgésie et/ou d'une allodynie. Martin et collaborateurs ont montré en

2001 dans un modèle de douleur inflammatoire que les interneurons PKC γ sont impliqués dans le maintien de l'allodynie via l'activation des récepteurs NMDA (Martin et al., 2001). Aussi, le développement de souris neuropathiques déficientes en PKC γ a permis de montrer que l'allodynie mécanique est nettement diminuée par rapport aux souris sauvages (Malmberg et al., 1997). De plus, l'injection intrathécale d'un inhibiteur spécifique de la PKC γ (KIG31-1 ou γ V5-3) atténue le comportement douloureux induit par une injection de formol dans la patte (Sweitzer et al., 2004) et l'allodynie induite par une administration intrapéritonéale d'éthanol (Shumilla et al., 2005).

Au niveau céphalique, la ligature du nerf infra-orbitaire chez le rat entraîne une diminution du seuil de retrait de la tête aux stimuli mécaniques statiques, évoquant une allodynie mécanique. Elle s'accompagne aussi d'une augmentation de l'expression de la PKC γ dans le Sp5C (Nakajima et al., 2011). Par ailleurs, l'administration d'un antagoniste non-spécifique de la PKC γ (chelerythrine) réduit drastiquement l'allodynie et diminue l'expression de la PKC γ dans le Sp5C (Nakajima et al., 2011). Enfin, notre laboratoire a également mis en évidence qu'une désinhibition glycinergique (Miraucourt et al., 2007, 2009) ou GABAergique (Peirs et al., 2016) ainsi qu'une inflammation (Peirs et al., 2016) peuvent provoquer une allodynie mécanique dynamique ou statique qui s'accompagne d'une activation des interneurons PKC γ . De même, l'activation de la PKC γ dans le Sp5C semble suffisante pour le développement d'allodynie mécanique faciale (Pham-Dang et al., 2016).

Ainsi, un circuit polysynaptique entre les fibres myelinisées de type A β et les neurones nociceptifs de la couche I est activé lors d'une allodynie mécanique (Fig. 14). Dans ce circuit non fonctionnel en condition physiologique, l'information tactile est capable de se transformer en information douloureuse via l'activation des interneurons PKC γ au niveau de la couche III (Lu et al., 2013; Braz et al., 2014; Peirs et al., 2016). De plus, il semblerait que d'autres interneurons tels que les neurones qui expriment la somatostatine (Duan et al., 2014), la parvalbumine (Petitjean et al., 2015), la calrétinine (Duan et al., 2014) ou encore VGluT3 (Peirs et al., 2015) soient également impliqués.

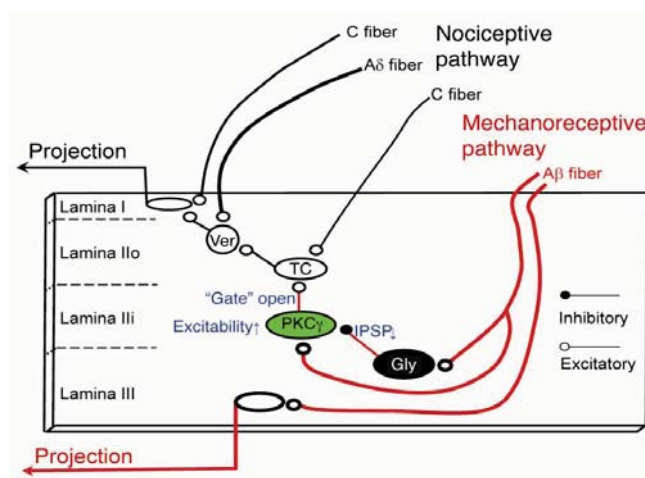


Figure 14 : La voie poly-synaptique sous-jacente de l'allodynie mécanique impliquant les interneurones PKC γ .

Abréviations : TC, Transient central ; Ver, vertical

Modifiée de Lu et al., 2013

4.1.3.2 La PKC γ au cours du développement

Les interneurones PKC γ dérivent des neurones de classe B exprimant le facteur de transcription Tlx3 (**Fig .12**) (Matise, 2002; Xu et al., 2013). Il est très intéressant de noter que la localisation des interneurones PKC γ en couche Iii chez le rongeur est dépendante de l'expression du gène Lmx1b. En effet, Szabo et collaborateurs ont récemment montré que les couches Iie et Iii sont désorganisées chez des souris dont le gène Lmx1b a été supprimé. Les couches superficielles ont une taille plus petite et le neuropile, correspondant aux prolongements des interneurones PKC γ , occupe une région plus superficielle de la CDS par rapport aux animaux contrôles (Szabo et al., 2015). De même, il a été montré en 2001 que l'expression de la PKC γ est dépendante du facteur de transcription Drg11. En effet, des souris Drg11^{-/-} n'expriment pas la PKC γ dans les interneurones de la couche Iii de la CDS, et, de manière intéressante, ont une réponse nociceptive réduite (Chen et al. 2001).

Les données concernant le développement de la PKC γ dans le Sp5C sont inexistantes, tandis qu'au niveau spinal les quelques données bibliographiques publiées sont contradictoires. Certaines études observent l'expression de la PKC γ dès les stades embryonnaires, puis constatent

une diminution progressive après la naissance (Akinori, 1998; Huang et al., 2015). Dans d'autres études, les premiers neurones exprimant la PKC γ sont observés dans la première semaine postnatale à P0 (Huang et al., 2015), P2 (Chen et al., 2001) ou P7 (Malmberg et al., 1997a, 1997b), suivi d'une augmentation de leur nombre les semaines suivantes (Sweitzer et al., 2004).

En plus d'être caractérisés par des phénotypes neurochimiques particuliers, les neurones des couches superficielles de la CDS et du Sp5C peuvent être identifiés en fonction de leur morphologie et de leurs propriétés électrophysiologiques.

4.2. *Le développement morphologique des neurones des couches superficielles*

4.2.1 La morphologie somatique et neuritique

Au début du 20^e siècle, le célèbre Ramon y Cajal a réalisé une description précise du système nerveux de l'Homme et des vertébrés (Li et al., 1999)(Ramon y Cajal, 1909). Il s'était déjà aperçu de la formidable diversité morphologique des neurones. D'abord, le soma peut être catégorisé selon sa forme sphérique, fusiforme, ou encore multipolaire (Li et al., 1999). L'organisation des neurites dans l'espace et autour du soma permet également de classer les neurones en plusieurs catégories.

Dans la couche I, quatre types d'organisation somato-dendritique ont été mises en évidence chez le rat : fusiforme, aplatie, multipolaire et pyramidal (Lima and Coimbra, 1983). Deux catégories distinctes ont été observées : les neurones avec des projections en zone ventrale et les neurones qui restent confinés à la couche I avec une arborisation qui s'étend sur l'axe rostro-caudal et/ou médio-latéral (Grudt and Perl, 2002). Il semble que les neurones fusiformes soient activés préférentiellement par des stimulations nociceptives, les multipolaires par des stimulations nociceptives et non-nociceptives et les pyramidaux par des stimulations thermiques froides (Han et al., 1998).

Dans la couche II, les somas sont dissociés selon leur forme sphérique, fusiforme ou multipolaire et l'organisation dendritique des interneurons est caractérisée par quatre principaux types (Grudt and Perl, 2002; Yasaka et al., 2010) (**Fig. 15**). Les **cellules en îlot** ont un arbre dendritique dense, s'étendant sur l'axe rostro-caudal parfois sur une distance supérieure à 600 μ m. Les cellules **radiales** ont des dendrites qui irradient dans toutes les directions tout en restant

proche du soma. La majorité des dendrites sont localisées dans les couches IIe et Iii, et 50% des cellules ont des dendrites qui atteignent la couche I (Grudt and Perl, 2002). Les cellules **centrales** ont une arborisation moins dense qui est orientée dans l'axe rostro-caudal, comme les cellules en îlot, mais sur une distance nettement moins grande. Leurs dendrites sont restreintes à la couche Iii. Enfin, les cellules **verticales** se distinguent des autres par leur arborisation qui s'oriente verticalement dans l'axe dorso-ventral. Leurs dendrites sont éparses et peuvent projeter soit en ventral par rapport au soma et contacter ainsi la couche III, soit en dorsal s'orientant alors en couche IIe. Ainsi, ces différences de morphologie suggèrent l'existence de populations neuronales au fonctionnement bien distinct. Dans leur étude, Grudt et Perl (2002) ont identifié 16% de cellules en îlot, 15% de cellules radiales, 38% de cellules centrales, et 30% de verticales. Ils ont également identifié un cinquième type de neurone très peu représenté (3%), le type **médio-latéral**, caractérisé par une plus grande arborisation en médio-latéral et dorso-ventral que les autres types cellulaires. Leurs dendrites projettent en couche I et III. Une proportion non-négligeable de neurones reste encore non-classifiée (Yasaka et al., 2010).

Les travaux de ces dernières années ont mis en évidence des corrélations entre la morphologie des neurones et les neurotransmetteurs qu'ils libèrent. Ainsi, les neurones en îlot sont plutôt GABAergique et n'expriment pas le transporteur au glutamate vGluT2. À l'inverse, les neurones excitateurs exprimant vGluT2 sont à parts égales verticaux, centraux et radiaux et aucun n'est de type îlot (Punnakkal et al., 2014). De plus, il a été montré que les neurones, selon leur morphologie, répondent différemment à certaines drogues. Par exemple, les neurones radiaux, centraux ou en îlot sont tous sensibles à la noradrénaline, tandis que la somatostatine n'a un effet que sur les cellules en îlot. Les neurones radiaux, verticaux et 1/3 des neurones en îlot sont également sensibles à la sérotonine (Yasaka et al., 2010).

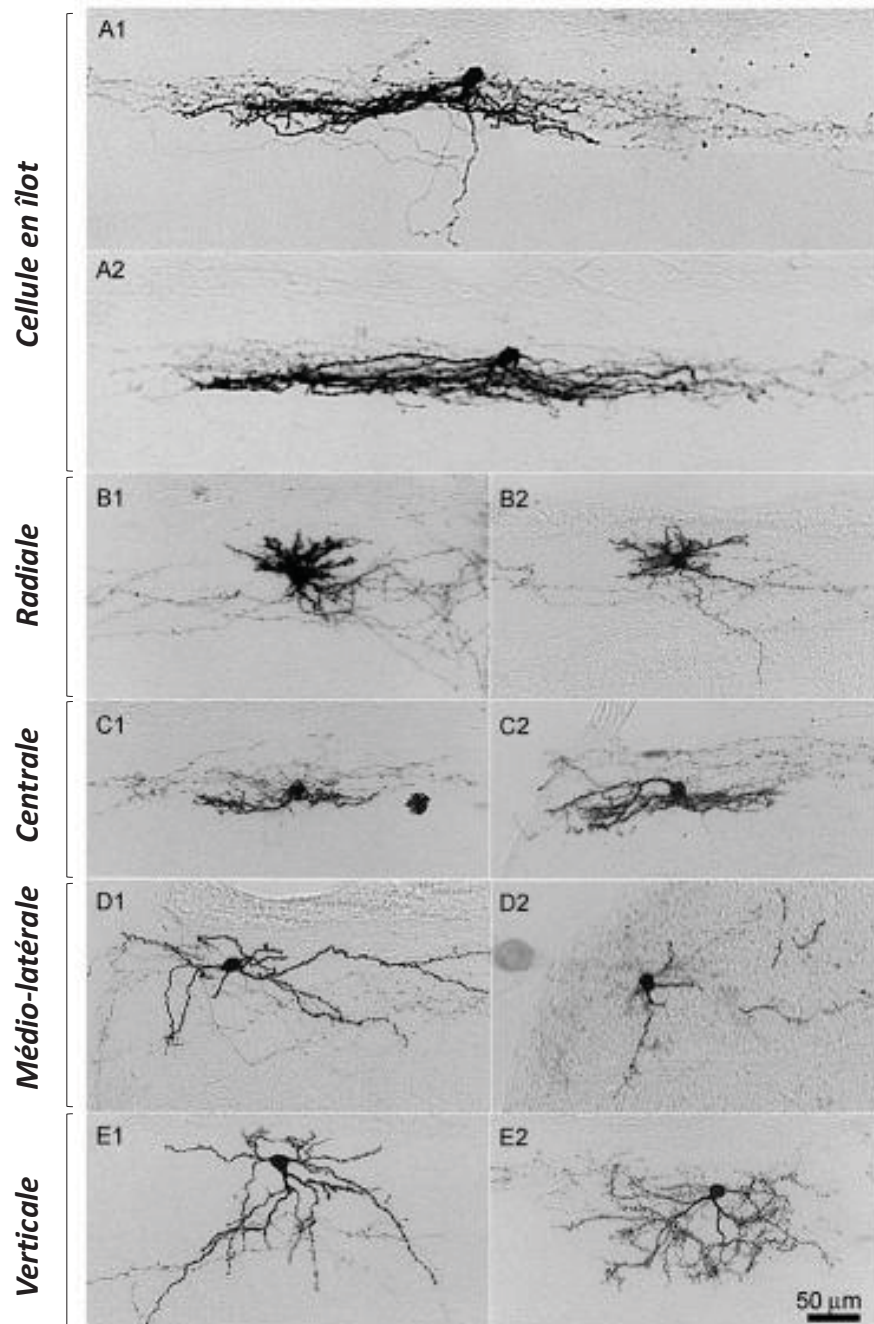


Figure 15 : Microphotographies illustrant les cinq catégories de neurones de la couche II.

Photographies tirées de Grudt and Perl (2002)

4.2.2 Le développement morphologique somatique et neuritique des neurones

Ainsi, comme nous l'avons vu précédemment, le SNC est loin d'être mature dès la naissance. D'ailleurs, les premières semaines de vie sont le terrain de profondes modifications de la morphologie des neurones du SNC. Par exemple, dans l'amygdale basolatérale, l'arborisation des neurones devient plus étendue au cours des quatre premières semaines postnatales. Leur soma augmente de volume et leurs dendrites grandissent en taille et voient émerger des épines dendritiques (Ryan et al., 2014). Dans la corne ventrale spinale, les motoneurones subissent également de nombreuses modifications morphologiques qui varient selon le type de muscle qu'ils innervent (Cameron and Núñez-Abades, 2000). Une augmentation de la longueur des branches est observée pendant le développement des motoneurones innervant les muscles des membres postérieurs, tandis que l'arborisation des motoneurones innervant les muscles des membres antérieurs va s'étendre puis se rétracter (Ulfhake et al., 1988).

Or, malgré l'intérêt grandissant pour l'étude du développement des acteurs de la douleur, seules deux études réalisées au début des années 80 dans la couche II de la CDS et du Sp5C révèlent l'existence de modifications au sein de l'arborisation dendritique, comme l'élongation des neurites au cours du développement (Bicknell and Beal, 1984; Falls and Gobel, 1979).

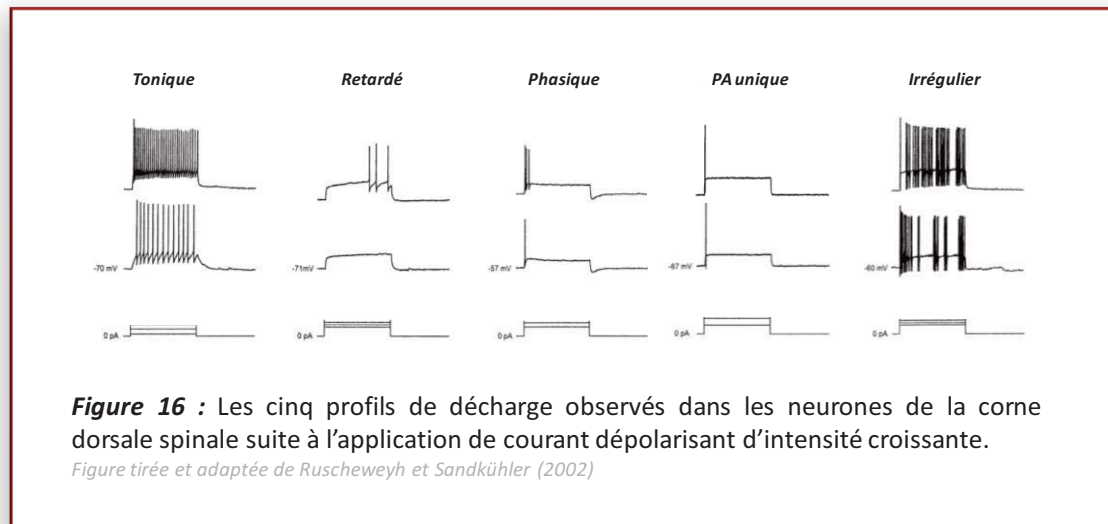
4.3. Le développement des propriétés électrophysiologiques et des courants ioniques

4.3.1 Propriétés membranaires et profils de décharge

4.3.1.1 Caractérisations

Les neurones des couches superficielles sont caractérisés physiologiquement par leurs **propriétés membranaires**. Parmi celles-ci, on distingue entre autre la résistance et la capacitance membranaire, le seuil de décharge, la rhéobase, ou encore les propriétés des potentiels d'actions. L'ensemble de ces propriétés varie en fonction de nombreux paramètres comme le lieu d'enregistrement (CDS ou Sp5C, Yasaka et al., 2007; Alba-Delgado et al., 2015), de l'espèce (rat ou souris, Yasaka et al. 2007; Punnakal et al., 2014), de la morphologie (Yasaka et al. 2007; Grudt and Perl, 2002), du phénotype des neurones enregistrés (Alba-Delgado et al. 2015; Smith et al., 2015) ou encore de la couche étudiée (Yasaka et al., 2010; Punnakal et al., 2014).

Les interneurones des couches superficielles peuvent être divisés en 5 catégories selon leur **profil de décharge** (Grudt and Perl, 2002; Ruscheweyh and Sandkühler, 2002; Yasaka et al., 2010) (**Fig. 16**).



Le profil « tonique » se caractérise par une décharge régulière de potentiels d'action tout au long de la dépolarisation. Généralement, le nombre de PA augmente avec l'intensité de la stimulation, jusqu'à l'inactivation des canaux sodiques. Le profil « retardé » (delayed) est caractérisé par un retard de réponse à la dépolarisation avec des PA survenant dans un délai de quelques millisecondes après la stimulation. D'autres neurones ont un profil de décharge « phasique » lorsqu'une stimulation dépolarisante entraîne des potentiels d'action uniquement au début de la stimulation. Enfin les neurones à « potentiel d'action unique » (single spike) ont un seul potentiel d'action quelle que soit l'intensité du stimulus dépolarisant appliqué, et les neurones « irréguliers » déclenchent des potentiels d'action de façon irrégulière. Plusieurs études ont caractérisé les profils de décharge en fonction de la localisation au sein des couches ou en fonction du type morphologique. Par exemple les neurones fusiformes de la couche I et les cellules en îlot et vertical de la couche II ont un profil de décharge de type tonique (Grudt and Perl, 2002; Prescott and De Koninck, 2002). Les cellules radiales ont des profils de décharge retardé et irrégulier (Grudt and Perl, 2002; Lu and Perl, 2005). Ces profils de décharge varient également en fonction du type neurochimique. Par exemple, les neurones inhibiteurs ont un profil de décharge tonique, tandis que les neurones excitateurs présentent plutôt un profil de décharge retardé ou un profil « gap » (Yasaka et al., 2010). Les neurones excitateurs exprimant le transporteur au glutamate vGluT2 ont un profil de décharge majoritairement retardé (66%), suivie de phasique

(24%) puis de PA unique (10%) (Punnakkal et al, 2014). Récemment, une étude a réussi à identifier deux populations d'interneurones exprimant la calrétinine selon leurs propriétés électrophysiologiques. Si l'une a plutôt un profil d'interneurone excitateur avec un profil de décharge retardé et une morphologie de type central, radial ou vertical, l'autre a plutôt un profil de neurone inhibiteur avec un profil de décharge de type tonique et une morphologie de cellule en ilot (Smith et al., 2015). De plus en plus, l'utilisation des outils génétiques permet de discriminer le phénotype neurochimique des neurones impliqués dans les circuits de la douleur (Duan et al., 2014; Petitjean et al., 2015) puis de caractériser spécifiquement leurs propriétés électrophysiologiques et/ou morphologiques.

4.3.1.2 *Evolution développementale des propriétés électrophysiologiques*

Peu d'études se sont intéressées au développement des propriétés électrophysiologiques des neurones des couches superficielles de la CDS et du Sp5C. Vers la fin des années 90, deux études ont suggéré que les neurones de la CDS du nouveau-né sont plus excitables que leurs homologues chez l'adulte (Falcon et al., 1996; Jennings and Fitzgerald, 1998). En 2005, Baccei et Fitzgerald énoncent que les propriétés de décharge des neurones de la CDS chez le rat nouveau-né ne sont pas différentes de celles de l'adulte (Baccei and Fitzgerald, 2005). Par la suite, il a été montré chez la souris qu'en période néonatale les neurones des couches superficielles de la CDS ont un profil de décharge en PA unique qui va disparaître progressivement au cours du développement pour laisser place à des décharges de types phasique et tonique. En période périnatale, les neurones sont dépolarisés, avec un potentiel de repos proche de -60mV contre -70mV chez l'adulte, ils ont également des PA plus larges et moins amples, ainsi qu'une résistance d'entrée plus importante (Tadros et al., 2012; Walsh et al., 2009). D'après Walsh et collaborateurs, les propriétés électrophysiologiques des interneurones de la CDS évoluent jusqu'à une période critique correspondant à la deuxième semaine postnatale. A cette période, la majorité des propriétés électrophysiologiques des interneurones spinaux sont matures (Walsh et al., 2009).

4.3.2 Les courants ioniques

4.3.2.1 *Les courants I_h et les courants I_A*

Les neurones des couches superficielles sont également capables d'exprimer différents courants comme les courants rectifiants activés par une hyperpolarisation (ou I_h ; Smith et al.,

2015) et des courants potassique de type A (Grudt and Perl, 2002). Les courants I_h sont médiés par l'activation des canaux HCN qui présentent 4 isoformes, de HCN1 à HCN4 (pour revue Bender and Baram, 2008; Bender et al., 2001; Seo et al., 2015). Les canaux Kv4.2 et Kv4.3, quant à eux, génèrent les courants I_A (pour revue Hu et al., 2006) et sont exprimés dans les neurones des couches superficielles par exemple les neurones à calrétinine (Huang et al., 2005).

4.3.2.2 *Evolution développementale des courants ioniques*

Chez la souris, les neurones sensoriels spinaux ne sont pas capables d'avoir de courant I_h avant la deuxième semaine postnatale, et la proportion de neurones qui exprime ces courants est très faible (Walsh et al., 2009). On sait aujourd'hui que les canaux ioniques HCN subissent des modifications développementales. Dans le ganglion spinal par exemple, les canaux HCN deviennent fonctionnels progressivement au cours du développement (Hou et al., 2015). De plus, d'après une étude publiée en 2015, le nombre de canaux HCN1 et HCN2 augmente au cours du développement postnatal dans le ganglion trigeminal, tandis que l'expression de HCN3 et HCN4 ne change pas (Cho et al., 2011). Cette étude suggère que les courants I_h sont déjà actifs dans les neurones sensoriels trigeminaux dès la naissance, mais que leur rôle s'intensifie au cours du développement, notamment dans la régulation de l'excitabilité.

En ce qui concerne les courants I_A , l'étude de Walsh et collaborateurs et celle de Tadros et collaborateurs montrent que des courants I_A de type I_A -rapide (ayant une cinétique d'activation et d'inactivation rapide) sont détectés dans les neurones de la CDS dès le stade embryonnaire mais que la proportion de neurones exhibant ces courants diminue au cours du développement. A l'inverse les courants de type I_A -lent (caractérisés par des cinétiques lentes) apparaissent tardivement en période postnatale, après la deuxième semaine de vie, et ceci quelle que soit la région cervicale, thoracique ou lombaire (Walsh et al., 2009, Tadros et al., 2012). L'expression des canaux Kv4.2, impliqués dans ces courants, évolue fortement au cours du développement. En effet, au stade embryonnaire, les canaux Kv4.2 sont d'abord exprimés par les motoneurones de la corne ventrale de la moelle épinière. Puis ils vont être exprimés transitoirement dans la substance grise intermédiaire jusqu'à 14 jours après la naissance, âge à partir duquel les canaux sont détectés dans les couches superficielles de la CDS (Huang et al., 2006).

Objectifs de la thèse

Ainsi, comme nous l'avons vu dans cette introduction, les premières semaines de vie sont le terrain de formidables remaniements au sein des circuits de l'intégration et du traitement des informations sensorielles, qu'elles soient de nature tactile ou nociceptive. Au cours des trente dernières années, ces modifications ont été relativement bien décrites au niveau de la CDS, premier relai de l'information sensitive extra-céphalique. Cependant, au niveau du Sp5C, peu de données sont disponibles à ce jour sur les modifications développementales qui se produisent au cours de la période postnatale. Or nous savons que des différences existent entre la moelle épinière et le Sp5C. D'abord, ces deux structures reçoivent des afférences qui proviennent de régions complètement différentes (tête/face versus reste du corps). De plus l'innervation trigéminal est plus dense et plus démarquée avec moins de fibres de type C par rapport à l'innervation spinale (Price and Flores, 2007). La densité de fibres exprimant le récepteur TRPV1 (*transient receptor potential vanilloide 1*) est plus importante dans la couche IIi de la corne dorsale spinale, alors qu'elle est localisée principalement dans les couches superficielles I et IIe au niveau du Sp5C (Bae et al., 2004). De plus, une transection du nerf spinal induit des modifications de l'arborisation des fibres de type A β (Woolf et al., 1992) mais pas la transection du nerf trigéminal (Zhang et al., 2015). Enfin, l'efficacité des traitements antidouleurs est également différente selon le niveau de la lésion : trigéminal ou spinal (Kayser et al., 2010; Latrémolière et al., 2008; Michot et al., 2013, 2014, 2015).

L'objectif général de ce travail de thèse était donc d'étudier les modifications développementales pendant la période postnatale au niveau du Sp5C, à travers 4 projets de recherche distincts mais complémentaires.

Le premier projet a consisté à étudier le développement d'une population phénotypique spécifique, les interneurons PKC γ , au sein du Sp5C durant les 3 premières semaines postnatales.

Le second projet a été consacré à l'étude des modifications morphologiques et électrophysiologiques des interneurons de la couche IIi.

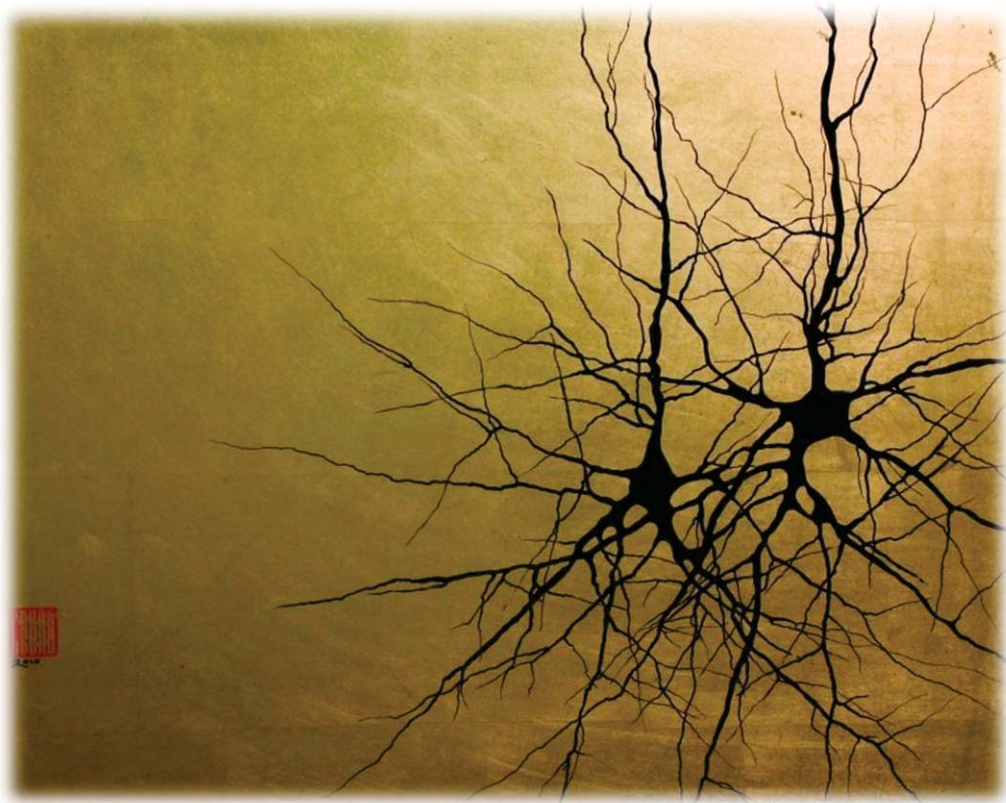
Le troisième projet a pour objectif d'étudier l'influence de la sérotonine et des récepteurs 5-HT_{2A} sur le développement de la morphologie et de la physiologie des interneurons de la couche IIi.

Et enfin le dernier projet est consacré à l'étude de l'effet d'un traitement néonatal à la capsaïcine sur les fibres non-myélinisées peptidergiques (CGRP) et non-peptidergiques (IB4) au sein du Sp5C chez le rat.

Les deux premières études feront l'objet de deux chapitres indépendants, tandis que les deux dernières qui ne comportent à ce jour que des résultats préliminaires, seront intégrées dans la discussion générale et seront exposées dans les annexes de ce manuscrit.

Chapitre 2

*Le développement postnatal des interneurones PKC γ
au sein du Sp5C chez le rat*



Greg A Dunn Design, Two-pyramidals

I. *Contexte de l'étude*

Il est clairement établi qu'il existe une différence de sensibilité entre les jeunes et les adultes. La période postnatale est une période critique dans le développement des systèmes sensoriels, relativement bien décrite au niveau spinal. Après la naissance, la moelle épinière subit des modifications fonctionnelles anatomiques, cellulaires et moléculaires notamment à travers une réorganisation des fibres sensorielles, des modifications d'expression de protéines et de canaux ioniques (pour revue [Fitzgerald, 2005](#)). Plus particulièrement, les fibres-A β vectrices de l'information tactile envahissent la CDS du nouveau-né, y compris les couches superficielles I et IIe dédiées chez l'adulte aux fibres nociceptives. Au cours du développement, les fibres-A β vont se rétracter dans les couches plus profondes (IIi-V), où elles atteindront leurs cibles définitives.

Nous avons vu dans le chapitre I, que les interneurons exprimant l'isoforme γ de la protéine kinase C (PKC γ), sont retrouvés principalement dans les couches IIi et III de la CDS et du Sp5C ([Polgar et al., 1999](#) ; [Li et al., 2001](#)), et en moindre quantité dans les couches I et IIe. Les interneurons localisés dans la couche IIi sont contactés par les fibres-A β ([Miraucourt et al., 2007, 2009](#) ; [Lu et al., 2013](#)) et forment une bande homogène telle une frontière entre les territoires innervés par les fibres nociceptives (I-IIe) et non-nociceptives (IIi-V). De nombreuses études publiées ces dernières années ont mis en évidence la contribution des interneurons PKC γ dans les mécanismes sous-jacents de l'allodynie mécanique aussi bien au niveau céphalique qu'extracéphalique ([Pham-Dang et al., 2016](#) ; [Miraucourt et al., 2007, 2009](#) ; [Malmberg et al., 1997a, 1997b](#) ; [Martin et al., 2001](#)). Or, des études publiées par Sarah Sweitzer et ses collaborateurs ([Sweitzer et al., 2004](#) ; [Shumilla et al., 2005](#)), révèlent que l'implication de la PKC γ dans l'allodynie est dépendante du stade développemental, suggérant une immaturité des interneurons PKC γ aux stades de vie précoces. Cette idée a été appuyée par plusieurs études s'intéressant au développement des interneurons PKC γ au niveau spinal, malgré des conclusions somme toute divergentes ([Sweitzer et al., 2004](#) ; [Huang et al., 2015](#) ; [Chen et al., 2001](#) ; [Malmberg et al., 1997a, 1997b](#)).

Dans ce contexte, la première étude que nous avons réalisée a eu pour objectif de déterminer le développement temporel et spatial des interneurons PKC γ au sein des différentes couches du Sp5C chez le rat. Nous avons tenté de répondre à **4 questions**:

- 1 - A quel moment apparaissent les interneurons PKC γ et comment évoluent-ils au cours du temps dans chacune des couches superficielles ?
- 2 - Existe-t-il de la neurogenèse des interneurons PKC γ ?
- 3 - Le développement des interneurons PKC γ est-il similaire à celui de l'ensemble des neurones ?
- 4 - Le développement des interneurons PKC γ est-il lié à l'arrivée progressive des fibres nociceptives ?

II. *Matériels et méthodes*

Les animaux utilisés étaient des rats mâles et femelles de la souche Sprague-Dawley. Des couples reproducteurs ont été fournis par Charles River (L'arbresle, France), puis les femelles ont mis bas à l'animalerie du laboratoire. Les animaux ont été élevés dans un environnement contrôlé à 22°C avec eau et nourriture *ad libitum* et soumis à une photopériode en deux phases (lumière de 19.00 à 7.00). Toutes les expérimentations ont été menées en conformité avec le guide éthique de la IASP (*International Association for the Study of Pain*, Zimmermann, 1983) et la directive 2010/63/UE du parlement européen et du conseil de protection des animaux. Les protocoles expérimentaux utilisés dans ce travail ont également été approuvés par le comité locale d'expérimentation animale : CEMEAA « Comité d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale Auvergne » (n° CE 71-12).

Les animaux utilisés étaient âgés de 3 à 60 jours postnataux (P3-P60).

2.1 *Analyse quantitative du développement des interneurons PKC γ et des neurones totaux*

2.1.1 **Préparations des tranches**

Au jour approprié pour notre étude, les ratons ont été anesthésiés profondément par inhalation d'halothane (2%), puis perfusés par voie transcardiaque avec 20ml d'une solution isotonique de chlorure de sodium héparinée puis 50 à 75ml selon le poids d'une solution de fixation (paraformaldéhyde à 4%, dilué dans un tampon phosphate sodique à 0,1M ; pH 7,3). L'encéphale, le tronc cérébral et la moelle épinière ont ensuite été prélevés et placés pendant deux heures dans une solution de post-fixation identique à la solution de fixation. Enfin, l'ensemble a été plongé toute la nuit à 4°C dans une solution tampon de phosphate sodique contenant 30% de sucrose et 0,05% d'azide (un anti-fongique), afin d'assurer une cryoprotection. Les jours suivant la perfusion, des coupes transversales sériées de 30 μ m d'épaisseur au niveau du tronc cérébral, ont été réalisées avec un cryostat et placées sur des lames gélatinées.

2.1.2 **Immunohistochimie**

Les coupes ont été rincées 4 fois pendant 5 minutes dans une solution de Tris-Buffered Saline (TBS 1X et pH = 7.4) et bloquées pendant 1h à température ambiante dans une solution de TBS contenant 5% de Normal Goat Serum (NGS), 0.3% de Triton X-100 et 0.25 % d'albumine de sérum bovin (BSA). Après un nouveau rinçage au TBS, les coupes ont été

incubées pendant 72 h à 4°C dans une solution d'anticorps primaires contenant un anticorps anti-PKC γ et un anticorps anti-NeuN (**Table 3**), dilués dans du TBS-BSA-Triton avec 5 % de NGS.

A la fin du temps d'incubation, les coupes ont été rincées 3 fois pendant 5 minutes dans du TBS, puis incubées pendant deux heures dans une solution d'anticorps secondaires contenant les anticorps secondaire anti-Guinea Pig couplé à Cy3 et anti-Mouse couplé à Alexa488, le tout dans du TBS-BSA-Triton (**Table 3**). Puis les lames ont été rincées à nouveau dans du TBS avant d'être montées sous DPX.

2.1.3 Poste d'imagerie

La révélation de la fluorescence de chaque anticorps a été faite grâce à un microscope Zeiss Axioplan 2 couplé à une caméra digitale Hamamatsu C4742-95 en jouant avec les filtres pour FITC-Alexa 488 et Rhodamine-Cy3 (Rhodamine-Cy3 : Filtre d'excitation (BP) : 546 ; Miroir dichroïque (FT) : 580 ; Filtre d'arrêt (LP) : 590 / FITC-Alexa 488 : Filtre d'excitation (BP) : 450-490 ; Miroir dichroïque (FT) : 510 ; Filtre d'arrêt (LP) : 515-565).

Des images ont été prises sous les objectifs x5, x10, x20 et x40 et traitées à partir du logiciel Metamorphe.

2.1.4. Quantification

La quantification des interneurones a été réalisée dans des fenêtres de quantification disposées entre les limites de chacune des couches I, IIe, IIIi et III (**Fig.17**). Le centre des fenêtres de quantifications a été positionné sur la diagonale d'un rectangle englobant l'ensemble du Sp5C. L'aire de chaque rectangle a été rapportée comme le produit de l'épaisseur de la couche quantifiée et d'une largeur définie de 200 μm . La densité d'interneurones est ainsi donné en nombre de neurones/ $10^4 \mu\text{m}^2$.

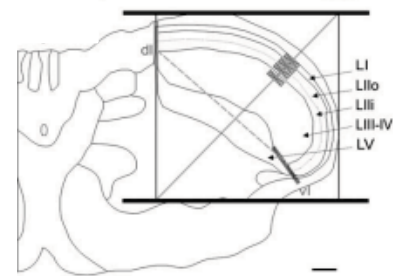


Figure 17 : Protocole de quantification des interneurones. Représentation schématique d'une coupe transversale de tronc cérébral (ici au niveau -1200). Le carré entoure la corne dorsale bulbaire et sur sa diagonale sont placés des rectangles de quantifications à l'intérieur de chacune des couches I(LI), IIexterne (LIIo), IIinterne (LIIi) et III(LIII). Barre d'échelle : 200 μm
Abréviations : dl, limite dorsale ; vl, limite ventrale

Les quantifications ont été faites sur deux coupes par rat, l'une au niveau -2400 (correspondant à une distance de 2400 μm de l'ouverture de l'obex, soit à la jonction entre le Sp5C et le sous-noyau interpolaire) et l'autre plus rostralement, au niveau -1200.

La délimitation des couches, le dessin des rectangles et les quantifications ont été réalisées sur le logiciel ImageJ.

2.2 Etude de la prolifération cellulaire

2.2.1 Traitement pharmacologique : le BrdU

Le 5-bromo-2-desoxyuridine (BrdU) est un analogue structural de la thymidine classiquement utilisé pour marquer les cellules en interphase (phase S). Lors de la réplication de l'ADN, le BrdU s'incorpore à la place de la thymidine dans l'ADN nouvellement synthétisé. Un anticorps dirigé contre le BrdU est ensuite utilisé pour visualiser les cellules nouvellement formées. Le marquage est nucléaire, permanent et concerne toutes les cellules en division.

Dans notre étude, 6 animaux ont reçu quotidiennement à partir de P3 une injection intrapéritonéale de 50 μL de BrdU (50 mg/kg, Sigma) dans une solution de NaCl à 0.9 %. Les animaux ont ensuite été euthanasiés à 1, 3, 5, 7, 9 et 13 jours après la première injection de BrdU (**Fig. 18**). En supplément, un animal a reçu une injection quotidienne de BrdU à partir de P8 et a été euthanasié 8 jours plus tard (à P16).

Le jour de l'euthanasie, l'ensemble de l'encéphale a été prélevé et des coupes de tronc cérébral et de bulbes olfactifs (servant de contrôle) ont été réalisées au cryostat comme décrit précédemment.

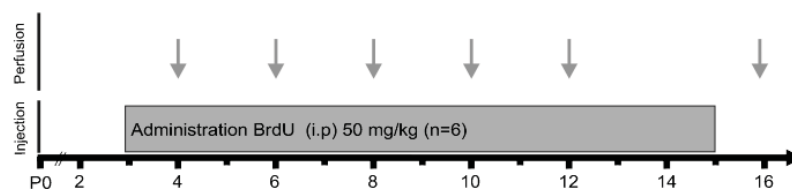


Figure 18 : Stratégie expérimentale de l'injection du BrdU. Les flèches représentent les dates auxquelles les animaux ont été perfusés.

Abréviations : P, jours postnataux

2.2.2 Immunohistochimie

Les coupes ont été rincées 4 fois pendant 5 minutes dans une solution de TBS puis dénaturées par l'acide chlorhydrique (HCl 1N) pendant 30 minutes dans un bain-marie à 37°C. Les coupes ont ensuite été incubées pendant 30 minutes (3x10minutes) dans une solution de borate de sodium (0.1M et pH= 8.5), puis rincées au TBS 0.1 M et bloquées pendant 1h dans une solution de TBS 0.1M contenant 3% de NGS et 0.1% de Triton X-100 à température ambiante. Après un nouveau rinçage au TBS, les coupes ont été incubées pendant 72 h à 4°C dans une solution d'anticorps primaires contenant un anticorps anti-PKC γ et un anticorps anti-BrdU (**Table 3**), dilués dans du TBS - Triton.

A la fin du temps d'incubation, les coupes ont été rincées 3 fois pendant 5 minutes dans du TBS, puis incubées pendant deux heures dans une solution d'anticorps secondaires contenant les anticorps anti-GuineaPig couplé à Cy3 et anti-rat couplé à Alexa488 (**Table 3**), le tout dans du TBS-BSA-Triton.

Les coupes ont ensuite été rincées, déshydratées puis montées sous lamelles comme cité précédemment.

2.2.3 Postes d'imagerie et analyse des spectres

Des images ont d'abord été prises sous les objectifs x5, x10, et x20 à l'aide du microscope Zeiss Axioplan 2. Puis pour plus de précision, un microscope confocal à balayage laser (Zeiss LSM 510, Carl Zeiss, Hamburg, Germany) nous a permis de réaliser un scan à x40 (avec immersion dans l'huile) sur toute l'épaisseur de la coupe (30 μ m), l'épaisseur de chaque section étant inférieure à 1 μ m (z-step = 0.38 μ m). Ceci nous a permis d'avoir une image de chaque coupe en 3 dimensions (3D). Les éventuelles colocalisations PKC γ /BrdU ont été vérifiées par une analyse de la fluorescence le long d'une droite dessinée à travers chaque cellule d'intérêt, et ceci sur les trois plans orthogonaux XY, YZ et XZ. Cette analyse a été réalisée pour chaque marqueur séparément grâce aux plug-ins Colocalization Treshold et Plot Line de Fiji.

2.3 Etude de l'implication des afférences sensorielles nociceptives dans le développement des interneurons PKC γ

2.3.1 Traitement pharmacologique : la capsaïcine

La capsaïcine est un composé actif du piment qui, lorsqu'elle est appliquée sur l'épithélium, provoque une forte sensation de brûlure (16 000 000 unités sur l'échelle de Scoville). La capsaïcine stimule spécifiquement les canaux ionotropiques vanilloïdes de type 1 (TRPV1) (Jancsó and Maggi, 1987; Knotkova et al., 2008). Ces canaux TRPV1 sont exprimés par une sous-population de neurones sensoriels afférents ayant des prolongements de petit diamètre (fibres A δ et C). En effet, chez le rat, la majorité des fibres sensorielles exprimant le TRPV1 lient l'isolectine B4 (70%) tandis qu'un autre contingent de fibres sensorielles exprimant le TRPV1 se caractérise par la présence de neuropeptides (Substance P ou CGRP) (30%). De ce fait, l'activation des TRPV1 est impliquée dans la détection d'une chaleur nociceptive ($> 43^{\circ}\text{C}$) (Caterina et al., 1997), et dans la mise en place de phénomène d'hyperalgésie et d'allodynie (pour revue, Cui et al., 2016). A forte dose, la capsaïcine entraîne au contraire une désensibilisation ou analgésie. En effet, utilisée en crème locale (8% capsaïcine), elle entraîne la destruction du filet nerveux sous-cutané permettant de réduire les douleurs chronique pendant une durée de 50 à 60 jours (pour revue, Cui et al., 2016).

Depuis une vingtaine d'année, la capsaïcine est utilisée en administration sous-cutanée pour étudier le développement de la CDS chez le rongeur. En effet, une administration de capsaïcine à forte dose chez le rat nouveau-né provoque une délétion à long-terme d'une grande quantité de fibres exprimant le TRPV1 (Jancsó et al., 1977) : et quoi de plus simple que d'altérer une structure pour comprendre son implication dans le développement du cerveau et son fonctionnement ? L'histoire des neurosciences ne manque pas de ce type de pratique.

Ainsi, dans notre étude, des rats âgés de deux jours post-nataux (P2) ont été anesthésiés à l'halothane et ont reçu une injection sous-cutanée au niveau du cou d'une solution de capsaïcine (50mg/kg) dissoute dans du NaCl 0.9% contenant 10% de Tween80 et 10 % d'alcool (groupe « capsaïcine ») (Holzer, 1991; Marlier et al., 1992; Szallasi, 1994) (**Fig. 19A**). Après l'injection, les animaux ont été remis avec leur mère et leur état général a été inspecté régulièrement le jour même et les jours suivants l'injection. Aucun trouble physique ou comportemental n'a été constaté. Un autre groupe ne recevant que la solution véhicule sans capsaïcine a servi de contrôle (groupe « véhicule »)

2.3.2 Test comportemental: le *eye-wiping test*

Afin de valider notre traitement néonatal à la capsaïcine, nous avons réalisé un test de chémosensibilité de la cornée, le *eye-wiping test* (Farazifard et al., 2005), sur les deux groupes d'animaux (« véhicule » vs « capsaïcine »), et ceci à P18, soit après l'ouverture complète des yeux chez le rat (Fig. 19A). Pour cela, une goutte de 15 µl d'une solution contenant de la capsaïcine à 0.01 % (1% de capsaïcine dans une solution de NaCl 0.9% avec 10 % d'éthanol et 10 % de Tween-80) diluée dans du NaCl, a été instillée dans l'œil de chaque animal (Fig. 19B) (Nakao et al., 2012). Une solution « solvant » ne contenant pas de capsaïcine a servi de contrôle. Les solutions « solvant » et « capsaïcine » ont été respectivement instillées dans les yeux gauche et droit avec un intervalle de 30 minutes entre les deux. Après chaque instillation, les animaux ont été placés dans des boîtes transparentes munies d'un miroir, et leurs réponses comportementales ont été filmées pendant 2 minutes, avant d'être remis dans leur cage. Le nombre de frottements des yeux par les pattes antérieures en réponse à l'instillation a été quantifié pendant les 30 premières secondes suivant l'instillation (Fig. 19C).

2.3.3 Immunohistochimie

A P21, les animaux ont été anesthésiés profondément par inhalation d'halothane puis le tronc cérébral a été prélevé, puis coupé au cryostat, et enfin, une immunohistochimie dirigée contre la PKCγ a été réalisée pour quantifier le nombre d'interneurones chez les groupes « véhicule » et « capsaïcine », le tout comme décrit précédemment au paragraphe II.2.1.

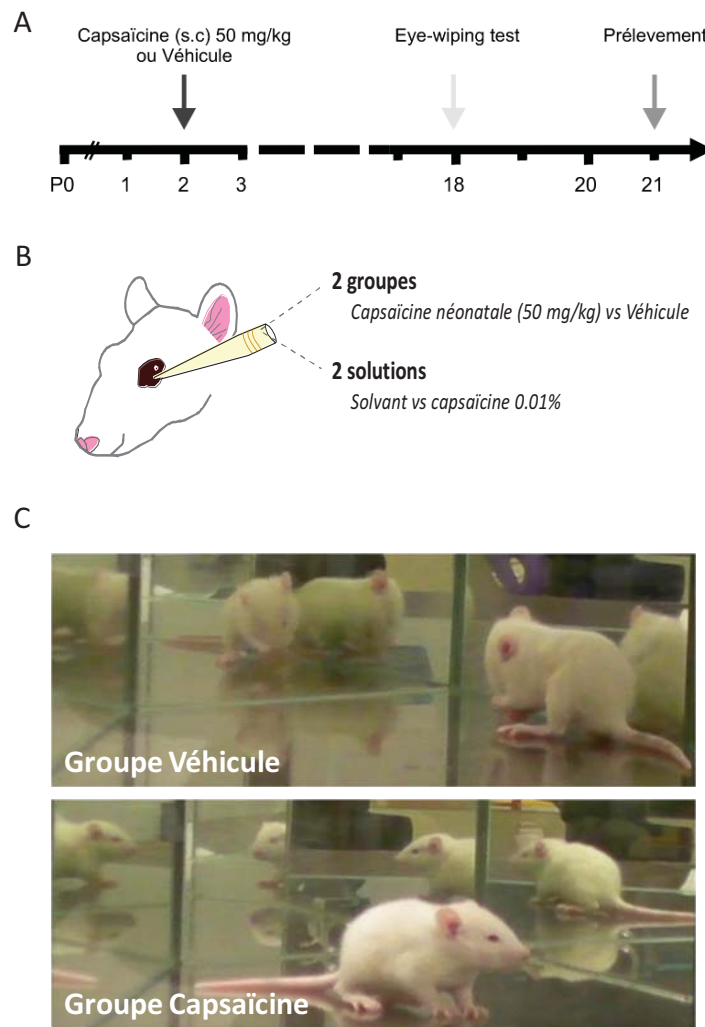


Figure 19 : Stratégie expérimentale de la délétion des fibres nociceptives par la capsaïcine. **A**, Calendrier expérimental. **B**, Représentation schématique de l'instillation de capsaïcine sur la cornée à l'aide d'une cône et d'une micropipette PIPETMAN Gilson de 20 μ L (Volume d'instillation = 15 μ L). Les deux groupes d'animaux ont chacun reçu la solution « solvant » dans un œil, et la solution contenant de la capsaïcine dans l'autre œil. **C**, Ces capture-vidéos illustrent la réponse comportementale d'un rat « véhicule » (haut) et d'un rat « capsaïcine » (bas) immédiatement après l'instillation de capsaïcine dans l'œil. La capsaïcine entraînant une irritation de la cornée, l'animal « véhicule » se frotte frénétiquement l'œil avec les pattes antérieures et montre un comportement de fuite. L'irritation s'estompe au bout de 2 minutes.

Abréviation : P, jours postnataux

Table 3-Anticorps utilisés

<i>Anticorps primaires</i>	<i>Anti-PKCγ</i>	<i>Anti-NeuN</i>	<i>Anti-BrdU</i>
Clonalité	Polyclonal	Monoclonal	Monoclonal
Espèce	Cochon d'inde (Guinea Pig)	Souris (Mouse)	Rat (Rat)
Concentration	1:500	1:1000	1:300
Fournisseur	Frontier Institute (Hokkaido, Japan)	Millipore (France)	Abcam (Royaume-Uni)
<i>Anticorps secondaires</i>	<i>Cy3</i>	<i>Alexa 488</i>	<i>Alexa 488</i>
Antigène	Anti-guinea pig couplé à cy3	Anti-mouse couplé à cy2	Anti-rat couplé à cy2
Espèce	Chèvre (Goat)	Chèvre (Goat)	Chèvre (Goat)
Concentration	1:200	1:200	1:1000
Fournisseur	Jackson Immunoresearch	Jackson Immunoresearch	Life Science
Excitation / Emission	~550/570	~495/519	~495/519

III. *Article n°1*

Lamina Specific Postnatal Development of PKC γ Interneurons within the Rat Medullary Dorsal Horn

Noemie Mermet-Joret,¹ Nadwa Chatila,¹ Bruno Pereira,² Lénaïc Monconduit,¹ Radhouane Dallel,^{1,3} Myriam Antri¹

¹ Neuro-Dol, Clermont Université, Université D'Auvergne, BP 10448, F-63000, Clermont-Ferrand & Inserm U1107, Clermont-Ferrand, F-63100, France

² Biostatistics Unit (DRCI), CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, F-63100, France

³ Service D'Odontologie, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, F-63000, France

Received 15 April 2016; revised 21 June 2016; accepted 22 June 2016

ABSTRACT: Protein kinase C gamma (PKC γ) interneurons, located in the superficial spinal (SDH) and medullary dorsal horns (MDH), have been shown to play a critical role in cutaneous mechanical hypersensitivity. However, a thorough characterization of their development in the MDH is lacking. Here, it is shown that the number of PKC γ -ir interneurons changes from postnatal day 3 (P3) to P60 (adult) and such developmental changes differ according to laminae. PKC γ -ir interneurons are already present at P3-5 in laminae I, IIo, and III. In lamina III, they then decrease from P11–P15 to P60. Interestingly, PKC γ -ir interneurons appear only at P6 in lamina IIi, and they conversely increase to reach adult levels at P11–15. Analysis of neurogenesis using bromodeoxyuridine (BrdU) does not detect any PKC γ -BrdU double-labeling in lamina IIi. Quantification of the neuronal marker, NeuN, reveals a sharp neuronal decline (~50%) within all superficial MDH laminae during early

development (P3–15), suggesting that developmental changes in PKC γ -ir interneurons are independent from those of other neurons. Finally, neonatal capsaicin treatment, which produces a permanent loss of most unmyelinated afferent fibers, has no effect on the development of PKC γ -ir interneurons. Together, the results show that: (i) the expression of PKC γ -ir interneurons in MDH is developmentally regulated with a critical period at P11–P15, (ii) PKC γ -ir interneurons are developmentally heterogeneous, (iii) lamina IIi PKC γ -ir interneurons appear less vulnerable to cell death, and (iv) postnatal maturation of PKC γ -ir interneurons is due to neither neurogenesis, nor neuronal migration, and is independent of C-fiber development. © 2016 Wiley Periodicals, Inc.

Develop Neurobiol 00: 000–000, 2016

Keywords: PKC gamma; pain; medullary dorsal horn; BrdU; C-fiber

INTRODUCTION

The spinal (SDH) and medullary dorsal horns (MDH) play a critical role in processing and relaying sensory information from the periphery to higher brain centers (Todd, 2010; Sessle, 2011). A large body of evidence suggests that newborn infants have quite different pain mechanisms compared with adults (Fitzgerald, 2005). Research found that the postnatal period is a critical time in the development of spinal sensory systems. It is a time of structural and

Correspondence to: M. Antri (myriam.antri@udamail.fr)
Conflict of interest statement: None of the authors has any conflict of interest to declare.
Contract grant sponsor: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM).
Contract grant sponsor: the University of Auvergne-Clermont-Ferrand (France).
Contract grant sponsor: Région Auvergne (France).
© 2016 Wiley Periodicals, Inc.
Published online 00 Month 2016 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).
DOI 10.1002/dneu.22414

functional reorganization of sensory connections accompanied by marked changes in expression of molecules, receptors, and channels associated with sensory transmission (Fitzgerald, 2005). These postnatal events are dependent upon neural activity and synaptic development requires defined patterns of afferent inputs (Fitzgerald, 2005). Of note, newborn animals are highly sensitive to tactile input and dorsal horn circuits are dominated by low threshold A-fiber inputs (Koch and Fitzgerald, 2013).

Interestingly, research has shown that a specific class of interneurons, which concentrate the gamma isoform of protein kinase C (PKC γ), are activated only by tactile inputs (Miraucourt et al., 2007, 2009; Lu et al., 2013). PKC γ interneurons are predominantly located within the inner part of lamina IIi of the SDH (Polgár et al., 1999; Li et al., 2001) or MDH (Peirs et al., 2014) and receive mainly myelinated afferents, including A β -low threshold mechanoreceptor (Neumann et al., 2008; Lu et al., 2013; Peirs et al., 2014). PKC γ interneurons have been also involved in cephalic and extracephalic mechanical allodynia (pain induced by innocuous stimuli), a widespread and intractable symptom of inflammatory or neuropathic pain (Malmberg et al., 1997a, 1997b; Martin et al., 2001; Miraucourt et al., 2007, 2009). Interestingly, it has been also shown that the contribution of PKC γ to mechanical allodynia was developmentally regulated (Shumilla et al., 2005).

The postnatal PKC γ expression has been previously investigated in the lumbar SDH of rats (Akinori, 1998; Sweitzer et al., 2004) or mice (Malmberg et al., 1997a, 1997b; Chen et al., 2001; Huang et al., 2015) but has led to conflicting results. In some studies, PKC γ was shown to increase with age (Sweitzer et al. 2004), whereas other studies suggested a decrease in PKC γ immunoreactivity (Akinori, 1998; Huang et al., 2015). With regard to MDH, no data on the development of PKC γ interneuron expression has been reported until now. And, although MDH shares similarities with its SDH counterpart, there are significant differences. First, MDH receives inputs from widely differing structures in the head and neck, which differ markedly from those of the forelimb or hindlimb (Bereiter et al., 2000). Furthermore, the trigeminal innervation is denser, with fewer unmyelinated fibers compared with spinal innervation (Price and Flores, 2007). Compared with SDH, the MDH displays a broader density of IB4-positive fibers which cross laminae I and outer and inner part of lamina II (IIo and IIi) (Ambalavanar and Morris, 1992; Sugimoto et al., 1997). With respect to pharmacology, the efficacy of antinociceptive drugs is different at the trigeminal versus spinal level

(Latrémoilière et al., 2008; Kayser et al., 2010; Michot et al., 2013, 2014, 2015). Therefore, data gleaned from studies in SDH cannot be directly extrapolated to MDH.

In this context, developmental changes affecting the PKC γ interneurons within the MDH were studied. We characterized the postnatal spatial and temporal development of PKC γ interneurons from 3 to 60 postnatal days, at two rostro-caudal levels: -1200 and -2400 from the obex aperture and in superficial lamina I, IIo, IIi, and III.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Sprague Dawley rats were obtained from Charles River (L'Arbresle, France). Rats of both sexes ($n = 48$) were used from the postnatal day 3 (P3) to P60. Animals were maintained in a controlled environment (light on 19.00–7.00, 22°C) with food and water available *ad libitum*. The experiments followed the ethical guidelines of the International Association for the Study of Pain (Zimmerman, 1981) and ethical guidelines of the Directive 2010/63/UE of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purpose. Protocols applied in this study have been approved by the local animal experimentation committee: CEMEA “Comité d’Ethique en Matière d’Expérimentation Animale Auvergne” (n° CE 71-12).

PKC γ and NeuN Immunofluorescence

Rats were anaesthetized using a mask of 2% halothane and perfused transcardially with heparinized saline (25 IU heparin/mL) followed by cold phosphate-buffered solution (0.1M, PH 7.6) containing 4% paraformaldehyde with the volume increasing with animals age. The brainstem was then removed and transferred into a phosphate-buffered solution containing 30% sucrose at 4°C where it was left overnight. Coronal sections (30 μ m) from the MDH [Fig. 1(A)] were cut on a cryostat and collected on slides and left to dry overnight at room temperature (RT). The sections were washed four times in Tris-buffered saline (TBS) (5 minutes each) and blocked for 1 hour at RT by pre-incubation in 5% Normal Goat Serum (NGS) in TBS containing 0.3% Triton X-100 (Fisher Scientific) and 0.25% bovine serum albumin (BSA). After washes in TBS, sections were incubated 72 hours at 4°C in the primary antibodies solution of the following composition: guinea-pig polyclonal Anti-protein kinase C γ (1:500, Frontier Institute) and mouse monoclonal Anti-NeuN (1:1000, Millipore) diluted in 5% NGS in TBS-Triton-BSA. After three washes in TBS, the sections were then incubated for 2 hours in the secondary antibodies solution of the following composition: goat anti-guinea-pig IgH + L conjugate to cy3

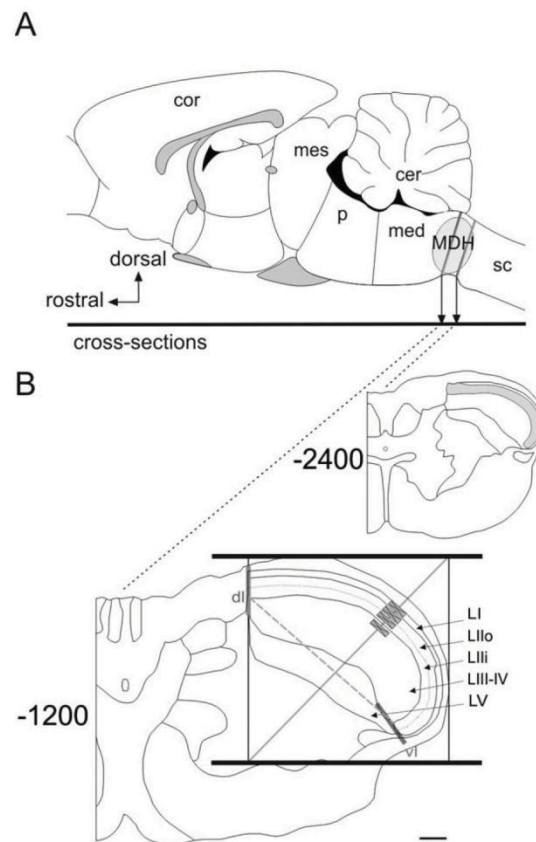


Figure 1 Schematic representation of the experimental design to count neurons in the medullary dorsal horn (MDH). A: Lateral view of the central nervous system of rat. Cor: cortex; cer: cerebellum; mes: mesencephalon; p: pons; med: medulla; sc: spinal cord and MDH. B: Cross-sections taken from the MDH at two analyzed levels: medium ($-1200\ \mu\text{m}$) and caudal end ($-2400\ \mu\text{m}$). LI, lamina I. LIIo, outer part of lamina II. LIII, inner part of lamina II. LIII-IV, lamina III. LIV, lamina IV. LV, lamina V. dl, dorsal limit. vl, ventral limit. Windows for neurons counting in each laminae was located at a distance of $20\ \mu\text{m}$ from the other windows and the center of each window was positioned on the diagonal of a rectangle enclosing the whole MDH (gray line). Scale bar = $200\ \mu\text{m}$.

(Jackson Immunoresearch) diluted 1:200 and goat anti-mouse conjugate to cy2 (Jackson Immunoresearch) diluted 1:200 in TBS-BSA-Triton. The sections were again washed four times in TBS. The slides were then coverslipped with DPX mounting for histology.

BrdU Injections and PKC γ /BrdU Double Immunofluorescence

From P3 to P16, 6 rats received each day an intraperitoneal injection of 5-Bromo-2-deoxyuridine (BrdU; 50 mg/kg; Sigma). Rats were allowed to survive for 1 ($n=1$), 3 ($n=1$), 5 ($n=1$), 7 ($n=1$), 9 ($n=1$), and 13 ($n=1$) days after the first BrdU injection. In addition, 1 rat was injected each day from P8 to P15 and was sacrificed after 16 days survival. Multiple injections paradigm was shown to

increase the number of cells incorporating BrdU compared with a single injection (Horner et al., 2000). At the appropriate survival time, rats were anaesthetized and perfused transcardially with heparinized saline (25 IU heparin/mL). Brainstem was removed and coronal sections were cut, as described above. The MDH sections were washed four times (5 minutes each) in a TBS 0.1M solution (pH = 7.4) and then denaturated with HCl 1N in a 37°C water bath for 30 minutes. Afterward, the sections were incubated in 0.1M sodium borate solution (pH = 8.5) three times (10 minutes each), washed in TBS 0.1M and blocked for 1 hour in goat serum (NGS 3%) in TBS 0.1M containing 0.1% Triton X-100 (Fisher Scientific). Sections were then incubated for 72 hours at 4°C in the primary antibodies solution of the following composition: guinea pig polyclonal Anti-protein kinase C γ (1:500, Frontier Institute) and rat monoclonal Anti-BrdU (1:300, Abcam) in TBS-Triton. After three

washes in TBS, the sections were incubated for 2 hours in the secondary antibodies solution of the following composition: goat anti-guinea-pig IgH + L conjugate to cy3 (Jackson Immunoresearch) diluted 1:200 and goat anti-rat conjugate to cy2 (1:1000, Life Science) in TBS-BSA-Triton. The sections were again washed four times in TBS. The slides were then coverslipped with DPX mountant for histology. The term BrdU-immunoreactive (BrdU-ir) cells is used subsequently and refers to cells that have their nucleus labeled for BrdU.

Antibodies Characterization

The anti-PKC γ polyclonal antibody (Frontier Institute, PKC γ -GP-Af350, Hokkaido, Japan) was raised in guinea pig against an epitope located within the amino acid residues 684–697 of mouse PKC γ . This antibody stains a single band of the appropriate molecular weight (75 kDa) on western blot analysis of brain lysates in wild types but not in PKC $\gamma^{-/-}$ mice (manufacturer's technical information).

The anti-NeuN monoclonal antibody (Millipore, MAB377, France) has been used by a number of immunostaining studies (Mullen et al., 1992; Todd et al., 1998), including previous works in our laboratory (Peirs et al., 2014). The NeuN antibody was raised in mice and labels all neurons in the rat spinal cord (Todd et al., 1998) and in the rat MDH with a similar immunoreactivity pattern (Peirs et al., 2014). Several groups have used this antibody, including Mullen et al., (1992) and Wolf et al. (1996) for western blot analysis. The latter group showed three bands in the 46–48 kDa on Western blot analysis. No staining was observed when the primary antibody was replaced by normal serum in mice.

The anti-BrdU monoclonal antibody (Abcam, ab6326, United Kingdom) was raised in rat. BrdU-ir cells in olfactory bulbs served as positive controls and animals that lacked such cells were not considered for analysis. Omitting the primary antibody resulted in the absence of immunoreactivity for BrdU. The patterns of PKC γ /BrdU labeling obtained in double-immunofluorescence experiments were the same as those observed with the PKC γ or BrdU protocols used separately. Animals that received PBS instead of BrdU injections did not show any immunoreactivity for BrdU, whereas PKC γ immunoreactivity in these animals was normal.

The specificity of antibodies was verified by omitting either primary or secondary antibodies. In those cases, no staining was visualized confirming the appropriate dilution and specificity of antibodies used in this study (data not shown).

Imaging

Fluorescent images were first obtained using a Zeiss Axio-plan 2 Imaging microscope coupled with a Hamamatsu C4742-95 digital camera, by switching between FITC and Rhodamine filter sets at $\times 5$, $\times 20$, and $\times 40$ magnifications.

Developmental Neurobiology

Putative BrdU/PKC γ double-labeled cells were first observed under regular epifluorescence. The laser scanning microscope (LSM 510, Carl Zeiss, Hamburg, Germany) was then used in multitrack mode. The thickness of each optical section of the z-stacks was less than 1 μm (z-step of 0.38 μm). Filter settings matching the characteristics of Alexa Fluor 488 and 532 were used with $\times 40$ oil immersion objective. Fluorescent images at $\times 10$ and $\times 40$ magnifications were obtained with the same microscope. Putative colocalizations were assessed using morphological landmarks by drawing line profiles across neurons of interest on the three orthogonal plans (XY, XZ, YZ). These were performed on each color, separately. Two-dimensional graphs of the intensities of pixels (Y-axis) along the distance of the line (X-axis) were compared. These graphs have been realized with Colocalization Threshold and Plot line plugins on Fiji software (<http://rsbweb.nih.gov/ij>; NIH, The United States). This analysis allowed us to determine whether each neuron was suspected of showing BrdU/PKC γ double labeling. All the figures were drawn using CorelDraw Graphics software (v12.0; Ottawa, Canada).

Delimitation and Area of Laminae

Delimitation of laminae borders at different postnatal ages was performed using NeuN staining and according to Lorenzo et al. (2008). The border between lamina I and the outer part of lamina II (Ilo) was delimited so that lamina I contained a low density of interneurons displaying mainly a fusiform shape. Lamina II contains higher density of small interneurons than lamina I with a rather uniform size. Lamina II can be separated in outer and inner lamina II (Ilo, Ili), because of the presence of clusters of small interneurons in lamina Ilo and more scattered interneurons in lamina Ili. The border between lamina Ili and lamina III was set based on large interneurons in lamina III. The identification of the borders between laminae Ilo/Ili and Ili/III with NeuN labeling was confirmed by the dense PKC γ -ir neuropil.

The area of laminae I, Ilo, and Ili was calculated as the product thickness $\times$ length of the external limit of each laminae, while the lamina III area was measured using the product length of the external limit of lamina III $\times$ length of a line (dashed grey line) drawn from the dorsal [dl, Fig. 1(B)] to the ventral limit [vl, Fig. 1(B)].

Quantification

Quantifications of PKC γ and NeuN immunoreactive interneurons (PKC γ -ir and NeuN-ir) were performed in the same animals from P3 to P20 and P60 animals ($n = 33$). Data were separated into five age groups: P3–5 ($n = 4$), P6–10 ($n = 10$), P11–15 ($n = 8$), P16–20 ($n = 8$), and P60 ($n = 3$). The method used for counting has previously been described (Peirs et al., 2014) and was conducted using the modified optical dissector method (Coggeshall, 1992; Kaplan et al., 2011). Briefly, each windows of quantification were positioned with one of the longer sides at the

border between each laminae and the shorter side perpendicular to the longer side. In addition, the center of quantification windows was positioned on the diagonal of a rectangle enclosing the whole MDH and their median axes were perpendicular to the MDH border [Fig. 1(B)]. The quantifications were performed from z-stack photomicrographs of transverse sections taken at $\times 20$ magnification and the analysis was carried out using the Fiji-ImageJ 1.47 software. Great care was taken to ensure that the immunostaining of each PKC γ -ir and NeuN-ir neurons was clearly defined. Only cells that had clear unequivocal labeling that disappeared at both the top and bottom surfaces of z-stack were counted. When any doubt existed for any interneurons, double-checking was carried out by re-examining the sections under the microscope at a higher magnification ($\times 40$). Counts of PKC γ -ir and NeuN-ir neurons were done in lamina I, Ilo, Ili, and III on one side of the coronal section and at the two rostro-caudal levels of the MDH: $-1200\ \mu\text{m}$ and $-2400\ \mu\text{m}$ [distance in μm from the obex aperture; Fig. 1(B)]. The number of PKC γ -ir and NeuN-ir neurons in each window was expressed as a number/ 10^4 square microns (μm^2).

Capsaicin Treatment and Assessment of Capsaicin Injury

Neonatal rats ($n = 8$) of either sex were anesthetized with halothane 48 hours (P2) after birth. Capsaicin solution (50 mg/kg, dissolved in saline containing 10% Tween 80 and 10% ethyl alcohol, Sigma, St. Louis, MO; $n = 4$ rats) or vehicle solution (10% Tween 80 in 0.9% saline and 10% alcohol; $n = 4$ rats) was injected subcutaneously in the neck. Treatment with this dose of capsaicin within 48 hours of birth was previously shown to destroy C-fibers (Holzer, 1991; Marlier et al., 1992; Szallasi, 1994). After injection, the pups were returned to their mothers. All animals survived until transcardial perfusion at P21. There were no significant differences in general behavior or food intake between these two groups. The body weights at the third postnatal week were $51.25 \pm 2.2\ \text{g}$ ($n = 4$) and $51.75 \pm 2.7\ \text{g}$ ($n = 4$), for the vehicle and capsaicin-treated groups, respectively.

A corneal chemosensitivity test ("eye-wiping test") was used to assess the efficiency of capsaicin injection according to a previously described method (Marlier et al., 1992; Nakao et al., 2012). The sensitivity to capsaicin in each animal belonging to either the capsaicin- or vehicle-treated group was measured by the behavioral responses to instillation of capsaicin solution on the cornea. The 0.01% capsaicin solution contained 1% capsaicin, 10% ethanol, and 10% Tween-80 with saline to 1:100. A solution of the same content without capsaicin ("solvent" solution) was used as a control. At P18 (after the eyes opening), an approximately 15 μL drop of 0.01% capsaicin solution and of solvent solution was instilled into the right and left eyes. The interval between instillations in one rat was more than 30 minutes. The number of eye-wiping behaviors in the first 30 s after

the application was counted by visual inspection of experimenters in a blind manner.

Data Analysis

Statistical analysis was performed using Stata 13 software (StataCorp LP, College Station, TX). The tests were two-sided, with a type I error set at $\alpha = 0.05$. Subject's characteristics were presented as mean $\pm$ standard-error according to statistical distribution data (assumption of normality assessed using the Shapiro–Wilk test). Comparisons between the independent groups were realized using ANOVA or Kruskal–Wallis test for quantitative parameters (assumption of homoscedasticity studied using Bartlett's test) followed when appropriate by post-hoc tests for pairwise multiple comparisons tests: Dunn's or Games and Howell tests, respectively. Random-effects models were performed for correlated and repeated data to study fixed effects group, time-points and their interaction and taking into account within and between rats variability. Sidak's correction was proposed in order to adapt type-I error to multiple comparisons tests. When appropriate, log-transformation was proposed to achieve normality of dependent variables. The normality of residuals obtained for each model was studied as described previously. Comparison of PKC γ -ir interneurons and NeuN-ir neurons evolution was performed using correlations coefficients from random-effects models. When appropriate, an unpaired Student *t*-test was used to compare values between two groups and a two-way ANOVA test followed by Bonferroni post-hoc correction was used. Results were expressed as *P*-values.

RESULTS

Anatomic Distribution of PKC γ -ir Interneurons in the MDH During Development

The spatial and temporal distribution of the PKC γ -ir interneurons was similar between the two rostrocaudal levels. At P3, the PKC γ -ir interneurons were already present in both levels -1200 and -2400 of the MDH [Fig. 2(A1,B1)]. Most of the interneurons were located in laminae I and III, no or very few were observed in laminae Ilo and Ili. A clear labeling of PKC γ -ir interneurons in lamina Ili only appeared at P6 [Fig. 2(A2,B2)]. From P8 to P10, thin PKC γ -ir fibers (neuropil) appeared in lamina Ili with more numerous PKC γ -ir interneurons [Fig. 2(A3,B3)]. From P10 to P15, the staining intensity of PKC γ -ir interneurons increased in lamina Ili. At this stage, a dense PKC γ -ir neuropil distinctly appeared [Fig. 2(A4,B4)]. The pattern of PKC γ -ir labeling at P20 was similar to that of the adult stage [Fig. 2(A5,B5)]

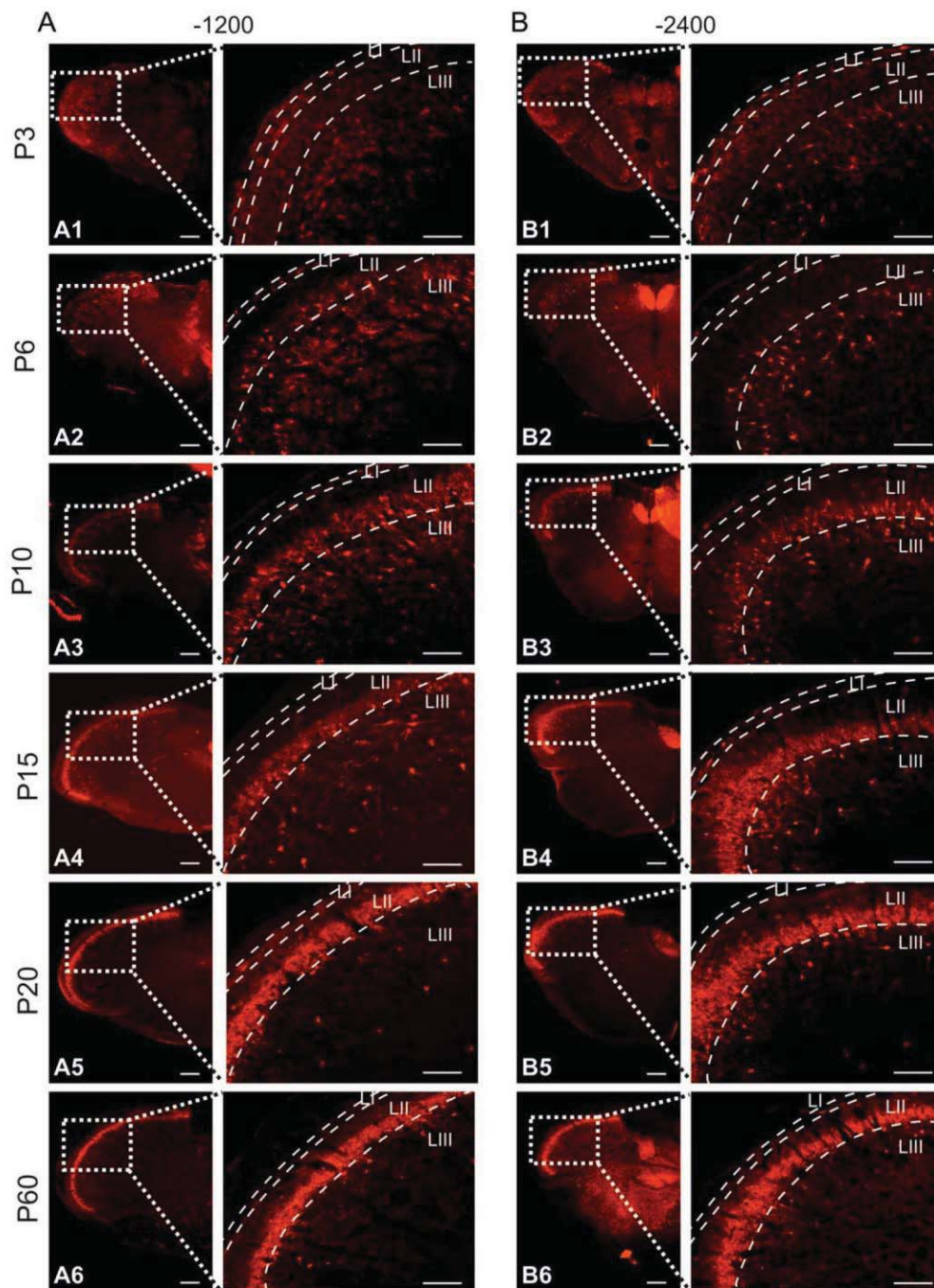


Figure 2 Development of PKC γ -ir interneurons in the MDH. A,B: Photomicrographs of PKC γ -ir interneurons at two rostrocaudal levels: -1200 rostral level (A1–A6) and -2400 caudal level (B1–B6) of the MDH taken at six postnatal ages (P3, P6, P10, P15, P20, and P60) and at two magnifications: $\times 5$ (left, scale bar = 200 μ m) and $\times 20$ (right, scale bar = 100 μ m). LI, lamina I. LII, lamina II. LIII, lamina III. At P3, PKC γ -ir interneurons are present in LI, LII, and LIII whatever the levels (A,B). In LIII, few PKC γ -ir interneurons are present only from P6 (A2, B2). A PKC γ -ir neuropil is present at P10 (A3, B3) and then, the PKC γ -ir increase with age (A,B, 3–6). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

versus Fig. 2(A6,B6)], that is, PKC γ -ir appeared as mainly a dense neuropil in lamina III with strongly immunoreactive cell bodies and associated dendrites, and few immunoreactive interneurons located within lamina I, lamina IIo, and outer lamina III. As previously observed in the adult SDH (Polgár et al., 1999) and MDH (Peirs et al., 2014), PKC γ immunoreactivity is weaker in the most dorsal (lamina I and IIo) than the most ventral cells (lamina III and Ili).

Overall, modifications of the PKC γ immunostaining pattern were observed in different laminae of the MDH with age, and the spatial and temporal distribution of the PKC γ -ir interneurons was similar between the two rostrocaudal levels.

Quantitative Analysis of Postnatal Development of PKC γ -Ir Interneurons in the MDH

We then examined in each lamina whether these anatomic development was accompanied by changes in the number of PKC γ -ir interneurons. We first counted interneurons in the two rostrocaudal levels –1200 and –2400 from the obex and compared their numbers. As there was no significant difference between the two levels, we pooled the data for statistical analysis.

In laminae I, PKC γ -ir interneurons were already present at P3–5 (Fig. 3; 2.78 ± 1.6 interneurons/ $10^4 \mu\text{m}^2$). The analysis of the postnatal development of

PKC γ -ir interneurons in this lamina showed no significant change in the total number of PKC γ -ir interneurons ($P = 0.43$; Kruskal–Wallis test). No or very few PKC γ -ir interneurons (0.52 ± 0.3 interneurons/ $10^4 \mu\text{m}^2$) were observed in lamina IIo at P3–5 and Kruskal–Wallis test showed no significant change ($P = 0.06$) in the total number of PKC γ -ir interneurons between age groups. In lamina III, no PKC γ -ir interneuron was seen at P3–5. They only appeared at P6 and we observed two postnatal development stages afterward. A first period of significant increase in the number of PKC γ -ir interneuron from P6–10 (2.96 ± 0.5 interneurons/ $10^4 \mu\text{m}^2$) to P11–15 (7.39 ± 0.7 interneurons/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($P = 0.02$; Kruskal–Wallis test followed by Games–Howell test post hoc analysis) was followed by a second period from P11–15 to P60 (7.62 ± 0.6 interneurons/ $10^4 \mu\text{m}^2$), where the number of interneurons did not significantly change ($P = 0.99$; Kruskal–Wallis test followed by Games–Howell test post hoc analysis). This suggests that adult pattern in lamina III is achieved at P11–15. In lamina III, PKC γ -ir interneurons were already present at P3–5 (3.25 ± 0.1 interneurons/ $10^4 \mu\text{m}^2$). Two postnatal development stages were also observed, but different from those observed in lamina Ili. The number of PKC γ -ir interneurons in lamina III was stable from P3–5 to P11–15 (4.21 ± 0.5 interneurons/ $10^4 \mu\text{m}^2$; $P = 0.43$; Kruskal–Wallis test followed by Games–Howell test post hoc analysis) and then, significantly declined until P60 (0.75 ± 0.1

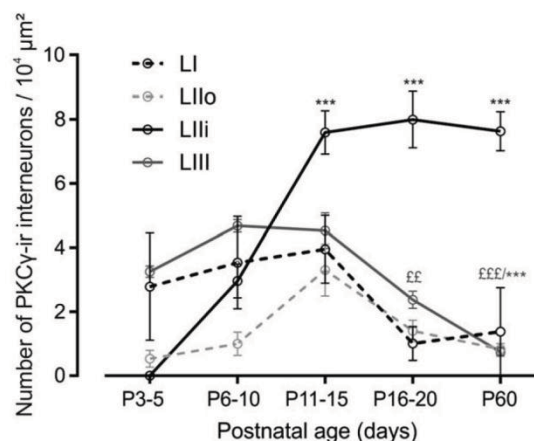


Figure 3 Developmental changes in PKC γ -ir interneurons density ($/10^4 \mu\text{m}^2$) in lamina I (LI, dashed black line), lamina IIo (LIIo, dashed grey line), lamina Ili (LIIi, solid black line) and lamina III (LIII, solid grey line). While the number of neurons progressively decreases in LIII or remain stable in LI and LIIo, it significantly increases in LIIi. Significant differences to values at P3–5 are indicated by * and significant differences to values at P11–15 are indicated by £. */£ $P < 0.05$, **/££ $P < 0.01$, ***/£££ $P < 0.001$; Kruskal–Wallis, Games and Howell post-test. All the data are expressed as mean $\pm$ SEM.

interneurons/ $10^4 \mu\text{m}^2$; $P = 0.001$; Kruskal–Wallis test followed by Games–Howel test post hoc analysis). At P60, the number of PKC γ -ir interneurons was significantly lower than those at all other ages [P3–5 ($P = 0.001$), P6–10 ($P < 0.001$), P11–15 ($P = 0.001$), and P16–20 ($P = 0.003$), Kruskal–Wallis test followed by Games–Howel test post hoc analysis].

To test whether changes in PKC γ -ir interneuron numbers were actually due to age-dependent variations in the very size of laminae, we measured the area of each lamina at the different ages. No significant changes in the laminae Ilo, Ili, and III sizes were observed from P3–5 to P60 ($P > 0.05$; Unpaired t -test). Only the area of lamina I increased with age ($P = 0.005$; Unpaired t -test), but the number of PKC γ interneurons relative to the evolution of the total lamina I area did not change with age ($P = 0.9$; Unpaired t -test).

Together, these results show that the development of PKC γ -ir interneurons is different according to the lamina of the MDH and displays a critical period at P11–15. The number of PKC γ -ir interneurons increases in lamina Ili during the two first postnatal weeks decreases in laminae III during the third week until P60 and does not change in lamina I and Ilo. Thus, at the first postnatal days, PKC γ -ir interneurons are almost exclusively confined to laminae I (41%) and III (51%), while in adult rats, PKC γ -ir interneurons are mainly concentrated in lamina Ili (72%), only scattered interneurons being present in the other laminae.

Postnatal Development of the Soma of PKC γ -ir Interneurons within Laminae Ili and III

Because PKC γ -ir interneurons within laminae Ili and III showed significant developmental changes, we analyzed their morphology only in these two laminae. PKC γ -ir interneurons in lamina Ili were previously shown to have three clearly distinct morphological soma shapes: spherical, fusiform and multipolar (Li et al., 1999; Ni et al., 2002). Spherical morphology is characterized by a circular shape with analogous dorso-ventral and medio-lateral diameters. Fusiform morphology has a typical spindle-like shape cell body, whereas a shape with multiple neuritic arborizations or unclassified in the two previous categories is called multipolar [Fig. 4(A)]. At early age, the three morphology types of soma were clearly distinguishable in lamina Ili as well as in lamina III [Fig. 4(B); arrows, arrowhead and stars]. The proportion of each morphological type revealed that PKC γ -ir interneurons with spherical soma shape were more numerous than those with fusiform or multipolar soma

shapes in both laminae and at all developmental ages [Fig. 4(C)]. In addition, fusiform PKC γ -ir interneurons were more abundant than multipolar ones at all postnatal days except in lamina III at P60.

As indicated above, the number of PKC γ -ir interneurons decreased in lamina III and conversely increased in lamina Ili with age (Fig. 3). Thus, we examined whether the three types of PKC γ -ir interneuron soma shape followed a similar pattern of maturation. Quantification analysis revealed that PKC γ -ir interneurons with spherical, fusiform and multipolar soma shapes significantly increased in lamina Ili from P6–10 to P60 [$P < 0.001$, $P = 0.01$, and $P = 0.003$, respectively, Kruskal–Wallis test; Fig. 4(D)]. We also found two main periods of progression: the first period from P6–10 to P11–15 characterized by a significant increase in the number of PKC γ -ir interneurons with fusiform, spherical, or multipolar soma shape and the second one from P11–15 to P60 characterized by no change in the number of PKC γ -ir interneurons. In lamina III, the number of PKC γ -ir interneurons with spherical and fusiform soma shapes significantly decreased from P3–5 to P60 ($P = 0.003$ and $P < 0.001$, respectively, Kruskal–Wallis test), whereas no significant change was observed for PKC γ -ir interneurons with multipolar soma shape from P3–5 to P60 ($P = 0.24$, Kruskal–Wallis test).

Neurogenesis in the MDH

To investigate the possibility that the increase in lamina Ili PKC γ -ir interneuron number was due to cell proliferation, we injected 5-Bromo-2-deoxyuridine (BrdU) in newborn rats. All animals were examined for putative BrdU/PKC γ double-labeled neurons within the MDH at the different survival times.

First, some BrdU cells were found in all laminae one day after the first injection, indicating that cell divisions had already occurred at this time. Among sections from 7 BrdU-injected animals, a total of 34 BrdU-positive cells located either in lamina Ili or in lamina III were intimately associated with PKC γ -ir interneurons [Fig. 5(A), arrows]. Analysis of the spectral intensity profile of each putative colocalized BrdU/PKC γ neurons revealed a very close position between BrdU positive cells and PKC γ -ir interneurons [Fig. 5(B)], but BrdU/PKC γ -immunoreactivities were never colocalized in any of the sections that were examined. Two examples of such neurons are illustrated in Figure 5(C,D). On one PKC γ -ir interneuron located in lamina Ili [Fig. 5(A1,C)], the spectral profile on the XY plan along the arrow showed overlap between PKC γ and BrdU labelings. However, analysis of the spectral intensity profile on YZ and

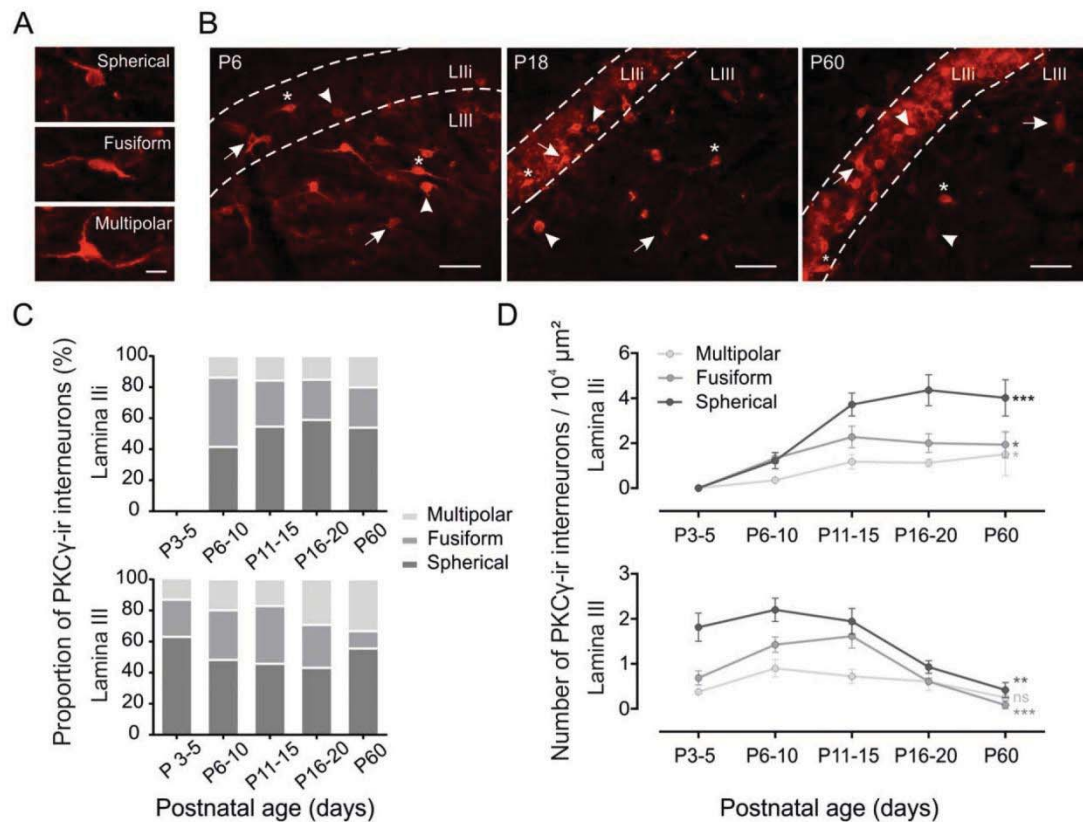


Figure 4 Quantitative evolution of PKC γ -ir interneurons according to their soma morphology. A: Photomicrographs showing three types of cell body: spherical with a circular shape, fusiform with a spindle-like shape, and multipolar with multiple neuritic arborizations. Scale bar = 20 μ m. B: Photomicrographs of sections through lamina IIi (LIIi) and lamina IIIi (LIII) taken at 6, 18, and 60 postnatal days. The three types of soma spherical (arrow head), fusiform (asterisk), and multipolar (arrow) are visible in LIIi and LIII at all developmental ages. Scale bar = 50 μ m. C: Proportion of PKC γ -ir interneurons in LIIi (up) and LIII (down) according to the soma shape. PKC γ -ir interneurons with spherical soma are more abundant than fusiform or multipolar types. Data are expressed as percentage of the total number of PKC γ -ir interneurons. D: Curves representing the postnatal evolution of PKC γ -ir interneurons number (/10⁴ μ m²) according to the morphology of the soma in LIIi (up) and LIII (down). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Kruskal–Wallis test. All the data are expressed as mean $\pm$ SEM. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

XZ plans showed that the BrdU nucleus was only closely associated with PKC γ -ir and thus an absence of overlapping. Another PKC γ -ir interneuron located in lamina III was examined for colocalization of PKC γ and BrdU [Fig. 5(A2,D)]. While an overlapping seemed to be present on the XY plan, the spectrum of BrdU immunolabeling overflowed that of the PKC γ -ir interneuron on the YZ and XZ orthogonal views, suggesting that the BrdU labeled nucleus was located over the PKC γ -ir interneurons. Therefore, no evidence for PKC γ -ir interneuron neurogenesis was found in the superficial laminae of the MDH.

Postnatal Development of NeuN-ir Neurons in the Superficial Laminae of the MDH

To study whether the development of PKC γ -ir interneurons was related to the evolution of the overall population of neurons, we quantified the number of NeuN-ir neurons in laminae I–III of the MDH at the different postnatal ages (Fig. 6).

The analysis revealed that the number of NeuN-ir neurons declined from P3–5 to P11–15 in all superficial laminae of the MDH [Fig. 6(A,B); Table 1; Kruskal–Wallis test followed by the Games–Howell test post hoc analysis]. At P11–15, the number of NeuN-ir

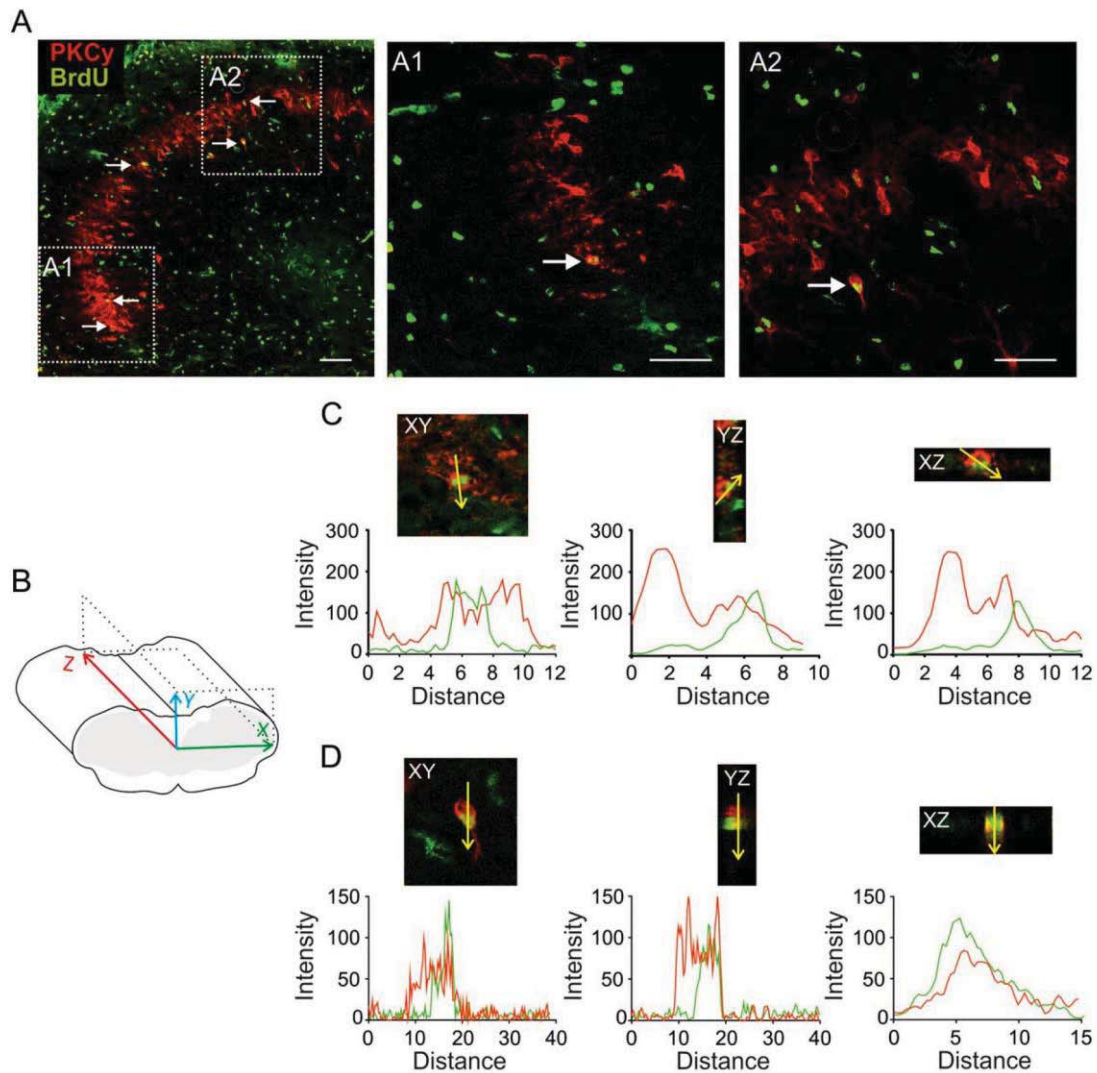


Figure 5 Analysis of BrdU and PKC γ labelings. A: The left pannel shows double-exposure photomicrographs ($\times 10$ magnification) illustrating BrdU-ir nuclei (green) and PKC γ -ir interneurons (red) in the MDH of rat that were allowed to survive 16 days. Arrows indicate PKC γ -ir interneurons that seem to be colocalized with BrdU. Scale bar = 100 μm . The right pannels illustrate a higher magnification ($\times 40$) of two putative colocalizations: one in lamina Ii (A1) and another in lamina Iii (A2). Scale bar = 50 μm . B: Representation of the 3 orthogonal plans through the MDH. C,D: PKC γ -ir interneurons located in lamina Ii (C) and lamina Iii (D). BrdU immunoreactivities in orthogonal views were created from Z-series at $\times 40$ magnification. Spectral intensity profile are overlayed in each case. The analysis along the yellow arrow provides evidence of none colocalisation but superposition of the two cells. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

neurons was reduced by $36.9\% \pm 4.4\%$ ($P = 0.159$; from 46.01 ± 5.2 neurons/ $10^4 \mu\text{m}^2$ at P3–5 to 29.03 ± 2.1 neurons/ $10^4 \mu\text{m}^2$ at P11–15), $46.6\% \pm 3.3\%$ ($P = 0.002$; from 56.9 ± 2.8 neurons/ $10^4 \mu\text{m}^2$ at P3–5 to 30.38 ± 2.8 neurons/ $10^4 \mu\text{m}^2$ at P11–15),

$47.0\% \pm 3.3\%$ ($P < 0.001$; from 46.01 ± 1.8 neurons/ $10^4 \mu\text{m}^2$ at P3–5 to 24.38 ± 1.5 neurons/ $10^4 \mu\text{m}^2$ at P11–15), and $47.2\% \pm 2.8\%$ ($P = 0.034$; from 53.25 ± 4.5 neurons/ $10^4 \mu\text{m}^2$ at P3–5 to 28.13 ± 1.4 neurons/ $10^4 \mu\text{m}^2$ at P11–15), in laminae I, Ii, Iii,

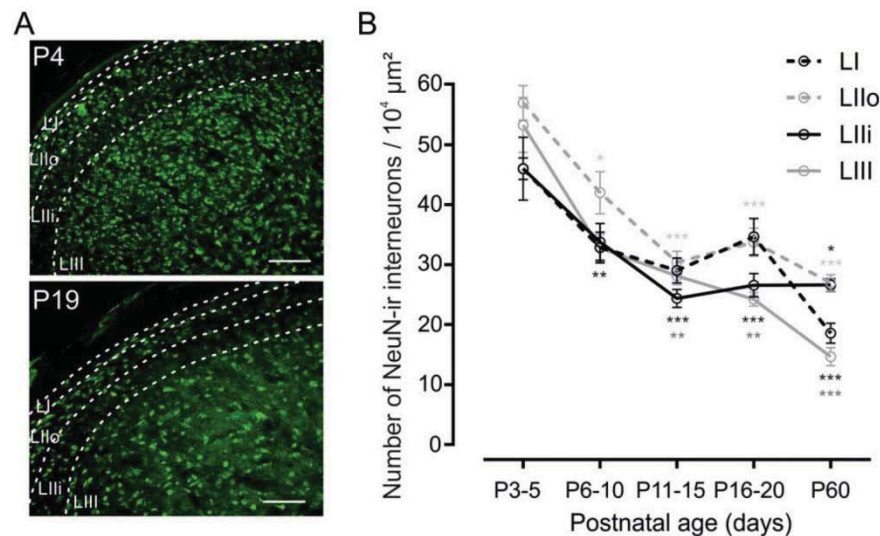


Figure 6 Developmental changes in the neuronal density ($/10^4 \mu\text{m}^2$) in the MDH as function of postnatal age. A: Photomicrographs showing the NeuN-ir neurons at two postnatal days. (P4 and P19). Scale bar = 100 μm . Lamina I (LI), outer and inner lamina II (LIIo and LIIi), lamina III (LIII). B: Curves representing the quantitative evolution of NeuN-ir neurons in LI, LIIo, LIIi, and LIII. The number of NeuN-ir neurons decrease significantly with age in all laminae of the MDH. Significant differences to values at P3–5 are indicated by *. Statistics located above the curves correspond to lamina I and Ilo and those below correspond to lamina Ili and III. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Kruskal–Wallis, Games and Howell post-test. All the data are expressed as mean $\pm$ SEM. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

and III, respectively. After, the developmental changes varied according to laminae (Table 1). In both laminae I and III, the density of NeuN-ir neurons further decreased ($P = 0.028$ and $P = 0.004$; respectively), whereas it remained stable in laminae Ilo and Ili ($P = 0.61$ and $P = 0.74$, respectively). Because the very size of laminae Ilo, Ili, and III did not change with age, the number of NeuN neurons relative to the total area of each laminae decrease. It is noteworthy that the age-dependent enlargement in

laminal I did not lead to any significant reduction in neuronal density.

Correlation analysis of the developmental changes in NeuN-ir neurons and PKC γ -ir interneurons found broad different relationships according to laminae. From P3–5 to P60, there was no significant relationships between densities of NeuN-ir neurons and PKC γ -ir interneurons in laminae I (Spearman's $r = 0.04$, $P = 0.28$) and Ilo (Spearman's $r = -0.03$, $P = 0.29$). A very highly significant positive

Table 1 Postnatal Reduction in Number of NeuN-ir Neurons in the Superficial Laminae of the Medullary Dorsal Horn

	Postnatal Age (days)			
	P6–10 (<i>n</i> = 10)	P11–15 (<i>n</i> = 8)	P16–20 (<i>n</i> = 8)	P60 (<i>n</i> = 3)
All laminae	29.9 $\pm$ 2.8***	44.4 $\pm$ 1.8***	40.5 $\pm$ 2.8***	56.7 $\pm$ 3.5***§
Lamina I	28.5 $\pm$ 5.5	36.9 $\pm$ 4.4	24.6 $\pm$ 6.6	59.6 $\pm$ 3.6*
Lamina Ilo	26.2 $\pm$ 6.2*	46.6 $\pm$ 3.3**	40.7 $\pm$ 4.1**	52.6 $\pm$ 2.4**
Lamina Ili	26.5 $\pm$ 6.7*	47.0 $\pm$ 3.3***	42.2 $\pm$ 4.2***	42.1 $\pm$ 2.3**
Lamina III	38.5 $\pm$ 4.2	47.2 $\pm$ 2.8*	54.5 $\pm$ 2.1*	72.4 $\pm$ 2.8**§

% reduction compared with P3–5. Significance * < 0.05 , ** < 0.01 , *** < 0.001 compared with P3–5; Significance § < 0.05 , compared with P11–15 (Kruskal–Wallis test followed by the Games–Howell test post hoc analysis).

correlation were found in laminae III (Spearman's $r = 0.24$, $P = 0.003$), suggesting a relation between the decline of NeuN-ir neuron and PKC γ -ir interneurons in this lamina from P3–5 to P60. In contrast, a significant negative correlation was found in lamina III (Spearman's $r = -0.23$, $P = 0.003$), suggesting that the developmental changes in the number of PKC γ -ir interneurons in lamina III is not related to the postnatal changes in the total number of neurons in the MDH. Moreover, correlation analysis performed between P3–5 and P11–15 found no relationship in the development of NeuN-ir neurons and PKC γ -ir interneurons in laminae I (Spearman's $r = 0.09$, $P = 0.15$), lamina IIo (Spearman's $r = -0.16$, $P = 0.06$), and lamina III (Spearman's $r = -0.03$, $P = 0.44$) but only a negative correlation was observed in lamina III (Spearman's $r = -0.51$, $P < 0.001$). This suggests that during the two first postnatal weeks, the development of PKC γ -ir interneurons is not related to the evolution of the overall population of neurons.

Postnatal Development of PKC γ -ir Interneurons in the MDH of Neonatal Capsaicin-Treated Rats

To investigate whether the C-fiber development has an impact on the development of PKC γ -ir interneurons,

we used neonatal capsaicin treatment as a tool to destroy these fibers. First, the efficiency of this treatment was evaluated on postnatal day 18 with the "eye-wiping test". The number of eye-wipes in response to eye instillation of 0.01% capsaicin was markedly and significantly ($P = 0.002$) reduced in the capsaicin-treated group compared with the vehicle-treated group [Fig. 7(A)]. While the rats in the vehicle-treated group showed 14.5 ± 2.0 eye wipes following capsaicin application ($n = 4$), those in the capsaicin-treated group showed only 6.8 ± 1.8 eye wipes ($n = 4$). Rats in both treatment groups showed a limited number of eye wipes in response to instillation of the solvent (ranging from 2 to 4 eye wipes in both capsaicin- and vehicle-treated groups). The numbers of eye wipes following solvent instillation were not significantly different between capsaicin-treated and vehicle-treated rats, and, in the capsaicin-treated rats, the numbers of eye wipes following capsaicin and solvent instillation were not significantly different [Fig. 7(A)]. These results confirm that sensory nerves activated by capsaicin (i.e., those expressing TRPV1 receptors) were abolished in the capsaicin-treated group. We quantified the number of PKC γ -ir interneurons in all laminae in vehicle- and capsaicin-treated rats on postnatal day 21 [Fig. 7(B)]. We did not find any significant change in the total number of PKC γ -ir interneurons between vehicle- and capsaicin-treated rats. Similarly, the total

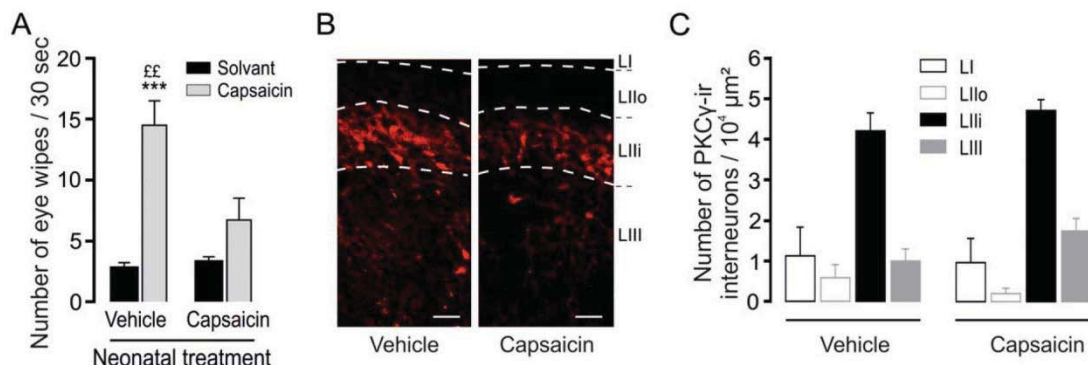


Figure 7 Effect of neonatal capsaicin treatment on PKC γ -ir interneurons development. A: Number of eye wipes within 30 seconds after eye instillation (i.s.) of 0.01% capsaicin or solvent into either eye. Capsaicin and vehicle responses measured in 4 capsaicin-treated and 4 vehicle-treated rats, respectively. ***, $P < 0.001$; versus capsaicin (i.s.) in vehicle-treated rats and vs. solvent (i.s.) in both capsaicin- and vehicle-treated rats; ££, $P < 0.01$ versus capsaicin (i.s.) in vehicle-treated rats and versus capsaicin (i.s.) in capsaicin-treated rats (Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc correction). B: Photomicrographs showing the PKC γ -ir interneurons at postnatal days 21. Scale bar = 50 μ m. C: Histogram representing the mean number of PKC γ -ir interneurons in Lamina I (LI), outer and inner lamina II (LIIo and LIIi), and lamina III (LIII) measured in vehicle- ($n = 4$) and capsaicin- ($n = 4$) treated rats on postnatal day 21. No significant difference is observed between the two groups. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

neuron number (NeuN-ir neurons) in the superficial laminae of the MDH did not differ between the two groups (data not shown). These results suggest that C-fiber development does not influence the development of PKC γ interneurons in the superficial laminae of the MDH.

DISCUSSION

This study provides the first detailed description of the postnatal development of PKC γ -ir interneurons in MDH. It shows that the development of PKC γ -ir interneurons depends not only on age, but also on location within the laminae of MDH. In laminae I, Ilo, and III, PKC γ -ir interneurons are already present at P3, but their density then either decreases (lamina III) or does not change (laminae I, Ilo). Conversely, in lamina Ili, PKC γ -ir interneurons appear only at P6–10 and rapidly increase until P11–15, nearly their adult level. Neither neurogenesis nor migration of PKC γ -ir interneurons from other laminae can account for such enhancement in the number of PKC γ -ir interneurons within lamina Ili. Finally, neonatal capsaicin treatment, which produces a permanent loss of most unmyelinated fibers, has no effect on the development of PKC γ -ir interneurons.

Spatio-Temporal Development of PKC γ Interneurons

Embryonic and postnatal PKC γ expression have been previously investigated in the rat and mouse SDHs. However, the few available data are conflicting. In rats, Akinori (1998) found that PKC γ -ir is present prenatally in neuronal somata and the number of PKC γ -ir neurons gradually declines after birth. Conversely, Sweitzer et al. (2004) reported that PKC γ -ir interneurons increase with postnatal age, becoming localized to lamina II: there is an approximately two-fold increase in the number of PKC γ -ir interneurons between P7 and P14 and a further 2.0-fold increase between P14 and P21. In mice, PKC γ -ir interneurons were detected either at P0 (Huang et al., 2015), P2 (Chen et al., 2001), or P7 (Malmberg et al., 1997a, 1997b). And PKC γ -ir was reported to either increase, being maximum at P28 (Malmberg et al., 1997a, 1997b) or decrease progressively from P0 to P21 (Huang et al., 2015).

The present study finds that PKC γ -ir in MDH also changes with age. The number of PKC γ -ir interneurons in lamina Ili increases rapidly between P6–10 and P11–15 and has nearly reached adult levels at this age. Such postnatal development is slightly

different from that in SDH but similar to that of PKC γ -expression in the brain: relatively low during early postnatal days, it plateaus at nearly the adult level after P14 (Hashimoto et al., 1988). The quicker development of PKC γ -ir interneurons in MDH than in SDH might be related to differences in the development of descending pathways. For instance, postnatal maturation of the descending serotonergic system, which is known to modulate the excitability of PKC γ -ir interneurons (Chen et al., 2006; Aira et al., 2012, 2013), follows a rostral-caudal gradient: 5-HT immunoreactivity reaches its adult pattern by P14 in the cervical SDH and P21 in the lumbar SDH (Bregman, 1987; Rajaofetra et al. 1989). Similarly, changes in the brainstem rostro-ventral medulla descending control are also observed during this period (Hathway et al., 2009). Consistent with this progressive development of descending inputs, the effect of analgesic treatment has been shown to be different according to the rostro-caudal location of the noxious stimulus (within the forepaw versus the hindpaw or tail; Barr et al., 1992).

Interestingly, we report for the first time that the postnatal development of PKC γ -ir interneurons also depends on their location in the different laminae of MDH. PKC γ -ir interneurons are detected earlier (at P3–5) in laminae I, Ilo, and III than in lamina Ili (at P6–10). Moreover, in the former, their density slightly decreases or even does not change afterward, while, in the latter, it strongly increases to reach adult pattern at P11–15. Such heterogeneous postnatal development strongly suggests that there are several subclasses of PKC γ -ir interneurons. Consistently, there must be at least two functional classes of PKC γ -ir interneurons according to their lamina localization: the nociceptive specific ones located within laminae I and Ilo that receive mainly nociceptive inputs from small-diameter thinly myelinated A δ or unmyelinated C-fibers, and non-nociceptive ones located within laminae Ili-III that receive low-threshold inputs from large-diameter, more heavily myelinated A β -fibers (Todd, 2010). PKC γ interneurons have also been classified based on their expression of neurochemical markers: PKC γ -ir is present in 76% of cells with neurotensin and 45% of those with somatostatin (Polgár et al., 1999). Neurons in laminae I and III of the DH express the neurokinin 1 receptor (NK1R): 22% and 37%, respectively, of these NK1R-neurons are also PKC γ -ir (Polgár et al., 1999). Of note, the postnatal development of PKC γ -ir interneurons in lamina Ili is consistent, not with those of peptides such as somatostatin, substance P, or enkephalins, which are already present before birth, but only with that of neurotensin (Senba et al., 1982,

Minagawa et al., 1983). Finally, our group recently provided evidence for at least two morphologically and electrophysiologically different subpopulations of lamina III PKC γ -ir interneurons: central and radial (Alba-Delgado et al., 2015). Altogether, this suggests that the various neurochemical, morphological and functional sub-classes of PKC γ -ir interneurons develop at different pace.

Mechanisms of Developmental Changes of PKC γ Interneurons

The changes in the distribution of PKC γ -ir interneurons in MDH might result from a number of mechanisms: selective cell death, migration of cells, neurogenesis, differentiation, or a phenotypic switch of differentiated cells from a negative to a positive phenotype.

To understand the different postnatal changes in PKC γ -ir interneurons between laminae of the MDH, we investigated the postnatal changes in the neuronal density within MDH and examined how these changes are related with those of PKC γ -ir interneurons. As previously shown in the rat principal trigeminal nucleus (Miller and Al-Ghoul, 1993) and SDH (Man et al., 2012; Fu et al., 2013), the density of NeuN-ir neurons in all laminae decreases with postnatal age. In our study, most of this decrease (~50%) occurs early, between P3–5 and P11–15. Then, the neuronal density remains relatively stable in laminae Ilo and Ili, while it further decreases between P16–20 and P60 in laminae I and III. A possible explanation for this decrease is cell death, which occurs in all parts of the trigeminal nuclear complex throughout the postnatal period, during approximately 15 days (Ashwell and Waite, 1991). Cell death has been also described in different CNS regions including the spinal cord (Lowrie and Lawson, 2000), the superior colliculus (Finlay et al., 1982), and the cerebral cortex (Al-Ghoul and Miller, 1989). During early development (P3–15), correlation analysis reveals no relationships between the variations in PKC γ -ir interneurons and NeuN-ir in laminae I, Ilo, and III, but a negative correlation was found in lamina Ili: whereas the density of PKC γ -ir interneurons strongly increased, that of NeuN-ir neurons decreased. This suggests that the acquisition of a PKC γ phenotype protects against cell death. Interestingly, such relation was specific of lamina Ili as it was not observed in laminae I, Ilo, and III.

Another possibility is that changes in the distribution of PKC γ -ir interneurons in MDH, particularly the rise within lamina Ili, result from cell migrations of PKC γ -ir interneurons located in lamina III. This is unlikely since the changes in both laminae are no concomitant: when PKC γ -ir interneurons increase

within lamina Ili during early development (from P3–5 to P11–15), the number of PKC γ -ir interneurons in lamina III remain stable during the same period.

Neurogenesis, defined as a process of generating functional neurons from precursors, was traditionally viewed to occur only during embryonic and perinatal stages in the spinal cord (Ming and Song, 2005, 2011; Taupin, 2006). In 2000, Horner et al. confirmed that newly generated cells in the spinal cord express markers of both immature and mature glial cells, astrocytes and oligodendrocytes, but not of neurons. However, a more recent study identified neurogenesis in healthy adult spinal cord (Shechter et al., 2007). These neurons express a GABAergic phenotype and are primarily confined to the SDH. In the present study, we considered the possibility that the rise in density of PKC γ -ir interneurons is related to some form of neurogenesis within MDH. However, using the BrdU as a marker for dividing cells, we could not detect any PKC γ -BrdU double-labeling. Interestingly, Shechter et al. (2011) found recently that very few or none of the newly formed cells co-label with either calretinin or calbindin (Shechter et al., 2011). As the vast majority of PKC γ -ir interneurons as well as calretinin-ir and calbindin-ir ones are excitatory in the SDH and MDH (Todd, 2010), it is therefore possible that neurogenesis is mainly restricted to SDH/MDH inhibitory interneurons.

The alternative to neurogenesis in lamina Ili and cell death in lamina III could be the late acquisition and the loss of PKC γ phenotype, respectively. In lumbar dorsal root ganglia of rats, an increase in the number of neurons immunoreactive to either substance P or calcitonin-gene-related peptide or that bound the lectin isolectin B4 through the course of postnatal development was shown to be due to a late differentiation (Farel, 2002, 2003). In our study, existing precursor cells in lamina Ili could thus progressively acquire their final PKC γ phenotype during the two first postnatal weeks, whereas PKC γ expression could progressively be reduced in lamina III-located interneurons. However, further studies are needed to identify factors that regulate the postnatal spatio-temporal changes in PKC γ interneurons within MDH.

Postnatal Development of PKC γ Interneurons is Independent of C-Fiber Inputs

There is increasing evidence for postnatal maturation of the SDH being activity-dependent. For instance, the normal postnatal structural and functional development of A-fiber sensory connectivity within SDH

requires functional connections between C-fibers and SDH neurons (Beggs et al., 2002). Similarly, the maturation of glycinergic inhibition within SDH also depends on postnatal activity in peripheral C-fibers (Koch and Fitzgerald, 2013). As the onset of PKC γ -ir within lamina III coincides with the increase in C-fiber inputs into SDH, we hypothesized a causal link between the two phenomena. To test this hypothesis, we investigated the effect of neonatal capsaicin treatment, which produces a permanent loss of most unmyelinated fibers with minimal effect on myelinated ones (Holzer, 1991; Szallasi, 1994), on the maturation of PKC γ -ir interneurons. Neonatal capsaicin treatment had no effect on the development of PKC γ -ir interneurons in MDH. Similarly, enkephalin and neurotensin interneurons were not affected by capsaicin (Priestley et al., 1982), whereas endomorphin and CCK-like immunoreactivity, which were mainly expressed by primary afferents, were depleted by capsaicin (Jancsó et al., 1981; Priestley et al., 1982; Zhu et al., 2011). It is unlikely that capsaicin treatment had not enough suppressed unmyelinated fibers as the eye-wiping behavior in response to capsaicin instillation had almost completely disappeared in capsaicin-treated rats. These results suggest that C-fiber afferents are not necessary for triggering postnatal development of PKC γ -ir interneurons. This is not consistent with previous findings showing that *Drg11*, a homeodomain transcription factor that selectively regulates the development of cutaneous primary sensory afferents to SDH is required for the development of PKC γ -ir interneurons in lamina III (Chen et al., 2001). However, as in this report, PKC γ expression was only analyzed at P5, the loss of PKC γ expression may reflect a transiently defective differentiation, rather than a selective cell death. Of note, *Drg11* was shown to be necessary for the development of the principal sensory nucleus of the trigeminal nerve, but not for MDH (Ding et al., 2003; Jacquin et al., 2008). Accordingly, *Drg11*^{-/-} mice display a normal number of proprioceptive neurons within DRGs (Chen et al., 2001; Rebelo et al., 2006), while mesencephalic trigeminal nucleus neurons are missing (Wang et al., 2007). Thus, *Drg11* appears to be differentially involved in the development of sensory neurons from the orofacial region and the body. This may reflect another difference in the mechanism underlying the development of the trigeminal and spinal systems.

Functional Implications

In neonatal rats, nociception is different compared with the adults (Fitzgerald, 2005; Nandi and

Fitzgerald, 2005). For example, neuropathic pain in adults is not fully functional in juvenile animals (Holmberg and Schouenborg, 1996; Fitzgerald, 2005). Likewise, mechanical allodynia induced by peripheral nerve injury did not develop if injury was performed before 3 weeks of age (Howard et al., 2005). Thus, different pain sensibility in neonatal compared with adult rats may be underlied by the many developmental changes in nociceptive circuitry (Fitzgerald, 2005), such as modifications of dorsal horn neurons electrophysiological properties during the postnatal period (Walsh et al., 2009), maturation of descending and local synaptic connections (Fitzgerald and Koltzenburg, 1986; Curfs et al., 1994; Park et al., 1999), or even appearance/disappearance of neurons or proteins involved in pain (Charlton and Helke, 1986; Kar and Quirion, 1995; Nandi et al., 2004). In our study, we show that PKC γ -ir interneurons evolve differently according to the lamina in the MDH: they reach maturity early in lamina I and IIo, at P11-15 in lamina III and after P21 in lamina III, suggesting PKC γ -ir interneurons maturation could contribute to the different pain sensibility in neonatal compared with adult rats.

We are very grateful to A Artola for useful discussion and careful reading of the manuscript. The authors also thank A Descheemaeker for technical assistance and A.M. Gaydier for secretarial assistance.

REFERENCES

- Aira Z, Buesa I, García del Caño G, Salgueiro M, Mendiabale N, Mingo J, Aguilera L, et al. 2012. Selective impairment of spinal mu-opioid receptor mechanism by plasticity of serotonergic facilitation mediated by 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors. *Pain* 153:1418–1425.
- Aira Z, Buesa I, García del Caño G, Bilbao J, Doñate F, Zimmermann M, Azkue JJ. 2013. Transient, 5-HT_{2B} receptor-mediated facilitation in neuropathic pain: Up-regulation of PKC γ and engagement of the NMDA receptor in dorsal horn neurons. *Pain* 154:1865–1877.
- Akinori M. 1998. Subspecies of protein kinase C in the rat spinal cord. *Prog Neurobiol* 54:499–530.
- Alba-Delgado C, El Khoueiry C, Peirs C, Dallel R, Artola A, Antri M. 2015. Subpopulations of PKC γ interneurons within the medullary dorsal horn revealed by electrophysiologic and morphologic approach. *Pain* 156:1714–1728.
- Al-Ghoul WM, Miller MW. 1989. Transient expression of Alz-50 immunoreactivity in developing rat neocortex: A marker for naturally occurring neuronal death? *Brain Res* 481:361–367.
- Ambalavanar R, Morris R. 1992. The distribution of binding by isolectin I-B4 from Griffonia simplicifolia in the

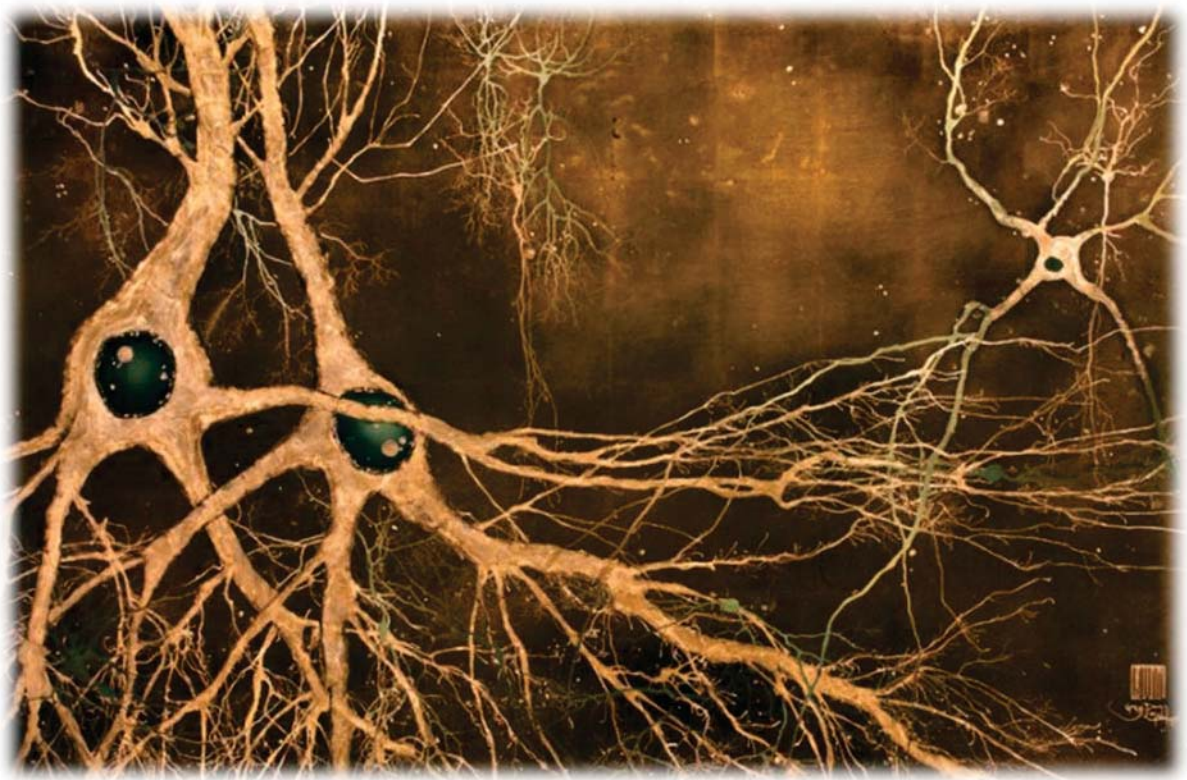
- trigeminal ganglion and brainstem trigeminal nuclei in the rat. *Neuroscience* 47:421–429.
- Ashwell KW, Waite PM. 1991. Cell death in the developing trigeminal nuclear complex of the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 63:291–295.
- Barr GA, Miya DY, Paredes W. 1992. Analgesic effects of intraventricular and intrathecal injection of morphine and ketocyclazocine in the infant rat. *Brain Res* 584:83–91.
- Beggs S, Torsney C, Drew LJ, Fitzgerald M. 2002. The postnatal reorganization of primary afferent input and dorsal horn cell receptive fields in the rat spinal cord is an activity-dependent process. *Eur J Neurosci* 16:1249–1258.
- Bereiter DA, Hirata H, Hu JW. 2000. Trigeminal subnucleus caudalis: Beyond homologies with the spinal dorsal horn. *Pain* 88:221–224.
- Bregman BS. 1987. Development of serotonin immunoreactivity in the rat spinal cord and its plasticity after neonatal spinal cord lesions. *Brain Res* 431:245–263.
- Charlton CG, Helke CJ. 1986. Ontogeny of substance P receptors in rat spinal cord: Quantitative changes in receptor number and differential expression in specific loci. *Brain Res* 394:81–91.
- Chen ZF, Rebelo S, White F, Malmberg AB, Baba H, Lima D, Woolf CJ, et al. 2001. The paired homeodomain protein *drg11* is required for the projection of cutaneous sensory afferent fibers to the dorsal spinal cord. *Neuron* 31:59–73.
- Chen X, Bing F, Dai P, Hong Y. 2006. Involvement of protein kinase C in 5-HT-evoked thermal hyperalgesia and spinal fos protein expression in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 84:8–16.
- Coggeshall RE. 1992. A consideration of neural counting methods. *Trends Neurosci* 15:9–13.
- Curfs MH, Gribnau AA, Dederen PJ. 1994. Selective elimination of transient corticospinal projections in the rat cervical spinal cord gray matter. *Brain Res Dev Brain Res* 78:182–190.
- Ding YQ, Yin J, Xu HM, Jacquin MF, Chen ZF. 2003. Formation of whisker-related principal sensory nucleus-based lemniscal pathway requires a paired homeodomain transcription factor, *Drg11*. *J Neurosci* 23:7246–7254.
- Farel PB. 2002. Sensory neuron addition in juvenile rat: Time course and specificity. *J Comp Neurol* 449:158–165.
- Farel PB. 2003. Late differentiation contributes to the apparent increase in sensory neuron number in juvenile rat. *Brain Res Dev Brain Res* 144:91–98.
- Finlay BL, Berg AT, Sengelaub DR. 1982. Cell death in the mammalian visual system during normal development: II. Superior colliculus. *J Comp Neurol* 204:318–324.
- Fitzgerald M. 2005. The development of nociceptive circuits. *Nat Rev Neurosci* 6:507–520.
- Fitzgerald M, Koltzenburg M. 1986. The functional development of descending inhibitory pathways in the dorso-lateral funiculus of the newborn rat spinal cord. *Brain Res* 389:261–270.
- Fu Y, Rusznák Z, Herculano-Houzel S, Watson C, Paxinos G. 2013. Cellular composition characterizing postnatal development and maturation of the mouse brain and spinal cord. *Brain Struct Funct* 218:1337–1354.
- Hashimoto T, Ase K, Sawamura S, Kikkawa U, Saito N, Tanaka C, Nishizuka Y. 1988. Postnatal development of a brain-specific subspecies of protein kinase C in rat. *J Neurosci* 8:1678–1683.
- Hathway GJ, Koch S, Low L, Fitzgerald M. 2009. The changing balance of brainstem-spinal cord modulation of pain processing over the first weeks of rat postnatal life. *J Physiol (Lond)* 587:2927–2935.
- Holmberg H, Schouenborg J. 1996. Postnatal development of the nociceptive withdrawal reflexes in the rat: A behavioural and electromyographic study. *J Physiol (Lond)* 493:239–252.
- Holzer P. 1991. Capsaicin: Cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* 43:143–201.
- Horner PJ, Power AE, Kempermann G, Kuhn HG, Palmer TD, Winkler J, Thal LJ, et al. 2000. Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J Neurosci* 20:2218–2228.
- Howard RF, Walker SM, Mota PM, Fitzgerald M. 2005. The ontogeny of neuropathic pain: Postnatal onset of mechanical allodynia in rat spared nerve injury (SNI) and chronic constriction injury (CCI) models. *Pain* 115:382–389.
- Huang L, Xian Q, Shen N, Shi L, Qu Y, Zhou L. 2015. Congenital absence of corticospinal tract does not severely affect plastic changes of the developing postnatal spinal cord. *Neuroscience* 301:338–350.
- Jacquin MF, Arends JJA, Xiang C, Shapiro LA, Ribak CE, Chen Z-F. 2008. In *DRG11* knock-out mice, trigeminal cell death is extensive and does not account for failed brainstem patterning. *J Neurosci* 28:3577–3585.
- Jancsó G, Hökfelt T, Lundberg JM, Kiraly E, Halász N, Nilsson G, Terenius L, et al. 1981. Immunohistochemical studies on the effect of capsaicin on spinal and medullary peptide and monoamine neurons using antisera to substance P, gastrin/CCK, somatostatin, VIP, enkephalin, neurotensin and 5-hydroxytryptamine. *J Neurocytol* 10:963–980.
- Kaplan S, Odacı E, Canan S, Onger ME, Aslan H, Unal B. 2011. The disector counting technique. *NeuroQuantology* 10:425.
- Kar S, Quirion R. 1995. Neuropeptide receptors in developing and adult rat spinal cord: An in vitro quantitative autoradiography study of calcitonin gene-related peptide, neurokinins, mu-opioid, galanin, somatostatin, neurotensin and vasoactive intestinal polypeptide receptors. *J Comp Neurol* 354:253–281.
- Kayser V, Viguier F, Ioannidi M, Bernard J-F, Latrémolière A, Michot B, Vela J-M, et al. 2010. Differential anti-neuropathic pain effects of tetrodotoxin in sciatic nerve- versus infraorbital nerve-ligated rats—behavioral, pharmacological and immunohistochemical investigations. *Neuropharmacology* 58:474–487.
- Koch SC, Fitzgerald M. 2013. Activity-dependent development of tactile and nociceptive spinal cord circuits. *Ann N Y Acad Sci* 1279:97–102.

- Latrémolière A, Mauborgne A, Masson J, Bourgoin S, Kayser V, Hamon M, Pohl M. 2008. Differential implication of proinflammatory cytokine interleukin-6 in the development of cephalic versus extracephalic neuropathic pain in rats. *J Neurosci* 28:8489–8501.
- Li YQ, Li H, Kaneko T, Mizuno N. 1999. Substantia gelatinosa neurons in the medullary dorsal horn: An intracellular labeling study in the rat. *J Comp Neurol* 411:399–412.
- Li YQ, Li JL, Li H, Kaneko T, Mizuno N. 2001. Protein kinase C gamma-like immunoreactivity of trigeminothalamic neurons in the medullary dorsal horn of the rat. *Brain Res* 913:159–164.
- Lorenzo L-E, Ramien M, St Louis M, De Koninck Y, Ribeiro-da-Silva A. 2008. Postnatal changes in the Rexed lamination and markers of nociceptive afferents in the superficial dorsal horn of the rat. *J Comp Neurol* 508:592–604.
- Lowrie MB, Lawson SJ. 2000. Cell death of spinal interneurons. *Prog Neurobiol* 61:543–555.
- Lu Y, Dong H, Gao Y, Gong Y, Ren Y, Gu N, Zhou S, et al. 2013. A feed-forward spinal cord glycinergic neural circuit gates mechanical allodynia. *J Clin Invest* 123:4050–4062.
- Malmberg AB, Brandon EP, Idzerda RL, Liu H, McKnight GS, Basbaum AI. 1997a. Diminished inflammation and nociceptive pain with preservation of neuropathic pain in mice with a targeted mutation of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Neurosci* 17:7462–7470.
- Malmberg AB, Chen C, Tonegawa S, Basbaum AI. 1997b. Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKCgamma. *Science* 278:279–283.
- Man SHW, Géranton SM, Hunt SP. 2012. Lamina I NK1 expressing projection neurones are functional in early postnatal rats and contribute to the setting up of adult mechanical sensory thresholds. *Mol Pain* 8:35.
- Marlier L, Poulat P, Rajaofetra N, Sandillon F, Privat A. 1992. Plasticity of the serotonergic innervation of the dorsal horn of the rat spinal cord following neonatal capsaicin treatment. *J Neurosci Res* 31:346–358.
- Martin WJ, Malmberg AB, Basbaum AI. 2001. PKCgamma contributes to a subset of the NMDA-dependent spinal circuits that underlie injury-induced persistent pain. *J Neurosci* 21:5321–5327.
- Michot B, Bourgoin S, Kayser V, Hamon M. 2013. Effects of tapentadol on mechanical hypersensitivity in rats with ligatures of the infraorbital nerve versus the sciatic nerve. *Eur J Pain* 17:867–880.
- Michot B, Kayser V, Bastian G, Bourgoin S, Hamon M. 2014. Differential pharmacological alleviation of oxaliplatin-induced hyperalgesia/allodynia at cephalic versus extra-cephalic level in rodents. *Neuropharmacology* 79:432–443.
- Michot B, Kayser V, Hamon M, Bourgoin S. 2015. CGRP receptor blockade by MK-8825 alleviates allodynia in infraorbital nerve-ligated rats. *Eur J Pain* 19:281–290.
- Miller MW, Al-Ghoul WM. 1993. Numbers of neurons in the developing principal sensory nucleus of the trigeminal nerve: Enhanced survival of early-generated neurons over late-generated neurons. *J Comp Neurol* 330:491–501.
- Minagawa H, Shiosaka S, Inagaki S, Sakanaka M, Takatsuki K, Ishimoto I, Senba E, et al. 1983. Ontogeny of neurotensin-containing neuron system of the rat: Immunohistochemical analysis—II. Lower brain stem. *Neuroscience* 8:467–486.
- Ming G, Song H. 2005. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 28:223–250.
- Ming G, Song H. 2011. Adult neurogenesis in the mammalian brain: Significant answers and significant questions. *Neuron* 70:687–702.
- Miracourt LS, Dallel R, Voisin DL. 2007. Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through PKCgamma interneurons. *PLoS ONE* 2:e1116.
- Miracourt LS, Moisset X, Dallel R, Voisin DL. 2009. Glycine inhibitory dysfunction induces a selectively dynamic, morphine-resistant, and neurokinin 1 receptor-independent mechanical allodynia. *J Neurosci* 29:2519–2527.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116:201–211.
- Nakao A, Takahashi Y, Nagase M, Ikeda R, Kato F. 2012. Role of capsaicin-sensitive C-fiber afferents in neuropathic pain-induced synaptic potentiation in the nociceptive amygdala. *Mol Pain* 8:51.
- Nandi R, Fitzgerald M. 2005. Opioid analgesia in the newborn. *Eur J Pain* 9:105–108.
- Nandi R, Beacham D, Middleton J, Koltzenburg M, Howard RF, Fitzgerald M. 2004. The functional expression of mu opioid receptors on sensory neurons is developmentally regulated; morphine analgesia is less selective in the neonate. *Pain* 111:38–50.
- Neumann S, Braz JM, Skinner K, Llewellyn-Smith IJ, Basbaum AI. 2008. Innocuous, not noxious, input activates PKCgamma interneurons of the spinal dorsal horn via myelinated afferent fibers. *J Neurosci* 28:7936–7944.
- Ni TS, Wu SX, Li YQ. 2002. Co-existence of protein kinase C gamma and calcium-binding proteins in neurons of the medullary dorsal horn of the rat. *Neurosignals* 11:88–94.
- Park JS, Nakatsuka T, Nagata K, Higashi H, Yoshimura M. 1999. Reorganization of the primary afferent termination in the rat spinal dorsal horn during post-natal development. *Brain Res Dev Brain Res* 113:29–36.
- Peirs C, Patil S, Bouali-Benazzouz R, Artola A, Landry M, Dallel R. 2014. Protein kinase C gamma interneurons in the rat medullary dorsal horn: Distribution and synaptic inputs to these neurons, and subcellular localization of the enzyme. *J Comp Neurol* 522:393–413.
- Polgár E, Fowler JH, McGill MM, Todd AJ. 1999. The types of neuron which contain protein kinase C gamma in rat spinal cord. *Brain Res* 833:71–80.
- Price TJ, Flores CM. 2007. Critical evaluation of the colocalization between calcitonin gene-related peptide, substance p, transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 immunoreactivities, and isolectin b4 binding in

- primary afferent neurons of the rat and mouse. *J Pain* 8: 263–272.
- Priestley JV, Bramwell S, Butcher LL, Cuello AC. 1982. Effect of capsaicin on neuropeptides in areas of termination of primary sensory neurones. *Neurochem Int* 4:57–65.
- Rajaofetra N, Sandillon F, Geffard M, Privat A. 1989. Pre- and post-natal ontogeny of serotonergic projections to the rat spinal cord. *J Neurosci Res* 22:305–321.
- Rebello S, Chen Z-F, Anderson DJ, Lima D. 2006. Involvement of DRG11 in the development of the primary afferent nociceptive system. *Mol Cell Neurosci* 33:236–246.
- Senba E, Shiosaka S, Hara Y, Inagaki S, Sakanaka M, Takatsuki K, Kawai Y, Tohyama M. 1982. Ontogeny of the peptidergic system in the rat spinal cord: Immunohistochemical analysis. *J Comp Neurol* 208:54–66.
- Sessle BJ. 2011. Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain. *Int Rev Neurobiol* 97:179–206.
- Shechter R, Ziv Y, Schwartz M. 2007. New GABAergic interneurons supported by myelin-specific T cells are formed in intact adult spinal cord. *Stem Cells* 25:2277–2282.
- Shechter R, Baruch K, Schwartz M, Rolls A. 2011. Touch gives new life: Mechanosensation modulates spinal cord adult neurogenesis. *Mol Psychiatry* 16:342–352.
- Shumilla JA, Liron T, Mochly-Rosen D, Kendig JJ, Sweitzer SM. 2005. Ethanol withdrawal-associated allodynia and hyperalgesia: Age-dependent regulation by protein kinase C epsilon and gamma isoenzymes. *J Pain* 6:535–549.
- Sugimoto T, Fujiyoshi Y, He YF, Xiao C, Ichikawa H. 1997. Trigeminal primary projection to the rat brain stem sensory trigeminal nuclear complex and surrounding structures revealed by anterograde transport of cholera toxin B subunit-conjugated and *Bandeiraea simplicifolia* isolectin B4-conjugated horseradish peroxidase. *Neurosci Res* 28:361–371.
- Sweitzer SM, Wong SME, Peters MC, Mochly-Rosen D, Yeomans DC, Kendig JJ. 2004. Protein kinase C epsilon and gamma: Involvement in formalin-induced nociception in neonatal rats. *J Pharmacol Exp Ther* 309: 616–625.
- Szallasi A. 1994. The vanilloid (capsaicin) receptor: Receptor types and species differences. *Gen Pharmacol* 25: 223–243.
- Taupin P. 2006. In: Janigro D, editor. *The Cell Cycle in the Central Nervous System*. Neural Stem Cells Chapter, p 584.
- Todd AJ. 2010. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci* 11:823–836.
- Todd AJ, Spike RC, Polgár E. 1998. A quantitative study of neurons which express neurokinin-1 or somatostatin sst2a receptor in rat spinal dorsal horn. *Neuroscience* 85: 459–473.
- Walsh MA, Graham BA, Brichta AM, Callister RJ. 2009. Evidence for a critical period in the development of excitability and potassium currents in mouse lumbar superficial dorsal horn neurons. *J Neurophysiol* 101: 1800–1812.
- Wang CZ, Shi M, Yang LL, Yang RQ, Luo ZG, Jacquin MF, Chen ZF, et al. 2007. Development of the mesencephalic trigeminal nucleus requires a paired homeodomain transcription factor, *Drg11*. *Mol Cell Neurosci* 35: 368–376.
- Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, Schmidt-Kastner PK, Pietsch T, Wiestler OD, Blümcke I. 1996. NeuN: A useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem* 44:1167–1171.
- Zhu C, Hui R, Chen T, Zuo Z-F, Wang W, Gao C-J, Zhang T, et al. 2011. Origins of endomorphin-2 immunopositive fibers and terminals in the rat medullary dorsal horn. *Brain Res* 1410:38–47.
- Zimmermann M. 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109–110.

Chapitre 3

*Etude du développement postnatal
des propriétés électrophysiologiques et morphologiques
des interneurones de la couche III du Sp5C chez le rat*



Greg A Dunn Design, Maki-e Neurons

I. *Contexte de l'étude*

Nous avons vu dans le chapitre I et lors de la première étude que la période postnatale est une période critique pour le développement phénotypique des neurones de la couche Ili du Sp5C.

Il est bien connu que, dans diverses structures cérébrales, des modifications des propriétés électrophysiologiques accompagnent ces changements phénotypiques au cours du développement. Cependant, nous ne savons que très peu de chose sur le développement postnatal physiologique des neurones impliqués dans la sensibilité et/ou la douleur, et notamment concernant les neurones de la couche Ili. La plupart des études s'intéressant aux modifications des propriétés membranaires des neurones sensoriels centraux au cours du développement ont été réalisées au niveau de la moelle épinière lombaire, et aboutissent à des conclusions divergentes (Baccei and Fitzgerald, 2005 ; Walsh et al., 2009 ; Tadros et al., 2012). Deux études chez la souris ont montré que certaines propriétés intrinsèques étaient modifiées au cours du développement (Walsh et al., 2009 ; Tadros et al., 2012), tandis que chez le rat (Baccei and Fitzgerald, 2005) n'ont observé aucune modification significative de ces propriétés. Malgré le fait que l'on sache aujourd'hui qu'il existe des différences entre les niveaux rostrocaudaux (Tadros et al., 2012), aucune étude ne s'est intéressée en détail au développement des propriétés électrophysiologiques des interneurones du Sp5C.

Enfin, des changements de la morphologie des neurones du Sp5C peuvent également se produire au cours des premières semaines postnatales, comme cela a déjà été observé au niveau spinal (Bicknell and Beal, 1984).

Dans ce contexte, la seconde étude que nous avons réalisée a eu pour objectif d'étudier le développement électrophysiologique et morphologique des interneurones de la couche Ili au sein du Sp5C chez le rat. Une analyse fine de l'arborisation neuritique a été effectuée, notamment à travers l'étude de la longueur et du nombre de branches, ainsi que l'évolution de l'arborisation dans l'espace au cours du temps.

II. *Matériels et méthodes*

Les animaux utilisés dans ce deuxième travail de thèse étaient des rats mâles et femelles de la souche Sprague-Dawley âgés de P3 à P30 (cf le paragraphe Animaux du chapitre II). Le jour de l'expérimentation, les animaux ont été anesthésiés par une injection intrapéritonéale (i.p) de chloral hydrate puis euthanasiés par décapitation. Le cerveau et la partie cervicale de la moelle épinière ont été délicatement prélevés. Afin de s'affranchir de l'excitotoxicité induite par la libération massive de glutamate par les neurones durant la section du tissu, la dissection et la préparation des tranches ont été réalisées dans une solution froide de saccharose-ACSF (sACSF, saccharose-Artificial Cerebrospinal Fluid). Le saccharose permet d'empêcher la genèse de potentiel d'action et ainsi de limiter la libération de glutamate. La composition de la solution de sACSF était (en mM) de 205 Sucrose, 2 KCl, 7.0 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 1.2 NaH₂PO₄, 11 D-glucose, and 0.5 CaCl₂ dissous dans de l'eau distillée. Le pH a été ajusté à 7.4 par l'ajout de NaOH. La solution a été continuellement maintenue entre +1 et +6°C et bullée avec du carbogène (95% O₂ et 5% CO₂).

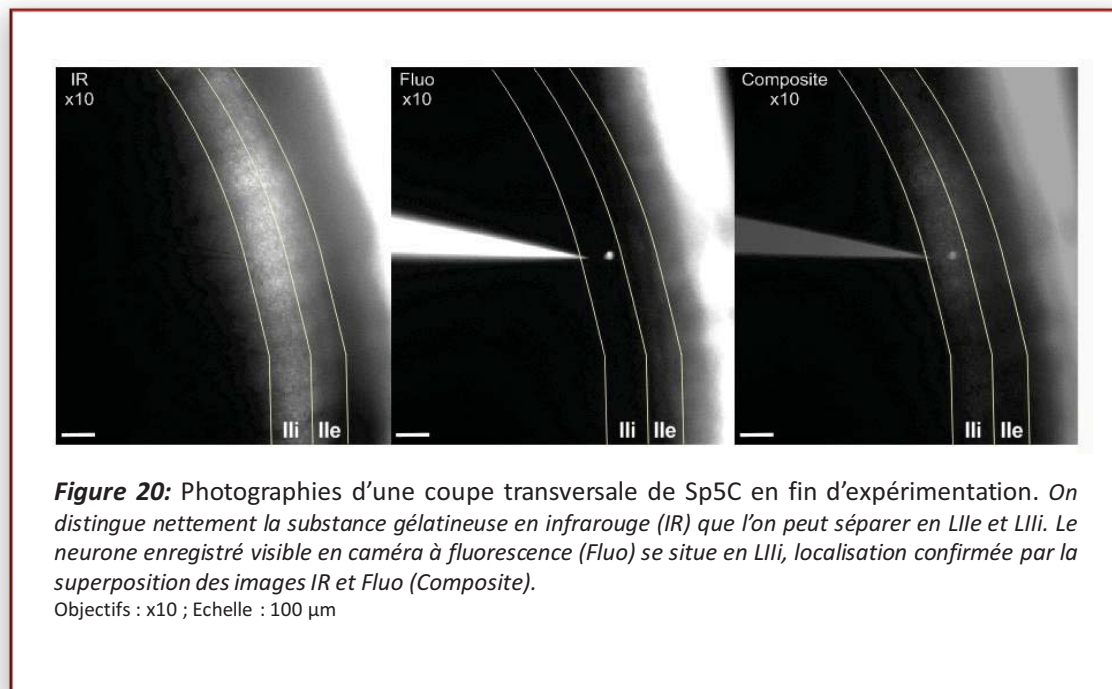
Après avoir été prélevés, le bulbe rachidien et le cervelet ont été inclus dans un bloc d'agarose (5% UltraPure LMP Agarose, Invitrogen) puis collés avec de la superglue sur la plateforme d'un vibratome (VT1200 S, Leica Microsystems SAS, Nanterre, France). La plateforme a été immédiatement déposée dans une cuve puis immergée de solution de sACSF froide et oxygénée. Des coupes transversales et parasagittales de 350 µm d'épaisseur ont été réalisées puis déposées sur un filet de nylon dans une chambre de stockage remplie d'une solution d'ACSF (pH 7.4) à 37°C contenant (en mM) 130 NaCl, 3 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.3 MgSO₄, 0.6 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 10 glucose dissous dans de l'eau distillée et oxygénée avec 95 % O₂ and 5 % CO₂. Les tranches ont ainsi été laissées en incubation pendant 1h avant le début des enregistrements électrophysiologiques.

2.1 *Enregistrements électrophysiologiques*

2.1.1 *Chambre d'enregistrements*

Les enregistrements électrophysiologiques ont été réalisés sur un neurone par tranche. Pour cela, une tranche de bulbe rachidien est transférée dans une chambre d'enregistrement et immergée dans ~1mL de la solution d'ACSF à température ambiante (~25°C). La tranche est maintenue par des fibres de nylon portées par un U de platine. La chambre est complétée d'un système de perfusion avec une tubulure d'entrée et une tubulure de sortie reliées à une pompe à perfusion faisant circuler 3ml de solution par minute. La chambre est montée sur un microscope

vertical à fluorescence (AxioExaminer, Carl Zeiss, Hamburg, Germany) relié à une caméra digitale QImaging Exi Aqua (Ostrava, Czech Republic). La chambre d'enregistrement supporte également l'électrode de référence constituée d'un fil d'argent chloruré et immergé dans la solution d'ACSF.



La substance gélatineuse du Sp5C a une apparence translucide caractéristique et peut-être facilement identifiée au microscope sous un objectif à x10 (**Fig. 20**). La couche II a été divisée en deux parties égales à partir des limites dorsale et ventrale. Puis les neurones de la couche Ili ont été visualisés sous un objectif à immersion à x63.

2.1.2 Micropipettes et solution intracellulaire

Les micropipettes de patch ont été fabriquées à partir de capillaires de verre borosilicaté de 1.8 mm de diamètre (Sutter Instrument, Novato, CA, USA), étirés avec une étireuse horizontale (P 2000, Sutter Instrument). Les résistances finales des micropipettes mesurées dans le bain et après qu'elles aient été remplies de solution intracellulaire étaient comprises entre 5 et 10 M Ω .

La solution intracellulaire était composée (en mM) de 135 K-gluconate, 4 NaCl, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 0.2 EGTA, 2.5 ATP-Na₂, 0.5 GTP-Na₂, 0.05% de neurobiotine (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), 0.01 % de dextran tetramethylrhodamine (10,000 MW,

fluoro-ruby, Life technologies, Saint Aubin, France) dissous dans de l'eau milliQ. Le complexe dextran tetramethylrhodamine permet de visualiser le neurone patché par immunofluorescence pendant l'expérimentation (**Fig. 20**). La neurobiotine, quant à elle, diffuse dans le neurone et son arborisation permettant de le visualiser à posteriori par immunohistochimie, de le reconstruire et de faire une analyse de sa morphologie.

Le pH de la solution intracellulaire a été ajusté à 7.4 et l'osmolarité à 290-300mOsm.

2.1.3 Patch-Clamp : principes de la technique

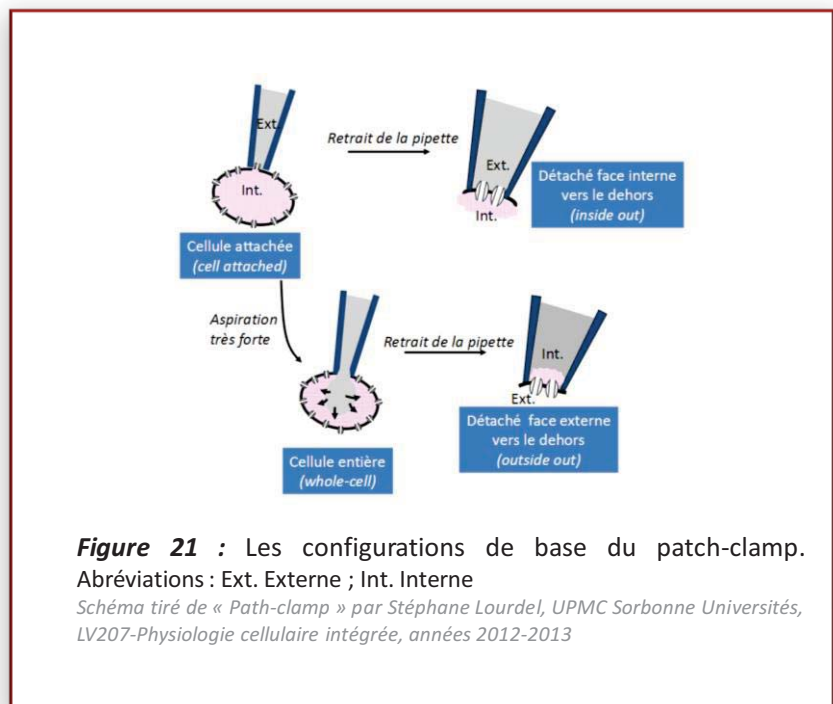
La technique de « patch-clamp » consiste à apposer sur la membrane plasmique d'une cellule une micropipette en verre remplie d'une solution de composition ionique définie et contenant une électrode d'enregistrement. Cette technique, qui valut le prix Nobel en 1976 à Neher et Sakmann, permet d'enregistrer l'activité électrique d'un neurone soit en lui imposant un voltage, on mesure alors un courant transmembranaire, soit en lui imposant un ampérage (ou courant), on mesure dans ce cas un potentiel. Il existe 4 configurations en patch-clamp (**Fig.21**) :

- « **Cellule entière** » : la pipette est insérée dans la cellule et offre ainsi la possibilité d'étudier la physiologie de la cellule dans son entier. Cette technique a l'avantage de permettre un contrôle des milieux interne et externe à la cellule

- « **Cellule attachée** » : la pipette est seulement apposée sur la membrane plasmique

- « **Outside-out** » : la face externe d'un fragment de membrane se retrouve à l'intérieur de la pipette. Cette configuration permet d'étudier des canaux activés par la fixation d'un ligand

- « **Inside-out** » : la face interne d'un fragment de



membrane se retrouve à l'intérieur de la pipette. Cette configuration est classiquement utilisée pour l'étude unitaire de tous les canaux ioniques, sauf ceux dont l'activation nécessite la fixation d'un ligand.

2.1.4 Déroulement des enregistrements

La micropipette est positionnée au-dessus de la zone d'intérêt par l'intermédiaire d'un micromanipulateur (Sutter) et sous control visuel grâce à l'objectif à x10. Dans le bain et à distance de la tranche, une pression positive est appliquée à l'intérieur de la micropipette afin d'éviter l'obturation de sa pointe. Lors de la descente de la micropipette dans la tranche, le contact de sa pointe avec un neurone augmente sa résistance tandis que la membrane du neurone se voit subir une légère déflexion. A ce moment-là, la pression positive est relâchée, puis une pression négative (suction) est appliquée dans la micropipette afin de favoriser le scellement de sa pointe à la membrane du neurone.

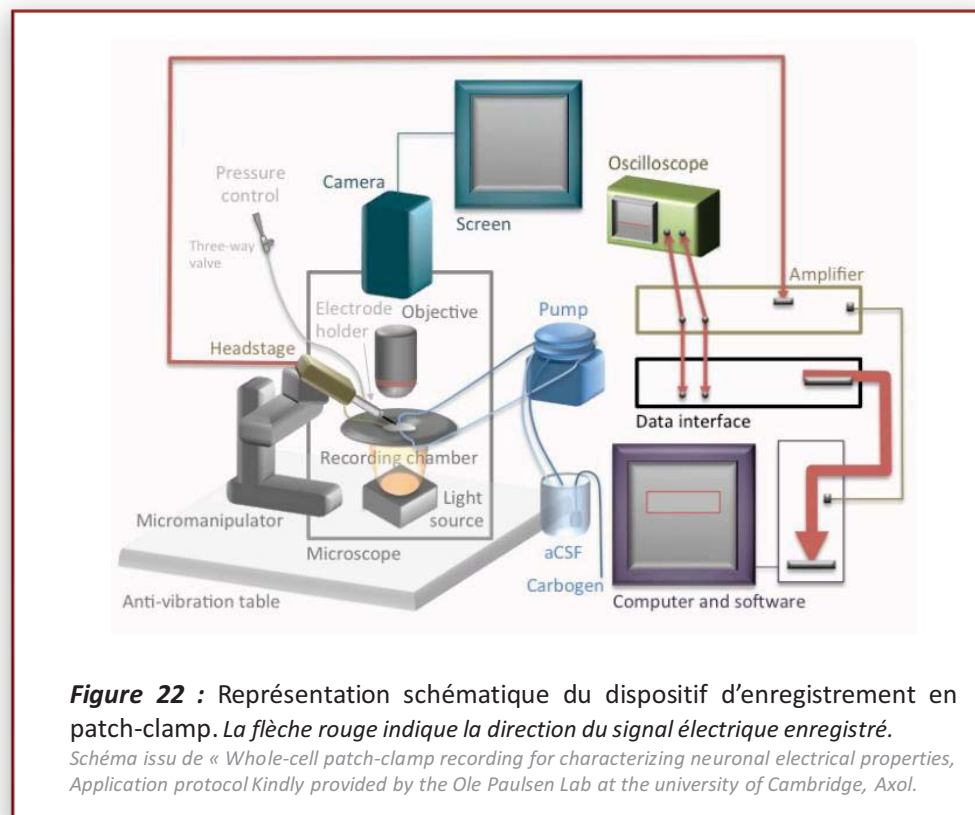
Le potentiel est alors amené de 0 à -65mV favorisant la mise en place d'une jonction à forte résistance mécanique et électrique que l'on appelle le Gigaseal : nous sommes en configuration « cellule-attachée ». Les courants capacitifs transitoires dus à la pipette sont alors compensés grâce à un dispositif interne à l'amplificateur.

Une aspiration douce est continue appliquée à l'intérieur de la micropipette permet de rompre le fragment de membrane sous la pipette et de passer en configuration « cellule-entière ». Cette nouvelle configuration entraîne l'apparition de courants transitoires dus à la capacité électrique de la membrane qui sont compensés par un dispositif interne à l'amplificateur. La résistance en série (R_s) indique la qualité de l'accès électrique entre l'électrode et l'intérieur de la cellule. Si la R_s change de plus de 20% au cours de l'enregistrement, ce dernier n'est pas retenu pour l'analyse.

Dans nos conditions expérimentales, un délai de 5 minutes minimum a été respecté avant de commencer les enregistrements, permettant au contenu de la pipette de s'équilibrer avec le milieu intracellulaire.

2.1.5 Acquisition des données

Pour nos enregistrements, les modes voltage-clamp et current-clamp ont été utilisés. L'acquisition des données a été réalisée grâce au logiciel Clampex 10 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) lié à un amplificateur Multiclamp 700B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) via un digitaliseur Digidata 1440A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) (**Fig.22**).



2.1.6 Protocoles

Les propriétés membranaires passives

Les neurones possèdent deux propriétés membranaires passives ayant un rôle important dans le signal électrique : la résistance d'entrée (*input resistance*, R_{in}) et la capacitance. Entre autre, ces deux propriétés déterminent la vitesse de conduction d'un PA, l'amplitude et le décalage temporel des modifications des potentiels synaptiques générés par une stimulation, et déterminent aussi si le potentiel généré résultera en un PA ou non.

La résistance d'entrée

La résistance d'entrée d'une cellule représente la plus ou moins grande difficulté que vont avoir les ions à traverser une membrane sous un courant d'une certaine intensité. Elle détermine combien cette cellule va se dépolariiser en réponse à une stimulation positive. L'amplitude de la dépolariisation est donnée par la loi d'Ohm :

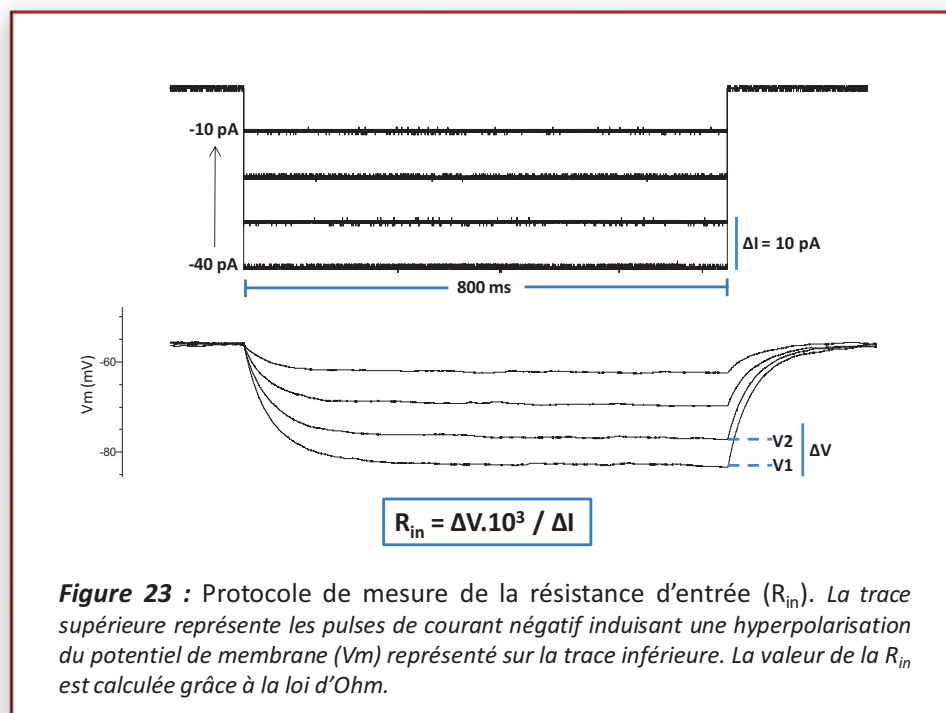
$$\Delta V = I \times R_{in}$$

avec ΔV la variation du potentiel membranaire, I le courant et R_{in} la résistance d'entrée.

Ainsi, si l'on considère deux neurones recevant chacun la même stimulation, celui qui aura la résistance membranaire la plus forte aura une plus grande modification de voltage.

La résistance membranaire dépend à la fois de la densité de canaux ioniques à la membrane, et de la taille du corps cellulaire. En effet, dans le cas d'une cellule ronde, plus le corps cellulaire est gros, plus sa surface membranaire sera grande pour accueillir des canaux ioniques et donc plus la résistance sera faible. Or, les neurones parfaitement ronds sont rares. En réalité ce que l'on injecte en un point du neurone ne diffuse pas en tout point de ce même neurone. Ainsi, la résistance d'entrée dépend également de la résistance de la membrane des neurites ainsi que de la résistance intracellulaire cytoplasmique entre le corps cellulaire et les neurites.

Dans notre protocole, la R_{in} est mesurée en appliquant des pulses hyperpolarisants d'amplitude décroissante (-40 à -10 pA) pendant 800ms (**Fig. 23**).



La capacitance membranaire

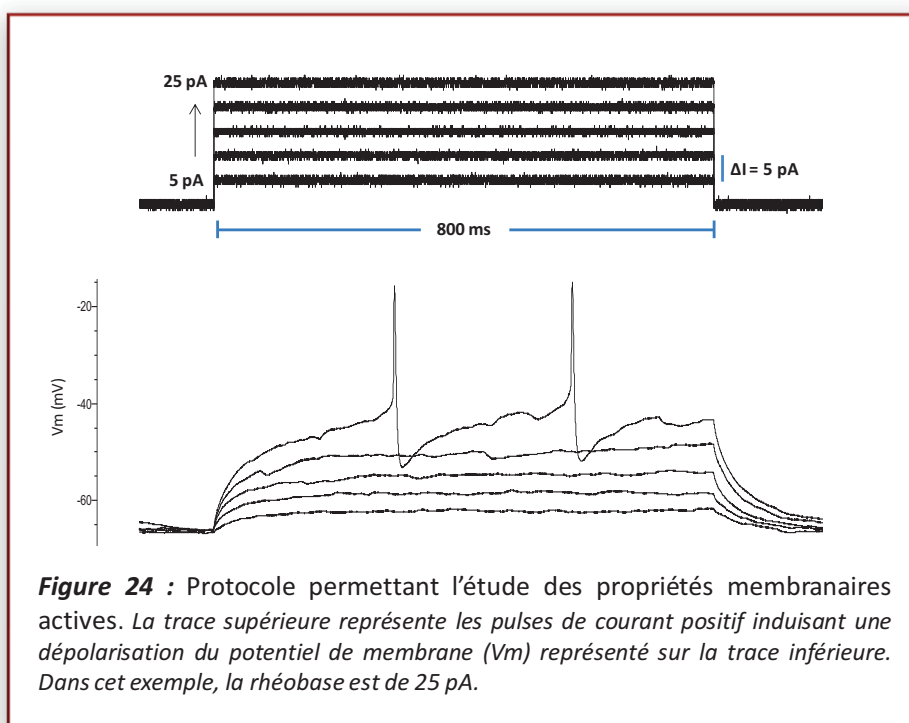
Comme nous l'avons vu, les membranes cellulaires ne sont pas imperméables aux ions et laissent ainsi passer un certain courant induit par l'établissement d'une différence de potentiel. Néanmoins, la perméabilité membranaire est faible et sélective, et les membranes se comportent ainsi comme des conducteurs bas-de-gamme présentant un certain pouvoir isolant. Mais, prise en

sandwich entre deux milieux très bons conducteurs que sont les milieux extra- et intra-cellulaires, la membrane correspond à l'organisation d'un condensateur. Elle va donc présenter des effets capacitifs (accumulation de charges): on parle dans ce cadre de « capacitance ». Cette capacitance explique que les modifications de potentiel en réponse à un courant injecté sont plus lentes que les pulses de courant injecté, et donne ainsi une forme arrondie à l'électrotonus.

Les propriétés membranaires actives

En plus des propriétés membranaires passives que nous venons de détailler, les neurones possèdent également des propriétés membranaires actives qui leur sont propres et qui peuvent être modifiées au cours du développement. Dans notre protocole, des créneaux de courant dépolarisant d'intensités croissantes (0 à +200 pA, 800 ms) permettent d'étudier ces propriétés.

D'abord, la **rhéobase** (Rh) est définie comme le courant qu'il est nécessaire d'injecter pour que le neurone induise un premier PA (**Fig. 24**). Une fois que le neurone déclenche un premier potentiel d'action, l'injection de courant dépolarisant jusqu'à 1.5x la valeur de la Rh permet d'identifier le **profil de décharge** de chacun des neurones (tonique, phasique, retardé, irrégulier et PA unique (**cf Fig. 16 au chapitre 1**). Au niveau de la Rh, l'amplitude et la durée des PAs sont mesurées : l'**amplitude** est mesurée à partir du point précédent la phase ascendante jusqu'au sommet du PA tandis que la **durée** est définie comme la largeur du PA au niveau de la moitié de son amplitude maximum.



L'ensemble des propriétés membranaires passives et actives ont été mesurées en mode current-clamp.

Les propriétés des courants ioniques

Les différentes variantes de la technique de patch-clamp ont permis d'identifier et de mesurer les courants ioniques qui passent à travers la membrane d'une cellule. On sait aujourd'hui qu'il existe de nombreux courants caractérisés par les ions dont ils dépendent, par le potentiel de membrane auquel ils s'activent ou encore par les substances chimiques qui les activent, les modulent ou les inhibent. Parmi ces courants, on retrouve deux courants à réponses anormales (Gola et Romey, 1970) activés par l'hyperpolarisation.

Courant I_H

Le courant cationique activé par l'hyperpolarisation ou courant I_H est un courant porté par les canaux HCN dont le canal HCN1 (*Hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated type 1 channel*). Comme leur nom l'indique, ces canaux s'ouvrent en réponse à une hyperpolarisation de la membrane. Ils sont perméables au sodium (Na^+) et au potassium (K^+) et génèrent un courant entrant cationique rectifiant, afin de « ramener » le potentiel de membrane vers des valeurs moins négatives.

Ce courant a d'abord été découvert dans les cellules du nœud sinusal du cœur du lapin. Il porte également le nom de courant I_f pour « funny », puisqu'il est l'un des rares courants activés par une hyperpolarisation. Il est également impliqué dans la génération autonome de rythme, ce qui fait de HCN1 un « *canal pacemaker* ». En mode current-clamp, un protocole d'hyperpolarisation permet de mettre en évidence un « sag », caractéristique de l'existence d'un I_H . La phase de repolarisation donne, la plupart du temps, lieu à un rebond post-inhibiteur (PIR), caractérisé par une dépolarisation de la membrane au-dessus du potentiel de repos, atteignant parfois le seuil de déclenchement des PA sodiques.

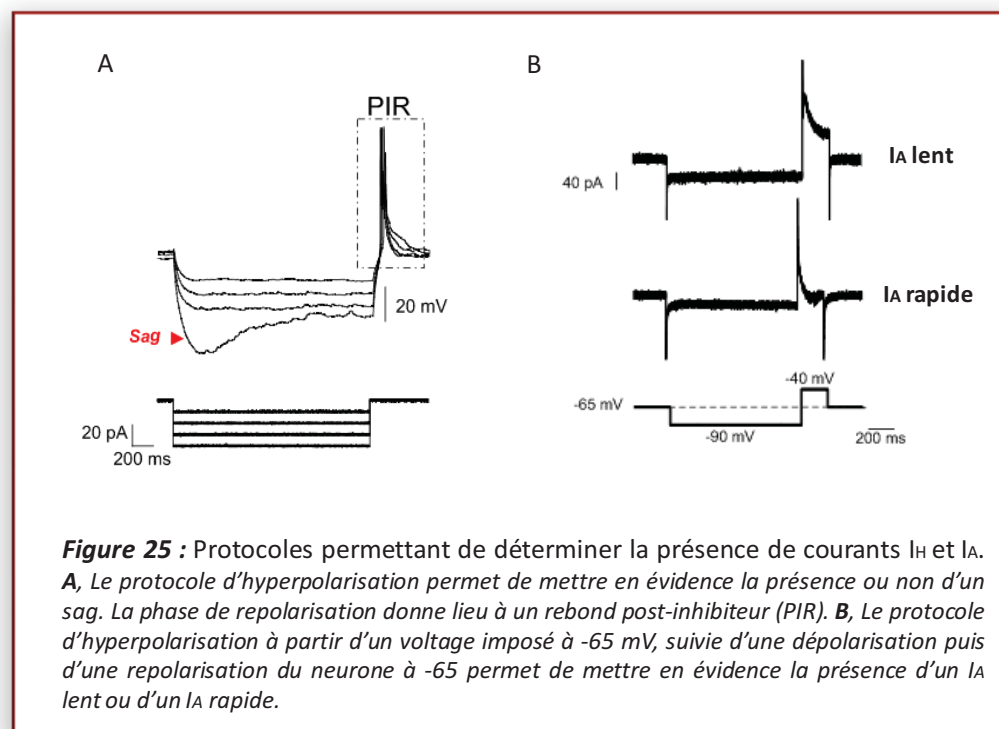
Afin de déterminer l'existence d'un sag et d'un PIR dans notre étude, des créneaux de courant hyperpolarisant (10 steps, 15 pA increment, 1800 ms duration) ont été appliqués (Fig. 25A).

Courant I_A

Le courant I_A , ou courant potassique transitoire, est dépendant du potentiel et s'active suite à une dépolarisation. Mais aussi et de manière surprenante, l'expression d'une hyperpolarisation post-PA (AHP, *after hyper-polarisation*) prononcée serait suffisante pour dé-inactiver le I_A et donc entrainer son activation. On peut distinguer deux catégories de I_A : les I_A lents ayant une

cinétique d'activation et d'inactivation lente et qui sont sensibles à une faible dose de 4-AP ; et les I_A rapides ayant une cinétique d'activation et d'inactivation rapide et qui sont sensibles à de fortes doses de 4-AP. Dans les neurones de l'hippocampe, les courants I_A entraînent une diminution de la fréquence des PA en ralentissant le retour au seuil d'activation des canaux Na^+ (Debanne et al, 1997). Cette observation a également été faite dans la LII de la CDS par Yoshimura en 1989. Après avoir observé la présence de courant I_A dans les neurones de la substance gélatineuse, Yoshimura et collaborateurs discutent que l'un des rôles physiologiques hyperpolarisants des courants I_A serait de diminuer la probabilité pour les neurones de décharger des PA en réponse à une dépolarisation et ainsi favoriser d'avantage la régulation de la décharge des PA.

Dans notre étude, la présence de I_A lents et de I_A rapides a été déterminée en mode voltage clamp par un protocole d'hyperpolarisation ($\Delta = -25$ mV pendant 1000 ms) à partir d'un voltage imposé à -65 mV, suivie d'une dépolarisation ($\Delta = +25$ mV pendant 200 ms) puis d'une repolarisation du neurone à -65 mV (Fig. 25B).



2.2. *Procédures histologiques et microscopie confocale*

A la fin des enregistrements, l'observation de la coupe sous microscope à épifluorescence a permis de vérifier que le neurone enregistré a bien été rempli avec la neurobiotine (par visualisation de Dextran couplé à Tetramethylrhodamine et Fluororuby). Les tranches ont ensuite été transférées dans une solution contenant 4% de paraformaldehyde dans 0.1 M de solution tampon-phosphate (pH 7.4) et stockées jusqu'à 1 semaine à +4°C en attendant l'immunomarquage.

Le jour de l'immunomarquage, les coupes ont été rincées cinq fois pendant 10 minutes dans du TBS 0.1M (pH 7.4) puis placées en incubation à température ambiante dans une plaque multi-puits mise à l'obscurité et en agitation pendant 4h dans une solution de TBS - 0.25% BSA – 0.3% Triton X100 contenant de la Rhodamin-Avidin DCS (1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Après cinq nouveaux rinçages successifs par du TBS de 10 minutes chacun, les coupes ont été placées dans une solution de TBS-BSA-Triton contenant 4% de NGS et additionnée d'un anticorps polyclonal dirigé contre la PKC γ (1:4000; Frontier Institute Co Ltd, Hokkaido, Japan) pendant 3 jours, à 4°C et sous agitation.

A la fin du temps d'incubation, les coupes ont été rincées puis transférées sur des lames gélatinées et déshydratées avant d'être recouvertes de DPX.

Le marquage a été observé à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (Zeiss LSM 510, Carl Zeiss, Hamburg, Germany) en utilisant un laser d'une longueur d'onde de 635 nm. L'empilement des sections optiques (Z-step de 0.38 μ m) prises au grossissement x40 avec une lentille à immersion dans l'huile ont permis de générer une image en 3-dimensions (3D).

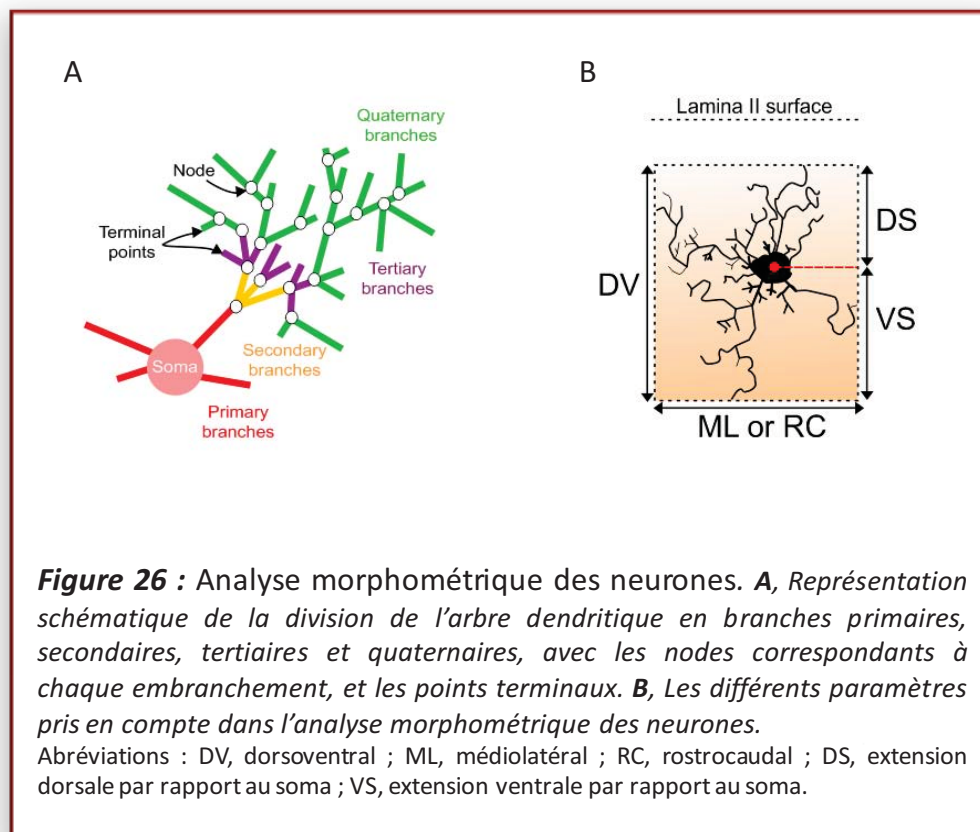
2.3 *Reconstruction et analyses morphologiques*

La reconstruction de chaque neurone marqué à la neurobiotine ainsi que l'analyse morphologique du soma et de l'arborisation neuritique ont été réalisées grâce au logiciel Fiji. La reconstruction de l'arborisation a été réalisée à l'aide du plugin Simple Neurite Tracer (Longair et al., 2011) et observée en 3D grâce au plugin 3D-viewer (Schmid et al., 2010). Une fois reconstruit, les différents paramètres morphologiques permettant de caractériser le neurone ont été mesurés (Fig. 26).

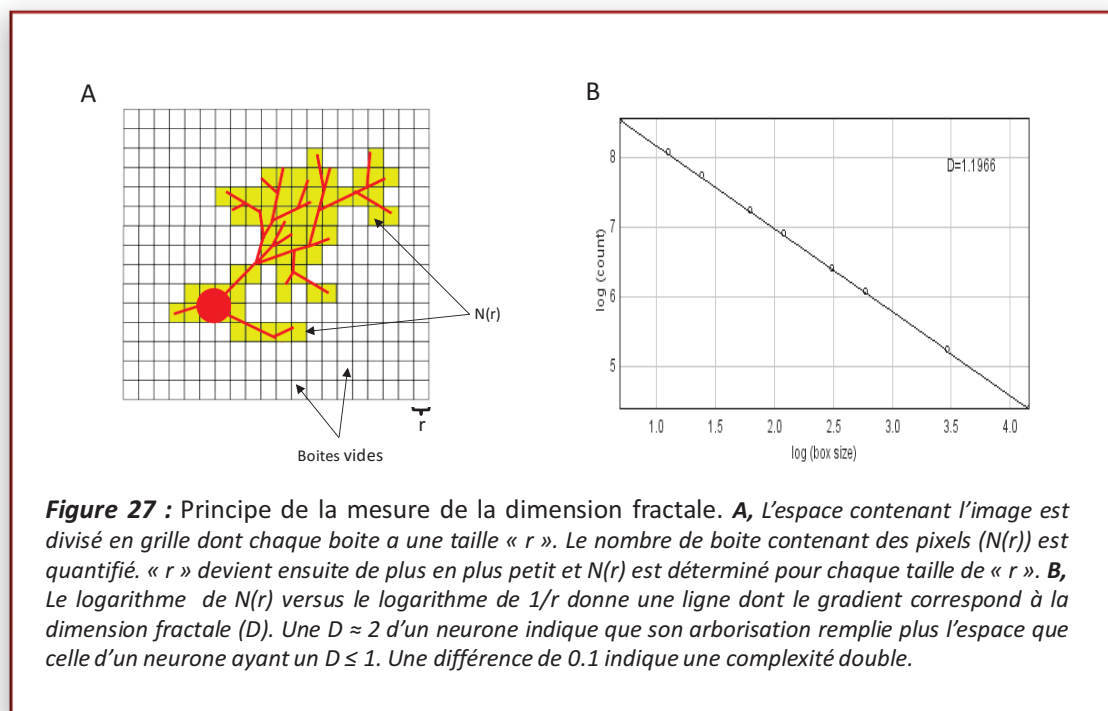
Parmi ces paramètres, la surface du neurone est calculée comme étant le produit de l'étendue médiolaterale ou rostrocaudale (ML ou RC, respectivement pour les coupes

transversales et parasagittales) et dorsoventrale (DV) de l'arborisation globale. Le [volume du soma](#), lui, est mesuré dans les 3 plans ML, DV et RC.

A l'aide du plugin NeuronJ, les branches peuvent être ordonnées en branches primaires, secondaires, tertiaires ou quaternaires, en fonction de leur embranchement. Les branches primaires partent directement du soma et vont se ramifier en branches secondaires, elles même se ramifiant en branches tertiaires, et les tertiaires en quaternaires. La classe des branches quaternaires inclus les ramifications d'ordres subséquents. Cet ordonnancement des branches permet d'en extraire [la taille](#) et [le nombre](#) selon leur classe, ainsi que [la quantité d'intersections \(nodes\)](#) et de [points terminaux](#).



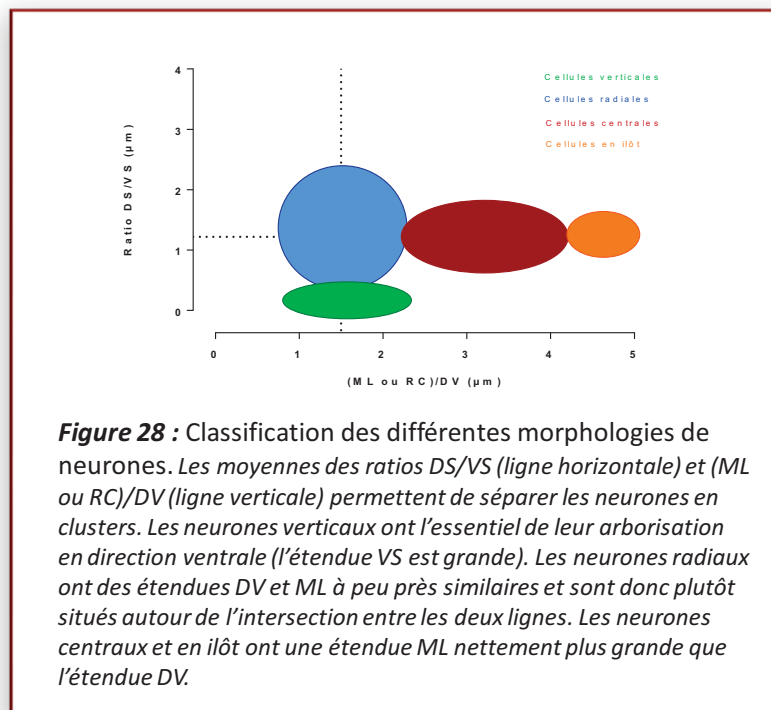
L'organisation dans l'espace des neurones est étudiée à travers l'analyse de la dimension fractale (Fig.27), qui représente, en quelque sorte, la complexité de l'arborisation (Smith Jr. et al., 1996). Pour cela, chaque reconstruction est mise au format binaire (noir et blanc) et on isole les contours de l'objet. L'outil Fractal Box count de Fiji permet de quantifier la quantité d'espaces de taille définie « r » remplis par un pixel ($N(r)$, Fig. 27A). La dimension fractale est donnée par la pente négative du logarithme $N(r)$ versus le logarithme de « r » (Fig. 27B).



2.4 Classification morphométrique des neurones

Comme nous l'avons vu auparavant, plusieurs types morphologiques sont retrouvés parmi les neurones de la corne dorsale (central, radial, vertical et cellule en îlot). Etant donné que l'inspection visuelle est une méthode archaïque et subjective pour la détermination des types morphologiques, chaque neurone reconstruit est classé en utilisant les différents paramètres morphométriques : l'étendue médiolatérale (ML) ou rostraucaudal (RC) et l'étendue dorsoventrale (DV) de l'arborisation globale, la distance des neurites dorsales à partir du soma et jusqu'à leur limite dorsale (DS), la distance des neurites ventrales à partir du soma et jusqu'à leur limite ventrale (VS). Puis les ratios DS/VS et ML/DV sont mesurés pour chaque neurone, et la

valeur moyenne de chacun des ratios permet de définir des clusters pour séparer les neurones en groupes (**Fig. 28**). Les neurones centraux ont une étendue ML nettement plus grande que l'étendue DV, tandis que les neurones radiaux ont des étendues DV et ML similaires. Les neurones verticaux ont l'essentiel de leur arborisation en direction ventrale (l'étendue VS est grande). Tous les neurones classés en désaccord avec l'inspection visuelle ont été regroupés dans une catégorie dite de neurones "non-classifiés".



III. *Article n°2*

Development of morphological and electrophysiological features of inner Lamina II interneurons within the rat medullary dorsal horn

Noemie Mermet-Joret ¹, Cristina Alba-Delgado ¹, Radhouane Dallel ^{1,2}, Myriam Antri ^{1*}

¹ Clermont Université, Université d'Auvergne, Neuro-Dol, BP 10448, F-63000, Clermont-Ferrand & Inserm U1107, F-63100 Clermont-Ferrand, France

² CHU Clermont-Ferrand, Service d'Odontologie, F-63000 Clermont-Ferrand.

Running title: Lamina II interneurons ontogeny in MDH

***Correspondence to:** Dr. Myriam Antri

Inserm/UdA U1107, Neuro-Dol: Trigeminal Pain and Migraine,

Faculté de Chirurgie Dentaire, 2 rue Braga, Clermont-Ferrand, 63000, France

Phone: (+33) 473 177 314, Fax: (+33) 473 177 306

Email: myriam.antri@udamail.fr

Acknowledgements

We are very grateful to A Artola for useful discussion and careful reading of the manuscript. The authors also thank A Descheemaeker for technical assistance and A.M. Gaydier for secretarial assistance.

Contract grant sponsor

This study was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the University of Auvergne-Clermont-Ferrand (France) and Région Auvergne (France).

Conflict of interest statement

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

Abstract

In adult, interneurons within MDH inner lamina II (Ili) display great morphological and physiological variability and are key elements in circuits underlying facial mechanical allodynia. The first postnatal month is critical for the development of pain sensitivity, together with a structural and functional reorganization of sensory systems. However, how the MDH lamina Ili interneurons develop after birth is still unknown. By combining patch-clamp recordings and 3D-morphological analysis from reconstructed neurobiotin-labeled neurons, we performed a detailed anatomical and electrophysiological characterization of lamina Ili interneurons over the first postnatal month. These interneurons undergo a number of dramatic morphological changes, including increases in the soma volume and total neuritic length. Larger primary, secondary and tertiary branches account for such enhanced dendritic length. As the total neuritic field area remains constant over age, the numbers of neurite, nodes and terminal points concomitantly decrease. According to electrophysiological properties, neurons at birth are more depolarized, have a lower rheobase and display mainly single spike firing compared with those at older ages, suggesting they are more excitable. Such structural and functional postnatal development of lamina Ili interneurons might underlie developmental changes in the facial pain sensitivity.

Introduction

The postnatal period is critical for the development of tactile and nociceptive spinal cord circuits within the dorsal horn (for review see Fitzgerald, 2005). Following nerve injury, mechanical allodynia, a painful sensation in response to normally innocuous touch, has been shown to appear only in the later stages of postnatal development (Fitzgerald, 2005; Howard et al., 2005). This typical pain symptom involves a dorsally-directed polysynaptic circuit of interneurons located in superficial spinal (SDH) or medullary dorsal horns (MDH). In this circuit, mechanical inputs carried by A β afferents and which terminate in inner lamina II (II_i), can gain access to the pain transmission pathways of superficial SDH/MDH (Zeilhofer *et al.* 2012a; Duan et al., 2014 in DH and Miraucourt et al., 2011; Peirs et al., 2016; Pham-Dang et al., 2016 in MDH). It is therefore possible that the postnatal development of such a circuit, especially of lamina II_i interneurons, accounts for the late appearance of mechanical allodynia.

It is well known in many cortical neurons (Zhang 2004; Romand et al., 2011; Ryan et al., 2014), as well as in brainstem or spinal ventral horn motoneurons (Dekkers et al., 1994; Ulfhake et al., 1988; Nunez-Abades et al., 1994; Carrascal et al., 2005) that the morphology and physiology of neurons is profoundly affected during the first postnatal weeks. Surprisingly, we know very little about the postnatal development of the morphological and functional properties of superficial DH interneurons and more specifically of lamina II_i ones. The very few studies that assessed the postnatal development of the electrophysiological properties of superficial SDH neurons (lamina I-II interneurons) led to contradictory results. Thus, Baccei and Fitzgerald (2005) showed that there is no change in the membrane and action potential properties and the prevalence of the various discharge categories over the first 3 postnatal weeks, whereas others (Walsh et al., 2009; Tadros et al., 2012) concluded to changes in several passive and active membrane properties and in firing profile categories. According to anatomical development, only one early study examined the postnatal changes in neuronal morphology in the lumbosacral spinal cord (Bicknell and Beal, 1984). But such study looked at all substantia gelatinosa interneurons and failed to examine important features such as the number and length of branches, the number of terminal point and nodes and the development of arbors in space.

Therefore, in the present study, we intracellularly recorded (whole cell patch-clamp) from specifically lamina Ili interneurons with neurobiotin-filled electrodes (for *post-hoc* morphological analysis) in MDH slices from rats over the first four postnatal weeks. In addition to analyze passive and active electrophysiological properties of interneurons, we performed a detailed analysis of the postnatal development of the neuritic arborizations. Because MDH lamina Ili exhibit different morphological types (islet, central, radial and vertical) (Alba-Delgado et al., 2015), the present study also assessed postnatal changes in the different morphological types. We provide evidence for numerous changes in the neuritic arbor, soma and electrophysiological properties of the rat MDH lamina Ili interneurons over the first four weeks of life.

Methods

1. Animals

Male and female sprague-dawley rats from 1 to 4 postnatal weeks (1 week: P3-P7; 2 week: P8-P14; 3 week: P15-21; 4 week: P22-30) were obtained from Charles River (L'Arbresle, France). They were housed with their mother until P21, then rats were housed 3-4 per cage always under standard laboratory conditions (22 ± 1 °C, 12 h light/dark cycles, lights on at 07:00 AM, food and water *ad libitum*). All efforts were made to minimize the number of animals used. All animal experiments were performed in accordance with the ethical guidelines of the International Association for the Study of Pain (IASP; Zimmermann, 1983) and the Directive 2010/63/UE of the European Parliament. Protocols applied in this study were approved by the local animal experimentation committees: CEMEAA "Comité d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale Auvergne" (n° CE 28-12) and the Ethical review process applications panel of the University of Glasgow.

2. Electrophysiology

2.1. Slice preparation

Rats were killed with an intraperitoneal (i.p.) overdose of chloral hydrate (7 %). The whole brain, including the upper cervical region of spinal cord, was carefully removed, embedded in 5% UltraPure LMP Agarose (Invitrogen) and placed into cold (4°C) sucrose-based artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM): 205 sucrose, 2 KCl, 7.0 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 1.2 NaH₂PO₄, 11 D-glucose, and 0.5 CaCl₂ (pH 7.4) bubbled with 95 % O₂ and 5 % CO₂. Serial transverse or parasagittal slices (350 µm thick) were cut from the brainstem using a vibratome (VT1200S, Leica Microsystems SAS, Nanterre, France). Slices were incubated at 37 °C in aCSF containing (in mM): 130 NaCl, 3 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.3 MgSO₄, 0.6 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 10 glucose (pH 7.4) bubbled with 95 % O₂ and 5 % CO₂, for a 45 min recovery period.

2.2. Patch-clamp recordings

Whole-cell recordings were performed using patch-clamp technique in both voltage- and current-clamp modes as described in Alba-Delgado et al. 2015. Briefly, slices were transferred into a recording chamber continuously perfused with aCSF solution. The chamber

was mounted on an upright fluorescence microscope (AxioExaminer, Carl Zeiss, Hamburg, Germany) and linked to a digital camera (QImaging Exi Aqua, Ostrava, Czech Republic). Patch pipettes (5-10 M Ω of resistance) were filled with an internal solution containing (in mM): 135 K-gluconate, 4 NaCl, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 0.2 EGTA, 2.5 ATP-Na₂, 0.5 GTP-Na₂, neurobiotin (0.05 %, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), dextran tetramethylrhodamine (10,000 MW, fluoro-ruby, 0.01 %, Life technologies, Saint Aubin, France), pH adjusted to 7.4 and osmolarity of 290-300 mOsm. The substantia gelatinosa of the MDH was easily distinguished at all postnatal age and the lamina II was divided into two equal parts from the dorsal to ventral boundaries. Interneurons in lamina Iii were visualized using X63 water-immersion objective lens with combined infrared and differential interference before being recorded.

Acquisitions were performed using Clampex 10 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) connected to a Multiclamp 700B amplifier (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) via a Digidata 1440A digitizer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Voltage-clamp data were low pass filtered at 3 kHz and digitized at 10 kHz. Series resistance was monitored throughout the experiments and was not compensated. Data were discarded if series resistance varied more than ± 20 %.

2.3. Protocols and data analysis

Resting membrane potential (RMP), membrane input resistance (R_{in}), membrane capacitance (C_m), rheobase, action potentials (APs) properties and firing pattern were studied in the current-clamp mode. The R_{in} of the interneurons was determined from the slope of the linear portion of the I-V relationship, by repeated hyperpolarizing current injections of 800 ms duration with step-wise increasing amplitudes (-40 to -10 pA). Repetitive depolarizing current pulses (800 ms) of incremental amplitude were used to determine the rheobase (minimum depolarizing current intensity needed to generate an AP). Amplitude and spike-width of APs were measured on the first AP at the rheobase level. The amplitude of APs was measured from the point preceding the fast rising phase of the spike to the peak of the spike, whereas APs duration was defined as the width at half-maximal spike amplitude. The firing profile of each neuron was investigated by injections of depolarizing currents with incremental amplitude from 5 pA to 1.5x the rheobase depolarizing pulse (800 ms duration, 1s interval). To investigate “sag” expression, hyperpolarizing current steps (10 steps, 15 pA

increment, 1800 ms duration) in current clamp mode was applied. Expression of A-type potassium currents were studied in voltage clamp mode from a holding potential of -65 mV, by delivering a hyperpolarizing pulse (to -90 mV, 1s duration), immediately followed by a depolarizing step (to -40 mV, 200-ms duration). All data were analyzed offline using Clampfit 10.0 software (Axon Instrument, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

2.4. Histologic procedures

At the end of the recordings, epifluorescence was used to insure that the recorded cells were filled with neurobiotin. Slices were then transferred into 4 % paraformaldehyde in 0.1M phosphate-buffered solution (pH 7.4) and stored overnight at 4°C. Slices were first incubated with Avidin DCS-rhodamine (1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Then, they were transferred onto gelatinized slides and dehydrated before being coverslipped with DPX mountant for histology. Immunolabeling was examined with a Zeiss LSM 510 confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss, Hamburg, Germany) by using 532 nm excitation laser light in the original thick slices. Z-series (z-step of 0.38 μ m) were scanned at x40 magnifications with oil immersion lens.

3. Morphologic characterization

Three dimensions (3D) reconstruction from confocal image stacks of neurobiotin-labeled interneurons was performed using the Simple Neurite Tracer plugin of Fiji software (Longair et al., 2011; Alba-Delgado et al. 2015). Neurons with extensively truncated neuritic arbor were excluded from the sample.

3.1. Analysis of neuritic branches

A branch was defined as uninterrupted neuritic stretch starting at the soma or at a branch point (node) and ending at the next node or when the neurite terminates (terminal point). According to their implantation into the soma or nodes, the neurites could be divided into primary, secondary, tertiary, and quaternary branches (Fig.1A). Quaternary branches included the ramifications of fourth, fifth, sixth, and subsequent orders. The number and the length of branches for each order and the total number of nodes and terminal points were quantified. The field area was calculated as the product of the medio-lateral or rostro-caudal (ML or RC, respectively for transversal or parasagittal slices) and the dorso-ventral (DV) extents of neuritic arbour (Fig.1B). The soma volume was obtained from RC, ML, and DV diameters.

To study the arbor complexity, the fractal dimension was measured using the Fractal Box Count tool of Fiji-ImageJ (Cutting and Garvin, 1987 ; Smith et al., 1996). A score close to 1 implied that the branches fill less the space than branches with a score close to 2, and a difference of 0.1 represents a doubling of complexity.

3.2. Morphometric classification of interneurons

The morphometric classification of interneurons was made as describe in our previous paper (Alba-delgado et al., 2015). Briefly, the classification of each interneuron was performed using scatter plots comparisons of morphometric parameters: ML, RC and DV extents; dorsal neuritic spread (DS, distance from soma center to dorsal limit of soma or neuronal arbor); and ventral neuritic spread (VS, distance from soma center to ventral limit of soma or neuronal arbor) (Fig.1B). The ratios of ML or RC to DV extents and DS to VS were evaluated for individual interneuron. The average ratios were used to separate the interneurons into vertical, central, or radial cells. An interneuron classified as central display a ML or RC extent higher than DV length, whereas a radial interneuron has dendrites that extend in all directions (RC, DV and ML) around the soma. Vertical cells have the majority of their arborisation in the DV direction compared to central and radial interneurons. Neurons that did not follow these criteria were grouped as unclassified cells (Fig.1C).

4. Statistical analysis

All the data are presented as the mean $\pm$ SEM in scatter plot or bar graphs. The number (n) of neurons used for each analysis is shown in the corresponding figure or table. All graphs and statistical analysis were performed on GraphPad Prism software (v6.0; GraphPad Inc, La Jolla, CA). Comparisons between groups were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Holm-Sidak's multiple comparisons test for data following a Gaussian distribution. The F values were expressed with their associated degrees of freedom (df). $P < 0.05$ was considered to be statistically significant. Figures were made using CorelDraw Graphic software (v12.0, Ottawa, Canada).

Results

Data were collected from 88 interneurons within the lamina Ili of MDH. Among these interneurons 76 (out of 88) were used in the electrophysiological analysis and 42 (out of 88) were successfully filled with neurobiotin. Their morphological and electrophysiological features over the first four postnatal weeks (1wk, 2wk, 3wk and 4wk) were assessed.

LIII interneurons display morphological changes during postnatal development

Structural development of neuritic arbors

Analysis of the lamina Ili interneurons morphology using 3-dimensional reconstruction revealed that significant changes in neuritic arbors occurred from the first to the four postnatal weeks (Fig. 2A, Table 1). First, an extensive remodelling of branches characterized by a significant increase in the total branches length occurred across postnatal development ($p < 0.0001$, $F_{(3,38)} = 14.07$; Fig. 2B1). More specifically, each types of branches (primary, secondary, tertiary and quaternary) were found to increase in size by more than twofold from 1wk to 4wk ($p = 0.0008$, $F_{\text{Primary (3, 38)}} = 6.88$; $p = 0.0004$, $F_{\text{Secondary (3, 38)}} = 7.78$; $p = 0.0001$, $F_{\text{Tertiary (3, 37)}} = 10.56$; $p = 0.0004$, $F_{\text{Quaternary (3, 34)}} = 7.8$; Fig. 2B2). Interestingly, from 1wk to 3wk, the length of branches remained relatively constant ($p > 0.05$, Holm-Sidak's test post hoc analysis) and then significantly increased from 3wk to 4wk ($P < 0.001$, Holm-Sidak's test post-hoc analysis). This evolution suggests that the branches length displays a late maturation.

In contrast, the total number of branches significantly decreased from the first to the four postnatal weeks ($p = 0.0011$, $F_{(3,38)} = 6.54$; Fig. 2C1). At 4wk, lamina Ili interneurons displayed threefold and twofold fewer branches than those at 1wk and 2wk, respectively. Such difference was because of a loss of primary ($p = 0.02$, $F_{\text{Primary (3,38)}} = 3.6$), secondary ($p = 0.0002$, $F_{\text{Secondary (3,38)}} = 8.7$), tertiary ($p = 0.004$, $F_{\text{Tertiary (3,38)}} = 5.2$) and quaternary ($p = 0.03$, $F_{\text{Quaternary (3,38)}} = 3.3$) branches (Fig. 2C2). Additionally, we found a significant decrease of both the terminal points ($p = 0.0016$, $F_{(3,37)} = 6.2$; Fig. 2D) and the nodes number ($p = 0.009$, $F_{(3,37)} = 4.44$; Fig. 2E). The majority of arborizations in juvenile animals (around 70%) appeared multi-branched, *i.e.* more than 3 branches out of the same node, while most adult interneurons (75%) showed dichotomous arborisation (Fig. 2E, inset). These results suggest that pruned branches are located on both simple and ramified neurites. Moreover, the total

branches and nodes number as well as the terminal points number showed similar pattern of development. A significant decrease was observed from the two first weeks compared to adult age (1wk vs 4wk: $P < 0.01$ and 2wk vs 4wk $P < 0.05$, Holm-Sidak's test post-hoc analysis), whereas no significant changes was found from three to four postnatal week ($p > 0.05$, Holm-Sidak's test post-hoc analysis).

As concern the organization of the neuritic arbors in the space, the total field area of lamina Ili interneurons did not significantly change with age ($p = 0.1$, $F_{(3, 38)} = 2.2$; Fig. 2F), despite a twofold increase of the field area at 4wk ($11.9 \pm 1.4 \mu\text{m}^3$) compared with 1wk ($6.3 \pm 1.5 \mu\text{m}^3$). To see the distribution of the neuritic arbors in space, we then quantified the fractal dimension. The upper score of the fractal dimension observed in 4wk (1.26 ± 0.02) compared with 2wk (1.15 ± 0.01) and 3wk (1.12 ± 0.03) indicated that arbors of adult interneurons filled the space more entirely than those of younger interneurons ($p = 0.0004$, $F_{(3,38)} = 7.7$; Fig. 2G).

Age-related changes in morphological types

We next examined the morphological types development of lamina Ili interneurons. In adult, substantia gelatinosa interneurons were characterized by five distinct morphological types according to the location and extent of their dendritic arbors: islet, central, radial, vertical and unclassified cell types (Grudt and Perl, 2002; Yasaka et al., 2007, 2010). Analysis of morphometrics parameters, including the ML and RC, DV, SD, SV measurements and the scatter plot comparison based on the RC/DV or ML/DV and DS/VS ratios, showed that central, radial, vertical and unclassified cell types (illustrated Fig. 3A) were already present at early age (Fig. 3C). Moreover, lamina Ili interneurons exhibited mainly a radial cell-like morphology from the first (57.1%) to the four (62.5%) postnatal weeks (Fig. 3B).

Cell bodies development

Three distinct soma shapes have been previously described into the adult MDH: spherical, fusiform, and multipolar (Alba-Delgado et al., 2015; Peirs et al., 2014). We thus investigated the development of each of them: i) spherical soma, characterized by an orb-like shape with analogous RC, DV and ML length, ii) fusiform soma, described as a typical spindle-like shape, and iii) multipolar soma displayed multiple neuritic origins. At the first postnatal week, these three morphology types of soma were clearly distinguishable (1wk, Fig

4A). The proportion of each morphological type evolved similarly from the earlier period (42.8 % spherical, 28.6 % fusiform, 28.6 % multipolar; 1 wk, Fig. 4B) to the later stage (4 wk, 50 % spherical, 18.8 % fusiform, 31.2 % multipolar; 4 wk, Fig. 4B). In addition, lamina IIi interneurons with spherical soma shape were more abundant than those with fusiform or multipolar soma shape at almost all developmental ages (except at 2wk). Interestingly, adult interneurons displayed significantly bigger cell body volume compared to younger ones ($p < 0.0001$, $F_{(3,37)}=15.35$; Fig. 4C). However, this increase in soma size concerns all the type of soma shape (Fig. 4C).

Together, all of these results show that the morphology of lamina IIi interneurons evolves throughout the first postnatal months. Nevertheless, they showed different temporal pattern. The number of branches, nodes and terminal points decrease progressively with age, whereas their branches length and their soma size are stable the three first postnatal weeks and increase in size from the third to the four postnatal weeks.

Specific electrophysiological properties in LIIi interneurons changes with age

Membrane and action potential properties development

Results for passive and active membrane properties are summarized in Table 2. During the first postnatal month, the MDH interneurons underwent a lot of changes in their physiological properties. While no differences in the capacitance has been observed from the first to the four postnatal weeks ($p = 0.47$; $F_{(3,72)} = 0.8$), the resting membrane potential (RMP) became more hyperpolarized ($p < 0.0001$, $F_{(3,72)} = 10.2$) and the input resistance (R_{in}) decreased significantly ($p = 0.0007$; $F_{(3,71)} = 6.4$; Fig. 5A1 and A2 top and bottom, respectively). Action potential (AP) waveforms were also different in younger lamina IIi interneurons compared from those at later ages (Fig. 5B1). The duration significantly decreased with age ($p < 0.0001$, $F_{(3,64)} = 15.6$; Fig. 5B2, top), while the AP amplitude was similar during development ($p = 0.03$, $F_{(3,64)} = 3.2$; Fig. 5B2, bottom).

Developmental evolution of excitability

In order to investigate the changes in membrane excitability, we determined the rheobase and the development of firing profile using step-current injections of increasing

amplitude (Fig. 6A1). The mean rheobase significantly increased from one to four postnatal week ($p = 0.0014$, $F_{(3,67)} = 5.8$; Fig. 6A1, 6A2). We observed two postnatal stages: a first period including the two first postnatal weeks with no changes, followed by a progressive increase of the rheobase. These results suggest that the lamina Ili interneurons are more easily excitable during the early stages of postnatal development compared to adult ones.

We next studied the evolution of firing pattern, according to the AP discharge generated by 1.5 times the rheobase depolarizing pulse (Fig. 6B1). Previously, our study in adult rat has shown four types of responses in MDH lamina Ili (Alba Delgado et al., 2015): single spiking (exhibit one AP at current onset), phasic firing (respond with a short burst of AP followed by a silent period), tonic firing (characterize by repeated AP at relatively regular rates) and irregular firing (exhibit repeated AP occurring at irregular intervals) (Fig. 6B2). During the first postnatal week, most of the interneurons displayed a single spiking discharge profile (73.3%) and their prevalence then progressively decreased (2wk : 30.4%; 3wk: 29.4% and 4wk : 15.3%). Tonic profiles were present in all age groups with proportions increasing during development (1wk : 20%; 2wk : 39.1%; 3wk: 29.4% and 4wk : 38.4%). Although phasic profiles were never observed during the first postnatal week, their prevalence then increased (2wk : 21.7%; 3wk: 41.7% and 4wk : 30.7%). Irregular firings were also observed but in fewer proportion ($< 15\%$ at each postnatal week except at 3wk). In summary, single spike firing was the main profile at early postnatal ages, while tonic and phasic firings were mostly found at later ages (Table 2).

Developmental evolution of subthreshold whole-cell currents

Since hyperpolarization-activated inward current (I_h) and the post-inhibitory rebound (PIR) was previously shown to be expressed in adult MDH interneurons (Alba-Delgado, 2015), we next examined whether the lamina Ili MDH interneurons also exhibit I_h and PIR at early ages. Pulses of hyperpolarizing currents in current-clamp mode revealed a time-dependant rectification of the potential, named hyperpolarizing “sag” (Fig. 7A1) and indicative of I_h activation. First, we found that over-half MDH interneurons displayed rectification at all postnatal weeks (Fig. 7A2), suggesting that I_h current can be activated since the earliest postnatal period. Interestingly, we noticed that it was necessary to inject a more important negative current to induce a sag at 4wk [range: -70 to -120 pA] compared to 1wk [range: -40 to -70 pA]. Among the 61% of rectifying cells at early age, 46% expressed a

PIR. However, this proportion was found to decrease with age (31% over 81% of rectifying cells at 4wk).

Previous studies also reported expression of A-type potassium currents in spinal dorsal horn (Grudt and Perl, 2002; Ruscheweyh et al., 2004; Smith et al., 2015). We thus investigated whether lamina III interneurons exhibited these outward currents at the different developmental period. Two types of A-currents were differentiated: the slow A-current (showing a slow activation and inactivation kinetics, Fig. 7B1, top), and the rapid A-current (with rapid kinetics, Fig. 7B1, middle). At early age, A-currents were present in the majority of interneurons (77%) and showed almost similar proportion of slow and rapid A-currents (44% versus 33%, respectively, Fig. 7B2). The presence of rapid-A current then decreased during postnatal development and stabilized at about 20% at 4wk, whereas the proportion of interneurons expressing slow A-current do not change from 1wk to 4wk.

Overall, these results suggest that lamina III MDH interneurons undergo several changes of their physiological properties during the first postnatal month and exhibit Ih and the two types of A-currents since the earliest period of development.

Discussion

This study provides the first detailed description of the development of morphological and electrophysiological properties of MDH lamina IIi interneurons across the first postnatal month. During this time window, interneurons exhibit a variety of structural changes including: a twofold increase in soma size from the first to the four postnatal weeks; a nearly threefold increase in neurite length and a threefold decrease in neurite number, nodes and terminal points. Together with these morphological changes, lamina IIi interneurons undergo electrophysiological changes, including dramatic changes in passive membrane properties, intrinsic frequency and action potential waveform. Such structural and functional maturation of lamina IIi interneurons might underlie developmental changes in pain sensitivity.

Morphological development of lamina IIi interneurons

Comparative aspects

It is well known that in many SNC regions, the morphology of neurons strongly changes over the first postnatal weeks. Within cortical or sub-cortical areas, for example, basolateral amygdala principal neurons show an increase in dendritic length (Ryan et al., 2014). In somatosensory cortex, developing layer V pyramidal neurons also display dramatic changes, including increases in the number of basal dendritic segments at specified branch orders and in the length of some basal and oblique dendritic segments (Romand et al., 2011). In the brainstem or spinal cord, morphological developmental studies mostly focused on motor neurons and showed that their dendritic tree develops predominantly postnatally. In hindlimb lumbar motoneurons, the number of primary dendrites does not change (Dekkers et al., 1994), but the length of dendritic branches gradually increases during the 1st postnatal month (Ulfhake et al., 1988). In forelimb motoneurons, a dendritic extension followed by a dendritic retraction have been described (Ulfhake et al., 1988; Curfs et al., 1993), while in developing cat phrenic (Cameron et al., 1991) and rat hypoglossal motoneurons (Nunez-Abades and Cameron, 1995), though the total surface area of dendritic arborizations remains unchanged, there are dramatic elongation of some dendritic branches and elimination of others (Nunez-Abades et al., 1994). Only two early studies dealt with the dendritic development of sensory neurons (Falls and Gobel, 1979; Bicknell and Beal, 1984). They showed that some substantia

gelatinosa neurons in the SDH also undergo postnatal rearrangement of dendrites, with suppression of some dendrites and lengthening of others along adult features. The discrepancies between these changes can be accounted for by differences in brain areas, species, labeling techniques, methods of analysis and heterogeneity in the intrinsic properties of the different types of neurons. However, despite these differences, virtually all studies as well as our results in sensory MDH lamina IIi interneurons, provide evidence for remodeling of the dendritic tree during the 1st month of postnatal life.

Cellular mechanisms of neuritic development

The settling of the neuronal dendritic tree depends upon a balance between growth promoting and growth inhibiting processes. The mechanisms that regulate the postnatal dendritic morphogenesis are poorly understood. In spinal motoneurons, it is known that NMDA receptor activation can selectively facilitate dendrite growth (Kalb, 1994), possibly through promoting the formation of new branches or stabilizing otherwise transient dendritic structures. Although there is no study establishing the involvement of NMDA receptors in the development of dendritic morphology within the dorsal horn, NMDA receptors are developmentally regulated in this region: their concentration is high in neonatal animals compared with adults (Gonzales et al., 1993). Moreover, NMDA receptors and specifically the NMDA subunit NR2B mRNA, are found throughout all laminae of the dorsal horn prenatally and gradually become restricted to lamina II in adults (Watanabe et al., 1994). Thus, this developmental regulation might lead to the progressive postnatal development of lamina IIi interneuron morphology.

Somatic development

The soma volume increased nearly three times over the first four weeks of life. This dramatic postnatal increase, we report here, is consistent with the results of previous developmental studies within the ventral horn. However, the timing of the changes is different. We showed that the largest increase in soma size of lamina IIi interneurons occurs from the 3rd to the 4th postnatal weeks, while the greatest rate of soma growth of motoneurons innervating the hindlimb muscles is during the 2nd postnatal week (Kerai et al., 1995; Westerga and Gramsbergen, 1992). The difference might account for the rapid maturation of motor behavior during the two first postnatal weeks. Indeed, at the end of the 1st postnatal week, animals become able to lift their trunk from the floor and to walk spontaneously (Geisler et

al., 1993; Jamon and Clarac, 1998) and the adult pattern of locomotion, characterized by an adduction of hindlimbs during the stance phase and smooth movements of the trunk and limbs, is already present at the 16th postnatal day (Westerga and Gramsbergen, 1990). Compared with locomotion, the adult-type of pain sensitivity appears in later stages of postnatal development (Fitzgerald, 2005; Howard et al., 2005). For example, persistent mechanical allodynia induced by peripheral nerve injury, develops in rats only when they are over 3-weeks old (Howard et al., 2005). This period also corresponds to the maturation of sensory fibers and nociceptive circuits (Fitzgerald, 2005). A β -type afferents contact all laminae in early ages and then gradually retract over the first three postnatal weeks to finally only contact neurons in lamina III and deeper, in the 4th postnatal week (Park et al., 1999; Beggs et al., 2002; Koch and Fitzgerald, 2013).

Interestingly, the main period of soma growth follows that of branches lengthening, i.e. from the 3rd to the 4th postnatal weeks. This suggests that the soma grows to specifically produce proteins and support the assembly of microtubules for neurite growth (Baas and Lin, 2011).

Functional development of lamina III interneurons

Comparative aspects

The 1st postnatal month is also a period of changes in the intrinsic membrane properties of dorsal horn interneurons. In rats, the few studies that focused on the development of these properties revealed that the very membrane characteristics that change are different according to laminae, and within laminae to the classes of interneurons. For example, a significant decrease in membrane resistance is observed in neurons located in deep laminae IV-VI (Hochmann et al., 1997) but not in those in lamina I (Li and Baccei, 2012). Lamina I projection neurons, but not deep laminae interneurons, undergo a decrease in the resting membrane potential. In addition to inter-laminae variations, there are also intra-laminae ones. Indeed, the capacitance of lamina I neurons that project to the parabrachial region, but not of those that project to the peri-aqueductal gray matter, decreases with age. According to lamina II interneurons, two studies in mice have concluded some changes in neuronal intrinsic properties during development such as a decrease in the resistance and in the resting membrane potential (Walsh et al, 2009; Tadros et al, 2012), while no change could be found in rats Baccei and Fitzgerald (2005). These discrepancies may reflect the fact that, in the

latter study, neurons were not dissociated according to their location within outer or inner lamina II. This information is important because not only different populations of neurons with specific neurochemical markers are present in each lamina but the postnatal development of the same neuronal phenotype might also differ between laminae. For example, we recently characterized the development of interneurons expressing the gamma isoform of Protein Kinase C (PKC γ) that play a key role in mechanical allodynia: these interneurons do not appear simultaneously and evolve differently in lamina Ilo and Ili during the first postnatal weeks (Mermet-Joret et al., 2016). Furthermore, we know that the arrival of sensory projections promotes the maturation of sensory spinal circuits (Koch and Fitzgerald, 2013). Of note, neurons within these two lamina II sub-laminae are not contacted by the same afferents (Todd, 2010), and the spatial and temporal maturation of the different sensory fibers is different. Therefore, to better understand the maturation of tactile and nociceptive circuits, it is essential to discriminate neurons according to their specific localization.

Development of intrinsic properties and Ih currents

Our data show that significant changes in the membrane properties of MDH lamina Ili interneurons occur throughout the 1st postnatal month. Rin decreases, RMP becomes more hyperpolarized, and rheobase is lower in newborn animals compared with adult ones, suggesting a developmentally-regulated decrease in the excitability of MDH neurons. Moreover, the proportion of the various discharge categories change markedly between the 1st and the 4th postnatal weeks, such that single spiking dominates in young animals and then subsequently decreases in favor of tonic and phasic firings. This developmental decrease of single action potential profile appears to be a common feature of developing neurons since it has been described in a wide range of neurons within the CNS: retinal ganglion neurons (Wang et al., 1997); phrenic and lumbar motoneurons (Martin-Caraballo and Greer, 1999; Vinay et al., 2000) or SDH (Walsh et al., 2009; Tadros et al., 2012).

More than half of newborn MDH lamina Ili interneurons (60% of the cells) exhibit a membrane potential rectification (“sag”) in response to negative current steps. Sag is produced by inward rectification current (Ih), which has not been previously detected in spinal sensory neurons before the 2nd postnatal week and in very small proportions (Walsh et al., 2009). Our present results in rats are thus at odds with those in mice. Several possible explanations can be proposed for such discrepancy: differences between rat and mouse, or between spinal or medullary dorsal horn neurons, or protocols used to detect Ih currents.

Indeed, in our study, -90 mV hyperpolarizing pulses were not strong enough to detect the expression of this current: it required greater hyperpolarizing pulses. Nonetheless, our data are consistent with other developmental studies in other sensory neurons. In quail, Ih currents are first detected at around embryonic day 10 in both trigeminal and dorsal root ganglia (TG, DRG) and are present in 75% of neurons on the 1st postnatal day (Schlichter et al. 1991). In rats, Ih is also found in the majority TG neurons at every age (from one to more than 30 postnatal days) and hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels carrying Ih are showed to be expressed early in development (Cho et al., 2011).

Conclusion

This study demonstrates that the lamina IIi interneurons undergo significant transformations during postnatal development. These changes in neuronal morphology likely contribute to the physiological development of neurons. For example, the decrease of input resistance with age is consistent with the important increase in neurons soma volume during postnatal development. However, further studies are needed to determine whether there is a direct relationship between the morphological, such as branches length and number, and electrical modifications of interneurons during development.

In addition to these many changes throughout the first postnatal month, lamina IIi interneurons receive both appropriate and inappropriate connections from the periphery (Fitzgerald, 2005) and supraspinal structures (Fitzgerald and Koltzenburg, 1986; Curfs et al., 1994; Park et al., 1999) and some proteins involved in pain appear, whereas others disappear (Charlton and Helke, 1986; Kar and Quirion., 1995; Nandi et al., 2004; Mermet-Joret et al., 2016). All these combined changes certainly contribute to the maturation of pain sensitivity during the postnatal period (Holmberg and Schouenborg, 1996; Nandi and Fitzgerald, 2005; Fitzgerald, 2005; Howard et al., 2005).

Legend

Figure 1: Morphometric analyses of lamina III interneurons.

(A) Representative neuronal arborisation showing the primary (red), secondary (yellow), tertiary (purple) and quaternary (green) branches, with the nodes corresponding to each intersection, and terminal points.

(B) Diagram showing morphometric parameters assessed: DV, dorsoventral neuritic field span, ML or RC, mediolateral or rostrocaudal neuritic field span, DS, neuritic spread from centre of soma to the dorsal limit, VS, neuritic spread from the center of soma to the ventral limit. The measures (in μm) were done according to the lamina II surface.

(C) Scatter plot of DS/VS versus (ML or RC)/DV showing data from all individual neuron without consideration of the age period. The dotted lines represent the DS/VS ratio of 1.2 and (ML or RC)/DV ratio of 1.5 used to distinguish the three categories: central, radial and vertical cells. Interneurons classified in discordance with the visual inspection were considered as “unclassified cell” category.

Figure 2: Developmental changes in the morphology of lamina III interneurons during the first postnatal month.

(A) Representative reconstructions of interneurons at 1wk and 4wk. Abbreviations: D, dorsal; V, ventral; M, medial; L, lateral; wk, postnatal week. Scale bar = 20 μm .

(B-C) Scatter-plot graphs showing the postnatal evolution of total branches length (B1) and number (C1). Development of each branches type: primary, secondary, tertiary, and quaternary branches length (B2) and number (C2) is illustrated by their mean $\pm$ SEM in bar histograms.

(D-F) Scatter-plot graphs showing the postnatal evolution of the number of terminal points (D), the number of nodes (E), the total field area (F), and the fractal dimension (G).

Each point of the scatter-plot graphs represents an individual interneuron and the horizontal lines correspond to the Mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ by one-way ANOVA followed by Holm-Sidak's post hoc. (black stars: 1wk vs 2-3 or 4wk ; blue stars: 2wk vs 3 or 4wk ; orange stars: 3wk vs 4wk).

Figure 3: Developmental evolution of the different morphological types of lamina IIi interneurons.

(A) Representative neuronal reconstructions showing the 4 morphological types: radial, central, vertical and unclassified cells. The dashed lines represent the limit of each lamina. Abbreviations : LI, lamina I; LIIo, outer part of lamina II; LIIi, inner part of lamina II; LIII, lamina III; Scale bare = 20 μm .

(B) Evolution of the proportion of interneurons (%) according to the different morphological types (n=number of neurons).

Figure 4: Developmental evolution of the soma according to their morphology.

(A) Representative photomicrographs of filled interneurons with neurobiotin showing the three types of cell body : spherical, fusiform and multipolar at 1wk (up) versus 4wk (down). Scale bare = 10 μm .

(B) Evolution of the proportion of interneurons (%) according to the soma shape.

(C) Postnatal evolution of the volume of soma (μm^3) according to their shapes. Each point represents an individual interneuron and the horizontal lines correspond to the mean $\pm$ SEM. ***P < 0.001, ****P < 0.0001 by one-way ANOVA followed by Holm-Sidak's post hoc. (black stars: 1wk vs 2-3 or 4wk ; blue stars: 2wk vs 3 or 4wk ; orange stars: 3wk vs 4wk).

Figure 5: Developmental evolution of membrane and action potential (AP) properties.

(A) Passive properties development from 1 to 4 postnatal weeks. (A1) Example of voltage responses at 1wk (black trace) versus 4wk (grey trace) to hyperpolarizing current steps (below). The membrane potential was designated as the resting membrane potential (RMP). The input resistance (R_{in}) was calculated based on ΔV and ΔI . (A2) The developmental changes of RMP (up) and R_{in} (down) are shown in scatter-plots graphs.

(B) Postnatal evolution of action potential properties. (B1) Voltage recordings depicting the parameters characterized: AP amplitude and half-width. The up trace corresponds to 1wk AP example and the down trace corresponds to 4wk AP example. (B2) The developmental changes of AP half-width (down) and AP amplitude (up) are shown in scatter-plots graphs. Each point of the scatter-plot graphs represents an individual interneuron and the horizontal line corresponds to the mean $\pm$ SEM. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001

by one-way ANOVA followed by Holm-Sidak's post hoc. (black stars: 1wk vs 2-3 or 4wk ; blue stars: 2wk vs 3 or 4wk ; orange stars: 3wk vs 4wk). wk, postnatal week.

Figure 6: Developmental evolution of excitability in lamina III interneurons.

(A) Postnatal evolution of Rheobase. (A1) Example of neuronal responses to depolarizing current injections at 1wk versus 4wk. The current necessary to trigger the first action potential was noted as the rheobase. (A2) The developmental changes of Rheobase is shown in scatter-plots graphs.

(B) Postnatal evolution of firing profiles. (B1) Examples of firing patterns evoked by depolarizing current injection of $1.5 \times$ Rheobase. (B2) Evolution of the proportion of interneurons (%) according to the four different firing patterns (n = number of neurons).

Each point of the scatter-plot graphs represents an individual interneuron and the horizontal line correspond to the Mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ by one-way ANOVA followed by Holm-Sidak's post hoc. (black stars: 1wk vs 2-3 or 4wk ; blue stars: 2wk vs 3 or 4wk ; orange stars: 3wk vs 4wk). wk, postnatal week.

Figure 7: Prevalence of subthreshold currents in lamina III interneurons across the first postnatal month.

(A) Postnatal evolution of “sag” and Post-inhibitory rebound expression (PIR). (A1) Hyperpolarizing current step (bottom) induces voltage-responses showing either the absence of rectification (non-rectifying cell) or the typical hyperpolarizing “sag” (arrowhead, rectifying cell). (A2) Evolution of the proportion of interneurons (%) according to their expression of sag and PIR (n =number of neurons).

(B) Postnatal evolution of I_A -like currents. (B1) Representative traces showing slow-A and rapid-A currents induced by hyperpolarization of interneurons from a membrane potential of -65mV to -90 mV and then to -40 mV (bottom trace). (B2) Evolution of the proportion of interneurons (%) according to their expression of slow- I_A , rapid- I_A or no I_A (n =number of neurons). wk, postnatal week.

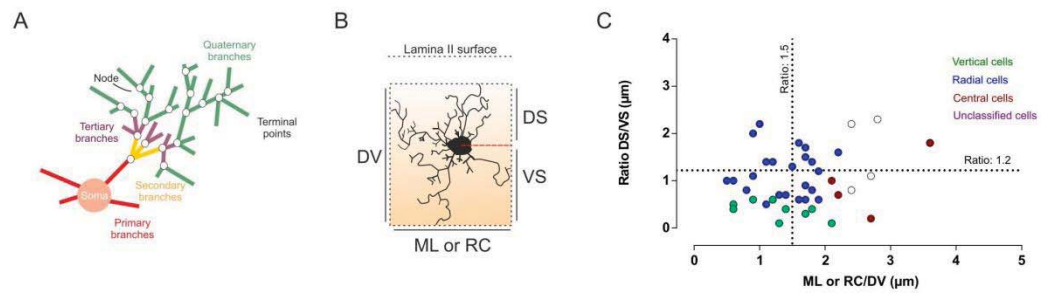


Figure 1

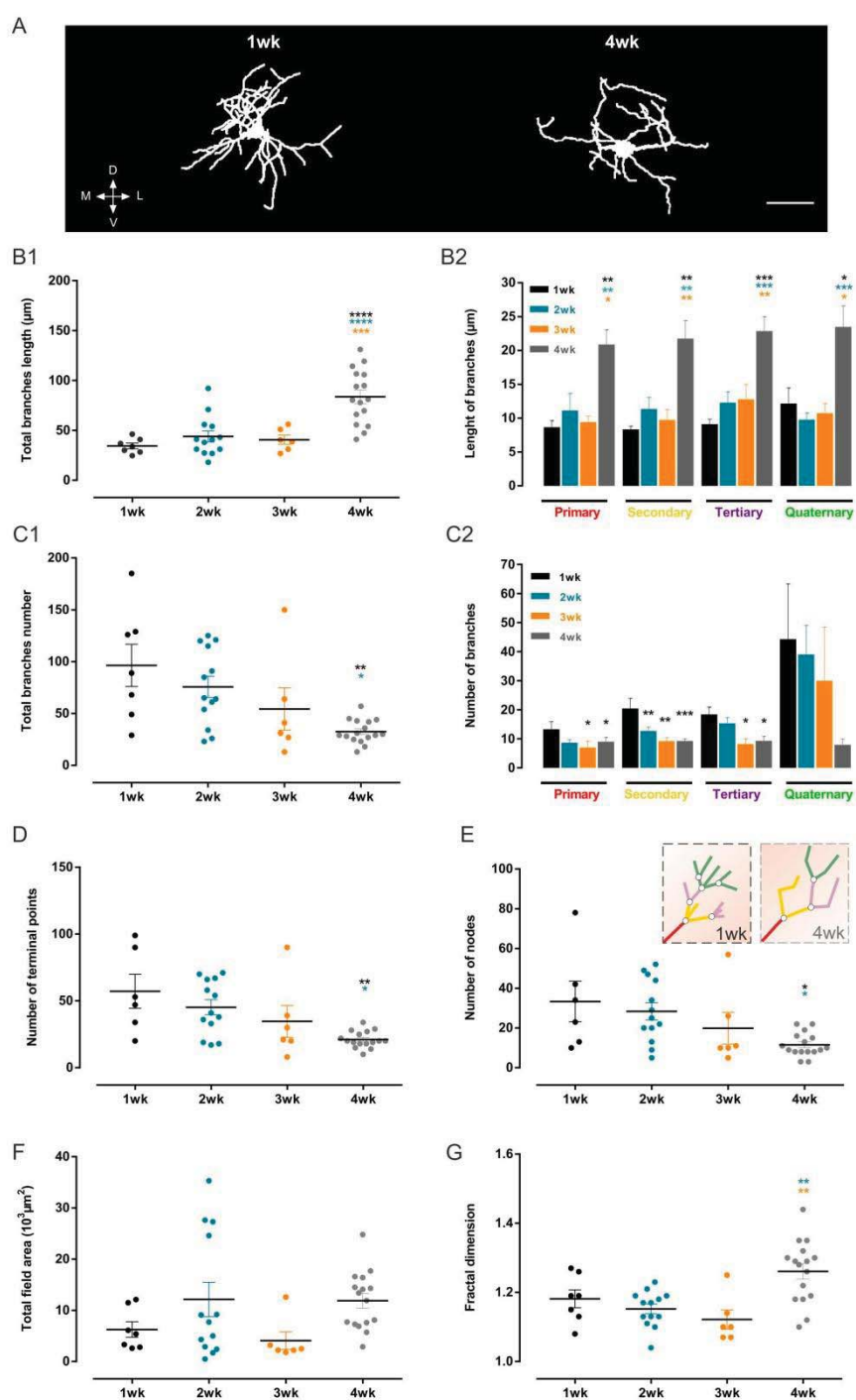


Figure 2

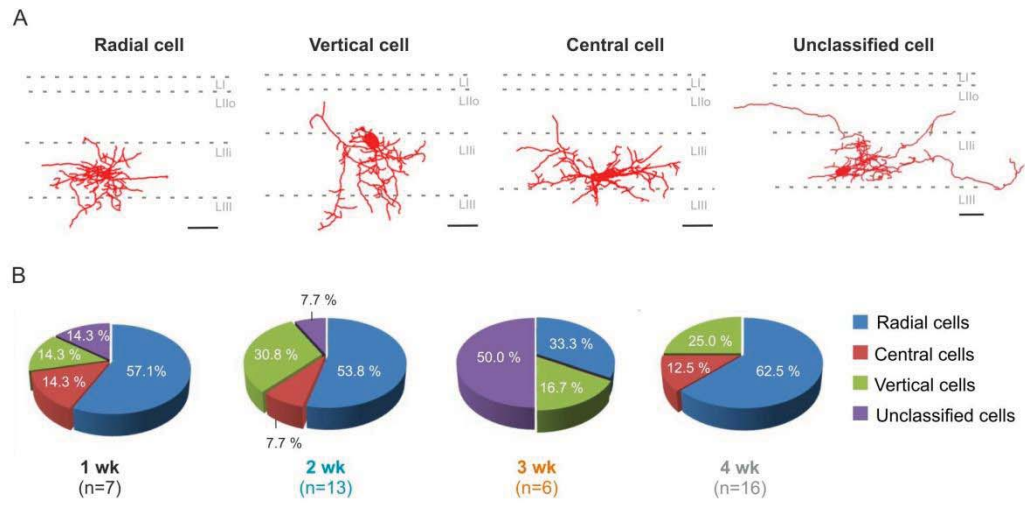


Figure 3

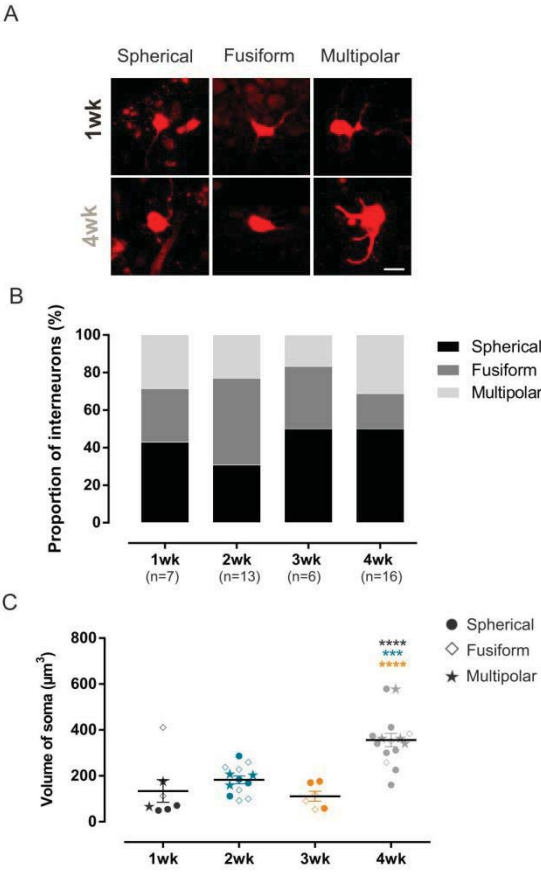


Figure 4

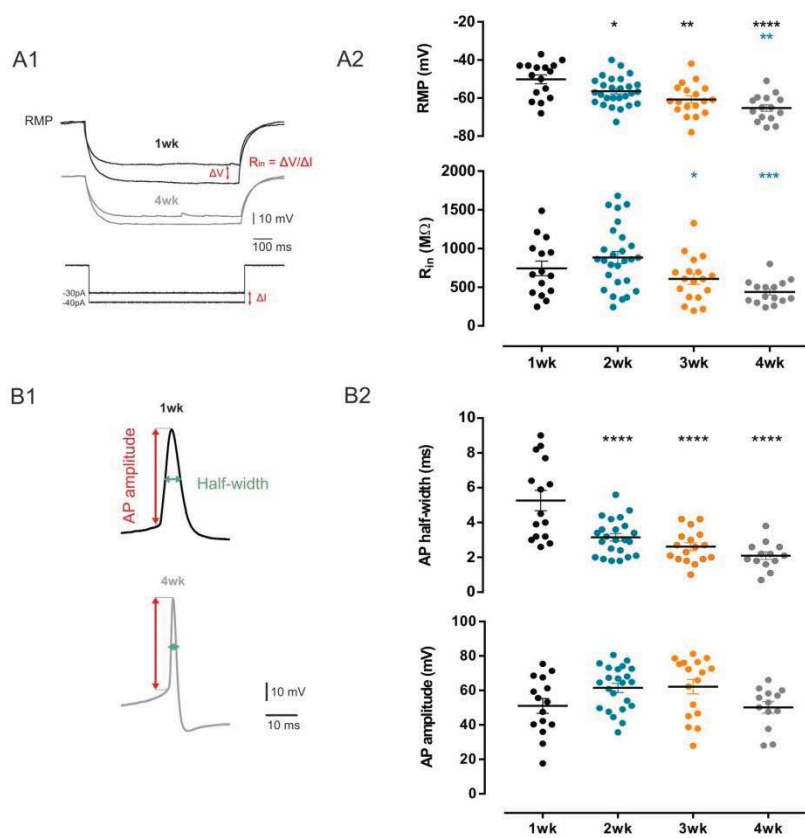


Figure 5

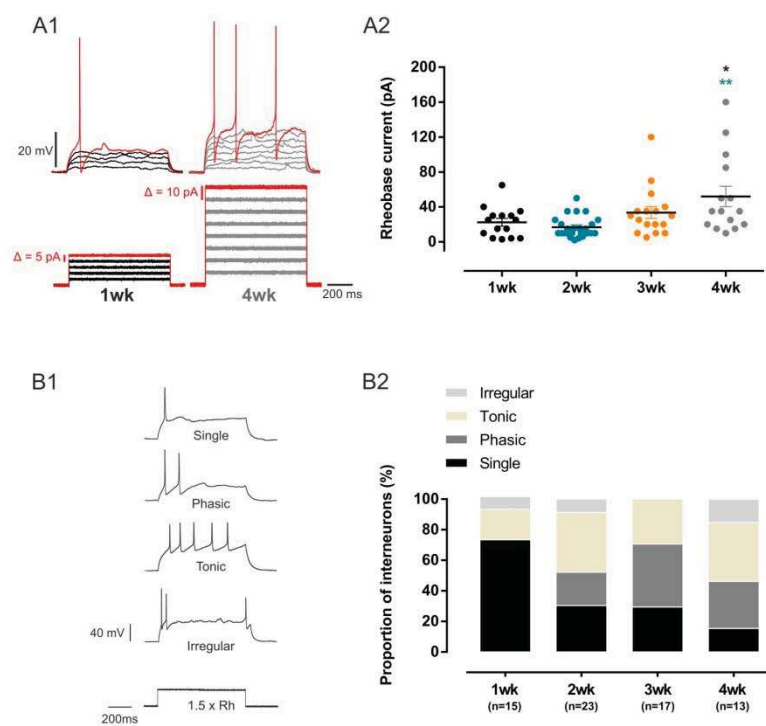


Figure 6

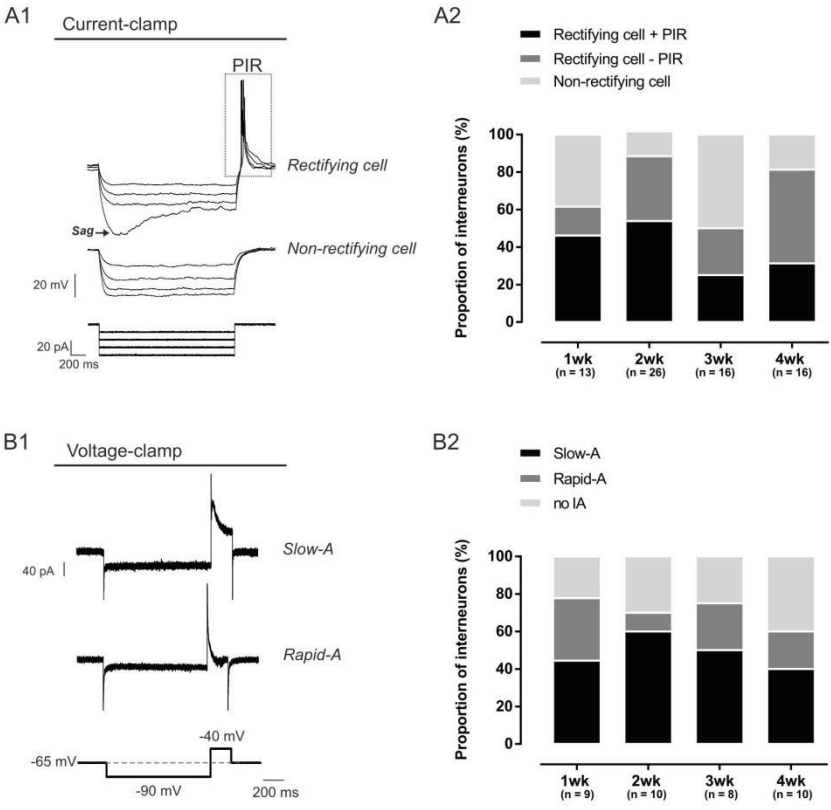


Figure 7

TABLE I
Morphologic features of lamina III MDH interneurons during postnatal development

Postnatal weeks	n	Length of branches				Number of branches				Number of terpoints	Number of nodes	Field area (µm ³)	Fractal dimension	Volume of soma (µm ³)
		Total	I	II	III	IV	Total	I	II	III	IV			
1wk	7	34.4 ± 2.8	8.7 ± 1.0	8.3 ± 0.5	9.1 ± 0.7	12.1 ± 2.3	96.4 ± 20.4	13.3 ± 2.6	20.4 ± 3.5	18.4 ± 2.5	44.3 ± 19.0	57.2 ± 12.7	33.3 ± 10.2	6.3 ± 1.5
2wk	13	43.8 ± 5.6	11.1 ± 2.5	11.3 ± 1.7	12.3 ± 1.6	9.8 ± 1.0	75.7 ± 10.2	8.7 ± 1.0	12.7 ± 1.3 *	15.3 ± 2.0	39.0 ± 10.0	45.2 ± 5.6	23.4 ± 4.3	12.1 ± 3.3
3wk	6	40.6 ± 4.6	9.4 ± 0.9	9.7 ± 1.5	12.9 ± 2.2	10.7 ± 1.4	54.3 ± 20.4	7.0 ± 2.1 *	9.1 ± 1.2 **	8.2 ± 1.8 *	30.0 ± 18.4	34.7 ± 11.8	19.8 ± 8.0	4.0 ± 1.7
4wk	16	83.7 ± 6.8 ****	20.9 ± 2.2 **	21.8 ± 2.6 **	22.9 ± 2.1 ***	23.5 ± 3.1 *	32.5 ± 2.8 **	7.6 ± 0.5 *	9.2 ± 0.8 ***	9.3 ± 1.5 *	6.3 ± 1.3	21.1 ± 1.5 **	11.5 ± 1.5 *	11.9 ± 1.4 **

Data represent the mean ± SEM

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 and ****p < 0.0001, compared with the first postnatal week (1wk) by one-way anova test followed by Holm-Sidak's post hoc analysis.

TABLE 2 *Intrinsic properties of MDH interneurons during postnatal development*

Postnatal weeks	Membrane properties			AP characteristics			Discharge Properties	
	Capacitance, pF	RMP, mV	Input resistance, M Ω	Amplitude, mV	Half-width, ms	Rheobase, pA	Main firing profile, %	
1wk	45.0 $\pm$ 2.7 (15)	-50.2 $\pm$ 2.3 (16)	742 $\pm$ 94.3 (15)	51.0 $\pm$ 4.3 (15)	5.3 $\pm$ 0.2 (15)	22.3 $\pm$ 4.4 (15)	Single (73.3%)	
2wk	39.5 $\pm$ 2.7 (28)	-56.4 $\pm$ 1.4 (27) *	884 $\pm$ 78.2 (27)	61.5 $\pm$ 2.6 (23)	3.2 $\pm$ 0.2 (23) ****	16.8 $\pm$ 2.4 (24)	Tonic (39.1 %)	
3wk	37.5 $\pm$ 3.8 (18)	-60.8 $\pm$ 1.9 (18) ***	605 $\pm$ 68.3 (18)	62.2 $\pm$ 4.1 (17)	2.6 $\pm$ 0.2 (17) ****	33.5 $\pm$ 6.8 (17)	Phasic (41.1%)	
4wk	41.5 $\pm$ 3.7 (15)	-65.2 $\pm$ 1.8 (15) ****	437.5 $\pm$ 39.5 (15) *	50.1 $\pm$ 3.3 (13)	2.1 $\pm$ 0.2 (13) ****	52.0 $\pm$ 11.7 (15)*	Tonic/phasic (38.4%/30.7%)	

Data represent the mean $\pm$ SEM. Values in parenthesis give the number of recorded interneurons. RMP, resting membrane potential.

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 and ****P < 0.0001, compared with the first postnatal week (1wk) by one-way anova test followed by Holm-Sidak's post hoc analysis.

Bibliography

- Alba-Delgado, C., El Khoueiry, C., Peirs, C., Dallel, R., Artola, A., and Antri, M. (2015). Subpopulations of PKC γ interneurons within the medullary dorsal horn revealed by electrophysiologic and morphologic approach. *Pain* 156, 1714–1728.
- Baas, P.W., and Lin, S. (2011). Hooks and comets: The story of microtubule polarity orientation in the neuron. *Dev. Neurobiol.* 71, 403–418.
- Baccei, M.L., and Fitzgerald, M. (2005). Intrinsic firing properties of developing rat superficial dorsal horn neurons. *Neuroreport* 16, 1325–1328.
- Beggs, S., Torsney, C., Drew, L.J., and Fitzgerald, M. (2002). The postnatal reorganization of primary afferent input and dorsal horn cell receptive fields in the rat spinal cord is an activity-dependent process. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1249–1258.
- Bicknell, H.R., and Beal, J.A. (1984). Axonal and dendritic development of substantia gelatinosa neurons in the lumbosacral spinal cord of the rat. *J. Comp. Neurol.* 226, 508–522.
- Cameron, W.E., He, F., Kalipatnapu, P., Jodkowski, J.S., and Guthrie, R.D. (1991). Morphometric analysis of phrenic motoneurons in the cat during postnatal development. *J. Comp. Neurol.* 314, 763–776.
- Carrascal, L., Nieto-Gonzalez, J.L., Cameron, W.E., Torres, B., and Nunez-Abades, P.A. (2005). Changes during the postnatal development in physiological and anatomical characteristics of rat motoneurons studied in vitro. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 49, 377–387.
- Charlton, C.G., and Helke, C.J. (1986). Ontogeny of substance P receptors in rat spinal cord: quantitative changes in receptor number and differential expression in specific loci. *Brain Res.* 394, 81–91.
- Cho, H.-J., Furness, J.B., and Jennings, E.A. (2011). Postnatal maturation of the hyperpolarization-activated cation current, I(h), in trigeminal sensory neurons. *J. Neurophysiol.* 106, 2045–2056.
- Curfs, M.H., Gribnau, A.A., and Dederen, P.J. (1993). Postnatal maturation of the dendritic fields of motoneuron pools supplying flexor and extensor muscles of the distal forelimb in the rat. *Dev. Camb. Engl.* 117, 535–541.
- Curfs, M.H., Gribnau, A.A., and Dederen, P.J. (1994). Selective elimination of transient corticospinal projections in the rat cervical spinal cord gray matter. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 78, 182–190.
- Cutting, J.E., and Garvin, J.J. (1987). Fractal curves and complexity. *Percept. Psychophys.* 42, 365–370.
- Dekkers, J., Becker, D.L., Cook, J.E., and Navarrete, R. (1994). Early postnatal changes in the somatodendritic morphology of ankle flexor motoneurons in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 6, 87–97.
- Duan, B., Cheng, L., Bourane, S., Britz, O., Padilla, C., Garcia-Campmany, L., Krashes, M., Knowlton, W., Velasquez, T., Ren, X., et al. (2014). Identification of Spinal Circuits Transmitting and Gating Mechanical Pain. *Cell* 159, 1417–1432.
- Fitzgerald, M. (2005). The development of nociceptive circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 507–520.
- Fitzgerald, M., and Koltzenburg, M. (1986). The functional development of descending inhibitory pathways in the dorsolateral funiculus of the newborn rat spinal cord. *Brain Res.* 389, 261–270.

- Geisler, H.C., Westerga, J., and Gramsbergen, A. (1993). Development of posture in the rat. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* 53, 517–523.
- Gonzalez, D.L., Fuchs, J.L., and Droge, M.H. (1993). Distribution of NMDA receptor binding in developing mouse spinal cord. *Neurosci. Lett.* 151, 134–137.
- Grudt, T.J., and Perl, E.R. (2002). Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *J. Physiol.* 540, 189–207.
- Hochman, S., Garraway, S.M., and Pockett, S. (1997). Membrane properties of deep dorsal horn neurons from neonatal rat spinal cord in vitro. *Brain Res.* 767, 214–219.
- Holmberg, H., and Schouenborg, J. (1996). Postnatal development of the nociceptive withdrawal reflexes in the rat: a behavioural and electromyographic study. *J. Physiol.* 493 (Pt 1), 239–252.
- Howard, R.F., Walker, S.M., Mota, P.M., and Fitzgerald, M. (2005). The ontogeny of neuropathic pain: postnatal onset of mechanical allodynia in rat spared nerve injury (SNI) and chronic constriction injury (CCI) models. *Pain* 115, 382–389.
- Jamon, M., and Clarac, F. (1998). Early walking in the neonatal rat: a kinematic study. *Behav. Neurosci.* 112, 1218–1228.
- Kalb, R.G. (1994). Regulation of motor neuron dendrite growth by NMDA receptor activation. *Dev. Camb. Engl.* 120, 3063–3071.
- Kar, S., and Quirion, R. (1995). Neuropeptide receptors in developing and adult rat spinal cord: an in vitro quantitative autoradiography study of calcitonin gene-related peptide, neurokinins, mu-opioid, galanin, somatostatin, neurotensin and vasoactive intestinal polypeptide receptors. *J. Comp. Neurol.* 354, 253–281.
- Kerai, B., Greensmith, L., Vrbová, G., and Navarrete, R. (1995). Effect of transient neonatal muscle paralysis on the growth of soleus motoneurons in the rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 85, 89–95.
- Koch, S.C., and Fitzgerald, M. (2013). Activity-dependent development of tactile and nociceptive spinal cord circuits. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1279, 97–102.
- Li, J., and Bacceti, M.L. (2012). Developmental regulation of membrane excitability in rat spinal lamina I projection neurons. *J. Neurophysiol.* 107, 2604–2614.
- Longair, M.H., Baker, D.A., and Armstrong, J.D. (2011). Simple Neurite Tracer: open source software for reconstruction, visualization and analysis of neuronal processes. *Bioinformatics* 27, 2453–2454.
- Martin-Caraballo, M., and Greer, J.J. (1999). Electrophysiological Properties of Rat Phrenic Motoneurons During Perinatal Development. *J. Neurophysiol.* 81, 1365–1378.
- Mermet-Joret, N., Chatila, N., Pereira, B., Monconduit, L., Dallel, R., and Antri, M. (2016). Lamina specific postnatal development of PKC γ interneurons within the rat medullary dorsal horn. *Dev. Neurobiol.*
- Miracourt, L.S., Dallel, R., and Voisin, D.L. (2007). Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through PKC γ interneurons. *PLoS One* 2, e1116.
- Miracourt, L.S., Peirs, C., Dallel, R., and Voisin, D.L. (2011). Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through astrocyte-derived D-serine. *Pain* 152, 1340–1348.

- Nandi, R., and Fitzgerald, M. (2005). Opioid analgesia in the newborn. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 9, 105–108.
- Nandi, R., Beacham, D., Middleton, J., Koltzenburg, M., Howard, R.F., and Fitzgerald, M. (2004). The functional expression of mu opioid receptors on sensory neurons is developmentally regulated; morphine analgesia is less selective in the neonate. *Pain* 111, 38–50.
- Núñez-Abades, P.A., and Cameron, W.E. (1995). Morphology of developing rat genioglossal motoneurons studied in vitro: relative changes in diameter and surface area of somata and dendrites. *J. Comp. Neurol.* 353, 129–142.
- Núñez-Abades, P.A., He, F., Barrionuevo, G., and Cameron, W.E. (1994). Morphology of developing rat genioglossal motoneurons studied in vitro: changes in length, branching pattern, and spatial distribution of dendrites. *J. Comp. Neurol.* 339, 401–420.
- Park, J.S., Nakatsuka, T., Nagata, K., Higashi, H., and Yoshimura, M. (1999). Reorganization of the primary afferent termination in the rat spinal dorsal horn during post-natal development. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 113, 29–36.
- Peirs, C., Patil, S., Bouali-Benazzouz, R., Artola, A., Landry, M., and Dallel, R. (2014). Protein kinase C gamma interneurons in the rat medullary dorsal horn: distribution and synaptic inputs to these neurons, and subcellular localization of the enzyme. *J. Comp. Neurol.* 522, 393–413.
- Peirs, C., Bourgois, N., Artola, A., and Dallel, R. (2016). Protein Kinase C γ Interneurons Mediate C-fiber-induced Orofacial Secondary Static Mechanical Allodynia, but Not C-fiber-induced Nociceptive Behavior. *Anesthesiology* 124, 1136–1152.
- Pham-Dang, N., Descheemaeker, A., Dallel, R., and Artola, A. (2016). Activation of medullary dorsal horn γ isoform of protein kinase C interneurons is essential to the development of both static and dynamic facial mechanical allodynia. *Eur. J. Neurosci.* 43, 802–810.
- Romand, S., Wang, Y., Toledo-Rodriguez, M., and Markram, H. (2011). Morphological development of thick-tufted layer V pyramidal cells in the rat somatosensory cortex. *Front. Neuroanat.* 5, 5.
- Ruscheweyh, R., Ikeda, H., Heinke, B., and Sandkühler, J. (2004). Distinctive membrane and discharge properties of rat spinal lamina I projection neurones in vitro. *J. Physiol.* 555, 527–543.
- Ryan, S.J., Ehrlich, D.E., and Rainnie, D.G. (2014). Morphology and dendritic maturation of developing principal neurons in the rat basolateral amygdala. *Brain Struct. Funct.* 221, 839–854.
- Schlichter, R., Bader, C.R., and Bernheim, L. (1991). Development of anomalous rectification (I_h) and of a tetrodotoxin-resistant sodium current in embryonic quail neurones. *J. Physiol.* 442, 127.
- Smith, K.M., Boyle, K.A., Madden, J.F., Dickinson, S.A., Jobling, P., Callister, R.J., Hughes, D.I., and Graham, B.A. (2015). Functional heterogeneity of calretinin-expressing neurons in the mouse superficial dorsal horn: implications for spinal pain processing. *J. Physiol.* 593, 4319–4339.
- Smith Jr., T.G., Lange, G.D., and Marks, W.B. (1996). Fractal methods and results in cellular morphology — dimensions, lacunarity and multifractals. *J. Neurosci. Methods* 69, 123–136.
- South, S.M., Kohno, T., Kaspar, B.K., Hegarty, D., Vissel, B., Drake, C.T., Ohata, M., Jenab, S., Sailer, A.W., Malkmus, S., et al. (2003). A conditional deletion of the NR1 subunit of the NMDA receptor in adult spinal cord dorsal horn reduces NMDA currents and injury-induced pain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 5031–5040.

- Tadros, M.A., Harris, B.M., Anderson, W.B., Brichta, A.M., Graham, B.A., and Callister, R.J. (2012). Are all spinal segments equal: intrinsic membrane properties of superficial dorsal horn neurons in the developing and mature mouse spinal cord. *J. Physiol.* 590, 2409–2425.
- Todd, A.J. (2010). Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 823–836.
- Ulfhake, B., Cullheim, S., and Franson, P. (1988). Postnatal development of cat hind limb motoneurons. I: Changes in length, branching structure, and spatial distribution of dendrites of cat triceps surae motoneurons. *J. Comp. Neurol.* 278, 69–87.
- Vinay, L., Brocard, F., Pflieger, J.-F., Simeoni-Alias, J., and Clarac, F. (2000). Perinatal development of lumbar motoneurons and their inputs in the rat. *Brain Res. Bull.* 53, 635–647.
- Walsh, M.A., Graham, B.A., Brichta, A.M., and Callister, R.J. (2009). Evidence for a critical period in the development of excitability and potassium currents in mouse lumbar superficial dorsal horn neurons. *J. Neurophysiol.* 101, 1800–1812.
- Wang, G.-Y., Ratto, G.-M., Bisti, S., and Chalupa, L.M. (1997). Functional Development of Intrinsic Properties in Ganglion Cells of the Mammalian Retina. *J. Neurophysiol.* 78, 2895–2903.
- Watanabe, M., Mishina, M., and Inoue, Y. (1994). Distinct spatiotemporal distributions of the N-methyl-D-aspartate receptor channel subunit mRNAs in the mouse cervical cord. *J. Comp. Neurol.* 345, 314–319.
- Westerga, J., and Gramsbergen, A. (1990). The development of locomotion in the rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 57, 163–174.
- Westerga, J., and Gramsbergen, A. (1992). Structural changes of the soleus and the tibialis anterior motoneuron pool during development in the rat. *J. Comp. Neurol.* 319, 406–416.
- Yasaka, T., Kato, G., Furue, H., Rashid, M.H., Sonohata, M., Tamae, A., Murata, Y., Masuko, S., and Yoshimura, M. (2007). Cell-type-specific excitatory and inhibitory circuits involving primary afferents in the substantia gelatinosa of the rat spinal dorsal horn in vitro. *J. Physiol.* 581, 603–618.
- Yasaka, T., Tiong, S.Y.X., Hughes, D.I., Riddell, J.S., and Todd, A.J. (2010). Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach. *Pain* 151, 475–488.
- Zeilhofer, H.U., Wildner, H., and Yévenes, G.E. (2012). Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiol. Rev.* 92, 193–235.
- Zhang, Z. (2004). Maturation of Layer V Pyramidal Neurons in the Rat Prefrontal Cortex: Intrinsic Properties and Synaptic Function. *J. Neurophysiol.* 91, 1171–1182.
- Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109–110.

Discussion générale



Greg A Dunn Design, Japanese Maple

Dans le Sp5C, comme dans la moelle épinière, les neurones des couches superficielles sont caractérisés par l'expression de phénotypes particuliers, et de morphologies et propriétés électrophysiologiques spécifiques. Les différences de sensibilité entre les nouveau-nés et les adultes peuvent être dues, en partie, à une maturation tardive de ces interneurons. Ce postulat a en effet été proposé dans plusieurs études réalisées au niveau spinal (Walsh et al., 2009, Tadros et al., 2012 ; Li and Baccei, 2012 ; Baccei and Fitzgerald, 2005). Dans le Sp5C, les travaux que nous avons effectués ont permis de montrer que les interneurons des couches superficielles subissent également un grand nombre de changements au cours des premières semaines postnatales. Nous avons tout d'abord mis en évidence que les interneurons qui expriment le phénotype PKC γ ont une maturation spatiale et temporelle différente en fonction des couches étudiées. Puis, l'étude développementale des propriétés morphologiques et membranaires de l'ensemble des neurones de la couche III a permis d'identifier de profonds remaniements structuraux ainsi que des changements fonctionnels.

1- Evolution des interneurons PKC γ

Les trois premières semaines postnatales sont une période critique pour le développement des interneurons PKC γ . Néanmoins, ce développement n'est pas identique entre les différentes couches inspectées. En effet, les couches les plus superficielles I et IIe contiennent déjà des interneurons PKC γ dès le stade le plus précoce de notre étude, mais la densité des neurones évolue peu par la suite. La couche III contient également des interneurons PKC γ aux stades précoces, mais contrairement aux couches I et IIe, la densité d'interneurons PKC γ dans la couche III va diminuer significativement dès la fin de la deuxième semaine postnatale. A l'inverse, les interneurons PKC γ n'apparaissent dans la couche III qu'à la fin de la première semaine postnatale, puis leur densité augmente rapidement pour atteindre un patron d'expression mature à la fin de la deuxième semaine postnatale.

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour comprendre cette augmentation au sein de la couche III. Dans un premier temps, nous avons testé l'hypothèse d'une prolifération cellulaire. Chez les mammifères, une étude récente a mis en évidence le fait que la neurogenèse n'est pas restreinte aux stades embryonnaires, mais perdure à l'âge adulte dans des neurones GABAergiques localisés dans la CDS (Shechter et al., 2007). Dans notre étude, l'injection de BrdU pendant la période correspondant à l'apparition des interneurons en couche III, ne nous a pas permis d'observer de neurogenèse des interneurons PKC γ spécifiquement. La seconde

hypothèse que nous avons avancée était une migration des interneurons de la couche III vers la couche IIi. Cette hypothèse a été suggérée dans plusieurs études réalisées au niveau cortical, par exemple la migration des neurones corticaux dans la couche IV vers leur destination finale a pu être inhibée entre 1 et 3 jours après la naissance (Adle-Biassette et al., 2007). Cependant, dans notre étude, cette hypothèse est peu probable car l'évolution des interneurons des couches IIi et III n'est pas concomitante : la population d'interneurons PKC γ est stable dans la couche III alors qu'elle augmente dans la couche IIi, et lorsque leur densité atteint un patron mature dans la couche IIi, le nombre d'interneurons diminue dans la couche III. Une dernière hypothèse, la plus probable, serait que des neurones précurseurs existants restent dans un état postmitotique pendant une certaine période avant d'acquérir leur phénotype final et exprimer la PKC γ . Cette acquisition tardive d'un phénotype dans des neurones précurseurs a déjà été démontrée dans les neurones du DRG immunoréactifs pour le CGRP, la SP et l'IB4 (Farel, 2002, 2003).

En ce qui concerne les interneurons de la couche III, nous avons observé une diminution très importante de leur nombre dès la fin de la deuxième semaine postnatale. Si cette diminution ne semble pas être due à une migration des interneurons PKC γ (voir ci-dessus), elle pourrait être expliquée par une perte de phénotype ou une mort neuronale. En effet, lorsque l'on regarde le nombre de neurones totaux (marquage neuronal, NeuN), une diminution est bien présente à ces stades.

L'existence de sous-populations de neurones PKC γ , caractérisées par leurs localisations, le type d'afférences qu'ils reçoivent, leurs phénotypes, leurs morphologies ou encore leurs propriétés physiologiques, peut expliquer l'évolution différente de ces neurones dans chaque couche. Par exemple, les neurones PKC γ localisés dans la couche I sont principalement des neurones de projections (Polgár et al., 1999), alors que ceux localisés dans la couche II sont des interneurons (Gutierrez-Mecinas et al., 2016; Peirs et al., 2014). De plus, nous savons que l'arrivée des projections sensorielles favorise la maturation des circuits sensoriels spinaux (Koch and Fitzgerald, 2013). Or, non seulement les neurones de ces deux couches ne sont pas contactés par les mêmes afférences, mais en plus la maturation spatiale et temporelle de l'ensemble des fibres sensorielles n'est pas identique (Aita et al., 2005a; Beggs et al., 2002; Fitzgerald, 1987; Jackman and Fitzgerald, 2000; Lorenzo et al., 2008; Pignatelli et al., 1989). Les afférences nociceptives de type C contactent les neurones de la couche I dès les stades embryonnaires pour devenir matures au cours de la deuxième semaine post-natale, alors que les afférences non-nociceptives de type A β contactent l'ensemble des couches superficielles aux stades précoces

puis vont se rétracter et ne contacter les neurones des couches III-V qu'à partir de la troisième semaine post-natale (Koch and Fitzgerald, 2013).

D'autre part, nous savons qu'au sein d'une même couche les interneurones PKC γ ont des caractéristiques phénotypiques mais aussi morphologiques et électrophysiologiques différentes. Au niveau spinal, certains interneurones PKC γ expriment d'autres marqueurs comme la neurotensine (76%) ou la somatostatine (45%) (Polgar et al., 1999). Dans le Sp5C, 5.9 % des interneurones PKC γ expriment la calbindine, 5.6 % la calrétinine et 4.1% la parvalbumine (Ni et al., 2002). Notre équipe a également montré récemment qu'il existait au moins deux sous-populations d'interneurones PKC γ (centrale et radiale) au sein de la couche III de la corne dorsale bulbaire (Alba-Delgado et al., 2015), et ces sous-populations ont des caractéristiques physiologiques qui leur sont propres. Par exemple, la résistance membranaire et la rhéobase des interneurones PKC γ centraux sont inférieures à celles des interneurones PKC γ radiaux. De plus, 70% des interneurones PKC γ centraux ont un profil de décharge tonique, contre moins de 30% des interneurones PKC γ radiaux. L'ensemble de ces données suggèrent que les interneurones PKC γ constituent une population hétérogène, avec un développement différent en fonction des couches, et qui pourrait également varier à l'intérieur d'une même couche selon le sous-type d'interneurones PKC γ étudié.

2- Influence des afférences sensorielles et descendantes sur le développement des interneurones PKC γ dans la couche III du Sp5C

Nous avons montré que les interneurones PKC γ de la couche III apparaissent progressivement au cours de deux premières semaines post-natales. Durant cette période, de profonds remaniements des fibres qui transmettent l'information tactile (Beggs et al., 2002) et douloureuse (Fitzgerald, 1987) ont lieu. La rétractation des fibres A β des couches superficielles I et IIe aux stades précoces vers les couches III à V chez l'adulte dépend de l'activité des fibres C (Torsney et al., 2000). Or, les fibres C deviennent justement matures au cours de la deuxième semaine postnatale chez le rat (Beggs et al., 2002), ce qui semble coïncider avec le développement des interneurones PKC γ . Nous avons donc émis l'hypothèse que ce développement progressif des interneurones PKC γ serait lié à l'apparition des fibres nociceptives. Pour répondre à cette question, un traitement néonatal à la capsaïcine a été administré deux jours après la naissance des ratons, afin d'empêcher le développement des fibres C. Dans ces conditions, les animaux une fois adultes présentent une réduction de la réponse face

à un stimulus nociceptif. C'est d'ailleurs cette différence de réponse comportementale par rapport aux animaux naïfs qui permet de vérifier de manière non-invasive l'efficacité du traitement (Szolcsányi et al., 1975). Nos résultats montrent que le traitement néonatal à la capsaïcine ne perturbe pas l'évolution des interneurons PKC γ dans le Sp5C, et donc que le développement de ces interneurons est indépendant du développement des fibres C.

Toutefois, l'utilisation d'un test comportemental ne permet pas de savoir dans quelle mesure les fibres non-myélinisées sont altérées, ni si certaines fibres sont plus sensibles que d'autres au traitement. Dans une étude préliminaire que j'ai réalisée au cours de ma thèse, nous avons donc exploré l'effet d'un traitement néonatal à la capsaïcine sur deux contingents de fibres C : les fibres CGRP et IB4. Les résultats de cette étude sont présentés en **annexe 1**.

D'autres facteurs pourraient également influencer le développement des interneurons PKC γ , par exemple le développement des voies descendantes et notamment des voies sérotoninergiques. Nous avons vu dans le chapitre I que les contrôles descendants sérotoninergiques jouent un rôle majeur dans la modulation de la douleur en agissant sur la transmission nociceptive au sein de la CDS et du Sp5C (pour revue Bardin, 2011; Okamoto et al., 2007). A la naissance, les afférences sérotoninergiques qui projettent dans la CDS sont considérablement moins denses que chez l'adulte. La densité des fibres augmente au cours des premières semaines postnatales pour atteindre un profil d'expression mature 14 jours après la naissance dans la CDS cervicale (Bregman, 1987). Or, nous avons vu que l'expression de la PKC γ apparaît dans la couche Iii à la fin de la première semaine postnatale et que la densité d'interneurons immunoréactifs pour la PKC γ augmente progressivement pour devenir mature à la fin de la deuxième semaine de vie. Une hypothèse serait donc que le développement des interneurons PKC γ serait lié à l'apparition des fibres sérotoninergiques. Parmi les récepteurs 5-HT qui pourraient agir sur les interneurons PKC γ , les récepteurs 5-HT_{2A} sont particulièrement intéressants pour plusieurs raisons. Tout d'abord, ces deux protéines ont le même patron d'expression au niveau des interneurons excitateurs de la couche Iii de la CDS (Doly et al., 2004) et du Sp5C (Fay and Kubin, 2000). De plus, elles ont un rôle plutôt facilitateur de la douleur (Kayser et al., 2007; Malmberg et al., 1997b; Nakajima et al., 2011; Ohsawa et al., 2001; Okamoto et al., 2005; Thibault et al., 2008; Van Steenwinckel et al., 2008) et l'une et l'autre semblent être impliquées dans la même voie de transduction, la voie des PLC (Codazzi et al., 2006; Hannon and Hoyer, 2008). Dans une étude préliminaire que j'ai réalisée durant mon travail de thèse, nous avons donc tenté de déterminer si la sérotonine et l'agoniste du récepteurs 5-

HT2A sont capables de moduler les propriétés électrophysiologiques et morphologiques des interneurons PKC γ au cours du développement. Cette étude est présentée dans l'**annexe 2**.

3- Evolution postnatale des propriétés électrophysiologiques des interneurons de la couche Ili du Sp5C

Le premier mois postnatal constitue également une période de profondes modifications des propriétés membranaires et de l'excitabilité des interneurons de la couche Ili du Sp5C. En effet, le potentiel de repos s'hyperpolarise, la rhéobase augmente au cours du développement, et les profils de décharge sont également modifiés avec l'âge. Chez le jeune, les interneurons ont un profil de décharge majoritaire à PA unique, tandis que les interneurons présentent des profils de décharge de types tonique et phasique chez l'adulte. Ces résultats suggèrent que les interneurons de la couche Ili du Sp5C sont plus excitables chez le jeune par rapport à l'adulte. Même si des résultats similaires ont été observés chez la souris au niveau de la couche II de la CDS (Walsh et al., 2009; Tadros et al., 2012), le décours temporel de ces modifications est différent entre les neurones enregistrés au niveau de la moelle épinière et ceux enregistrés dans le Sp5C. En effet, au niveau spinal, la majorité des propriétés membranaires passives sont modifiées au stade embryonnaire jusqu'à une période critique que les auteurs définissent comme étant comprise entre P6 et P10 (Walsh et al., 2009). En revanche, dans notre étude, la maturation de ces mêmes propriétés membranaires se fait essentiellement entre la 3ème et la 4ème semaine postnatale. Cela suggère que les interneurons de la couche II lombaire deviennent fonctionnellement matures avant ceux du Sp5C.

D'autre part, contrairement à la CDS (Walsh et al., 2009; Tadros et al., 2012), nous avons observé des courant Ih dans le Sp5C, et ceci avant la deuxième semaine postnatale et dans des proportions beaucoup plus importantes. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'un protocole de voltage imposé à -90mV utilisé dans leurs études ne soit pas suffisant pour déclencher les courants Ih. Néanmoins, d'autres études développementales semblent corroborer l'existence de ces courants à des stades précoces (Schlichter et al., 1991). De plus, les courants Ih sont médiés par l'activation des canaux HCN qui, dans le ganglion spinal, sont présents à la naissance et deviennent fonctionnels progressivement au cours du développement (Hou et al., 2015). Dans les neurones sensoriels trigéminaux, les courants Ih sont également actifs dès la naissance, et leur rôle s'intensifie au cours du développement, notamment dans la régulation de l'excitabilité (Cho et al., 2011).

4- Evolution postnatale des propriétés morphologiques des interneurones de la couche IIi du Sp5C

Il est connu que des modifications morphologiques des neurones du SNC ont lieu en période néonatale au niveau supraspinal (van Pelt and Uylings, 2002; Romand et al., 2011; Ryan et al., 2014), comme au niveau spinal (Curfs et al., 1993; Ulfhake et al., 1988). Une étude réalisée au début des années 80 dans la couche II de la CDS révèle, grâce à la coloration de Golgi, l'existence de modifications au sein de l'arborisation dendritique, avec un élagage des branches compensé par une augmentation de la longueur au cours du développement (Bicknell and Beal, 1984). Aujourd'hui, de nouvelles méthodes de coloration et l'utilisation d'outils informatiques nous permettent d'aller encore plus loin dans l'analyse de l'arborisation neuronale. Nos résultats montrent que la morphologie des interneurones change drastiquement au cours du premier mois postnatal. En plus de l'augmentation de la taille du corps cellulaire, les interneurones subissent un élagage de leurs dendrites, que ce soit des dendrites simples ou ramifiées, les branches multi-ramifiées chez le jeune deviennent majoritairement dichotomiques chez l'adulte, et la longueur des dendrites restantes augmente. Ces résultats suggèrent que les dendrites de ces interneurones sont des structures extrêmement plastiques. Cette plasticité permettrait le raffinement des connexions synaptiques pour permettre aux neurones d'effectuer les contacts synaptiques adéquats pour leur fonctionnement mature.

De plus, la principale période de croissance du soma coïncide avec l'allongement des branches, à savoir entre la 3^e et la 4^e semaine postnatale. Le soma pourrait alors augmenter afin de produire des protéines et permettre l'assemblage des microtubules nécessaires à la croissance des neurites (Baas and Lin, 2011).

Les mécanismes sous-jacents de ces modifications des neurites sont actuellement inconnus dans la corne dorsale. Au niveau de la corne ventrale, il a été montré que l'activation des récepteurs NMDA favorisait la croissance des dendrites des motoneurones (Kalb, 1994). A ce jour, aucune étude n'a mis en évidence de résultat similaire au niveau des neurones sensoriels. En revanche, il a été montré au début des années 2000 que les récepteurs NMDA sont indispensables à la maturation postnatale des fibres sensorielles, notamment, en favorisant la rétraction des fibres A des couches superficielles vers les couches profondes (Beggs et al., 2002). Nous savons également que l'expression de certaines sous-unités du récepteur NMDA au niveau de la corne dorsale est modifiée au cours du développement. Avant la naissance, les récepteurs NMDA tout comme l'ARNm qui code pour la sous-unité NR2B, sont localisés dans l'ensemble des couches de la corne dorsale puis leur expression évolue progressivement pour

devenir limitée à la couche II chez l'adulte (Watanabe et al., 1994). La sous-unité NR3B n'est pas détectable à la naissance et apparaît seulement à P7 chez le rat pour augmenter jusqu'à P21 où un patron d'expression mature est atteint (Green and Gibb, 2001; pour revue Low and Wee, 2010). Les récepteurs NMDA pourraient donc jouer un rôle dans le développement postnatal de la morphologie des interneurons de la lamina III.

La croissance dendritique pourrait également être modulée par l'intervention de neurotransmetteurs comme la sérotonine, et notamment via l'activation des récepteurs 5-HT_{2A}. On sait en effet que ces récepteurs jouent un rôle dans la régulation du nombre de synapse au niveau de la moelle épinière embryonnaire de poulet (Niitsu et al., 1995). De plus, l'activation des récepteurs 5-HT_{2A} à la sérotonine favorise l'association des microtubules et donc la croissance des dendrites (Ohtani et al., 2014). Etant donné que les afférences sérotoninergiques contactent la CDS spinale progressivement au cours des premières semaines postnatales (Bregman, 1987), il est donc possible que la sérotonine, via l'activation des récepteurs 5-HT_{2A}, joue un rôle dans l'augmentation progressive de la taille des dendrites des neurones de la couche III.

Comme le soma des motoneurons lombaires innervant les muscles des membres postérieurs (Kerai et al., 1995; Westerga and Gramsbergen, 1992), le volume du soma des interneurons de la couche III augmente de manière très importante après la naissance. Cependant, cette augmentation se produit plus tardivement pour les interneurons (entre la 3^e et la 4^e semaine postnatale) que pour les motoneurons (au cours de la 2^e semaine postnatale). Cette différence pourrait s'expliquer par une maturation plus rapide du comportement locomoteur. En effet, à la fin de la 1^{ère} semaine postnatale, les animaux sont déjà capables de soulever leur tronc du sol et de réaliser une marche spontanée (Geisler et al., 1993; Jamon and Clarac, 1998). De plus, on considère que les animaux sont capables d'avoir une locomotion "adulte" à la fin de la 2^e semaine postnatale (Westerga and Gramsbergen, 1990). En revanche, la sensibilité à la douleur, elle, met plus de temps à apparaître (Fitzgerald, 2005; Howard et al., 2005) et la maturation des fibres sensitives de type Aβ se fait tardivement (Park et al., 1999; Beggs et al., 2002; Koch and Fitzgerald, 2013).

Conclusions et perspectives

Le jour de la naissance, les rongeurs comme les nouveau-nés humains, sont loin d'être matures. Le développement sensorimoteur se déroule au-delà de la troisième année de vie chez l'humain (Vasseur and Delion, 2013), et chez le rongeur, la maturation du système nerveux et des composants sensorimoteurs s'achèvent au-delà du sevrage, c'est-à-dire au-delà de 21 jours post-nataux. Par exemple, les rats ne vont ouvrir les yeux qu'à partir de P14 et ne goûteront à l'alimentation solide en plus du lait maternel qu'à partir de P18 (Thiels et al., 1990). La nociception est également différente chez le jeune par rapport aux adultes (Fitzgerald, 2005; Nandi and Fitzgerald, 2005). Par exemple, la douleur neuropathique persistante chez les adultes n'est pas présente chez les animaux juvéniles (Holmberg and Schouenborg, 1996; Fitzgerald, 2005). De même, lors d'une lésion nerveuse périphérique spinale, l'allodynie mécanique qui en résulte ne se développe pas si la lésion a été effectuée avant trois semaines postnatales (Howard et al., 2005).

D'un point de vue cellulaire et moléculaire, la période postnatale constitue donc un véritable chantier où les fibres sensorielles se développent, atteignent leur cibles définitives et deviennent fonctionnelles (Curfs et al., 1994; Fitzgerald and Koltzenburg, 1986; Park et al., 1999; pour revue Fitzgerald, 2005), et où vont apparaître ou disparaître les neurones et les protéines impliquées dans le tact et/ou la douleur (Charlton and Helke, 1986; Kar and Quirion, 1995; Nandi et al., 2004).

Au cours de ma thèse, nous avons montré que le Sp5C, lui aussi, est témoin de profondes modifications. Ces modifications passent par des changements électrophysiologiques et morphologiques des neurones de la couche III et par l'acquisition tardive du phénotype PKC γ . Dans une étude publiée récemment par notre équipe, nous avons montré chez l'adulte qu'il existe des différences de propriétés électrophysiologiques et morphologiques entre les interneurones exprimant la PKC γ et ceux n'exprimant pas cette kinase (Alba-Delgado et al. 2015). Et d'autre part, au moins deux sous-populations morphologiques d'interneurones PKC γ co-existent au stade adulte. Ainsi, de prochaines investigations sont envisagées afin de déterminer si ces différences morphologiques et électrophysiologiques observées chez l'adulte sont présentes dès les stades précoces et dans le cas contraire, à quel moment ces différences apparaissent.

Pour conclure, mon travail de thèse a levé le voile sur des modifications développementales au sein du Sp5C pouvant, à l'unisson, contribuer aux différences de sensibilité entre les jeunes et les adultes.

Annexes

Annexe n° 1

Etude de l'effet d'un traitement néonatal à la capsaïcine sur les fibres nociceptives peptidergiques et non-peptidergiques dans le Sp5C chez le rat

Un traitement systémique à la capsaïcine en période néonatale entraîne la dégénérescence des protoneurones de petit diamètre au sein des ganglions spinaux et trigéminaux, et donc la destruction des afférences primaires non-myélinisées (Buck and Burks, 1986; Fitzgerald, 1983; Holzer, 1991; Jancsó et al., 1977; Sugimoto et al., 1997). Des études ont montré que la destruction de ces fibres par la capsaïcine est une conséquence de dommages mitochondriaux (Szöke et al., 2002) ou encore d'un dysfonctionnement du facteur de croissance neural (NGF, *nerve growth factor*) (Otten et al., 1983). Une fois adultes, les animaux présentent une réduction de la réponse face à des stimuli nociceptifs. C'est d'ailleurs cette différence de réponse comportementale par rapport aux animaux naïfs qui permet de vérifier de manière non-invasive l'efficacité du traitement. En 1975, Szolcsanyi et collaborateurs ont développé le test de chémosensitivité de la cornée (*eye-wiping test*), qui sera ensuite utilisé en routine dans les études usant de la capsaïcine en période néonatale (Szolcsányi et al., 1975). L'instillation sur la cornée d'une solution contenant un agent irritant, le plus souvent de la capsaïcine à faible dose (0.01%), provoque des blépharospasmes (contractions involontaires de la paupière) chez les animaux naïfs qui en réponse à l'irritation se frottent frénétiquement l'œil avec les pattes antérieures. A l'inverse, les animaux dont les fibres nociceptives ont dégénéré à la naissance ne montrent pas de gêne suite à l'irritation (Marlier et al., 1990; Nakao et al., 2012). Toutefois, l'utilisation de ce test comportemental ne permet pas de savoir dans quelle mesure les fibres non-myélinisées sont altérées, ni si certaines fibres sont plus sensibles que d'autres au traitement.

Des études, pour la plupart réalisées au niveau spinal, ont ainsi cherché à étudier quantitativement l'effet d'un traitement néonatal à la capsaïcine sur la densité des différents types de fibres-C. Notamment, Hammond et Ruda ont montré en 1991 qu'un traitement néonatal à la capsaïcine entraîne la dégénérescence des fibres peptidergiques libérant la substance P et le CGRP. De manière intéressante, ils ont montré également que cette dégénérescence est transitoire puisque ces fibres réapparaissent au cours du développement, malgré le maintien d'une absence de réponse comportementale à la douleur (Hammond and Ruda, 1991).

Il est tout aussi intéressant de noter qu'il semble exister des différences de réponse à la capsaïcine selon la région rostrocaudale étudiée. En effet, Pohl et son équipe ont montré que la capsaïcine a plus d'effet sur les fibres CGRP projetant dans la corne dorsale lombaire qu'au niveau de la moelle cervicale (Pohl et al., 1990).

De plus, on sait que la capsaïcine agit sur le récepteur TRPV1 (*transient receptor potential vanilloïde 1*) porté par les fibres sensorielles de petit diamètre, notamment par les fibres liant l'IB4 et les fibres P2X3 (Nakagawa and Hiura, 2006). Or, il existe une différence d'expression du TRPV1 entre la CDS et le Sp5C : la CDS possèdent une plus grande quantité de fibres exprimant le TRPV1 en LIII alors que le Sp5C a une densité plus importante de fibres exprimant le TRPV1 au niveau des couches superficielles I et IIe (Bae et al., 2004). Ceci suggère donc qu'il existe une différence d'effet de la capsaïcine entre ces deux structures.

A ce jour, il existe peu de données concernant l'effet d'un traitement néonatal à la capsaïcine sur les fibres nociceptives projetant au niveau du Sp5C. Megumi Aita et ses collaborateurs ont montré que la capsaïcine entraîne la délétion des fibres peptidergiques libérant la substance P, mais pas de celles libérant le CGRP (Aita et al., 2005b, 2008) et ils ne discutent pas de l'effet de la capsaïcine sur les fibres non-peptidergiques. De plus, leurs études ont été réalisées chez la souris, or on sait qu'il existe des différences anatomiques quant à la projection des fibres nociceptives entre le rat et la souris (Neumann et al., 2008).

Dans notre étude, nous avons donc étudié l'effet d'un traitement néonatal à la capsaïcine sur les fibres non-myélinisées peptidergiques (CGRP) et non-peptidergiques (IB4) au sein du Sp5C chez le rat.

Matériel et méthodes

Cette étude a été faite en parallèle de l'étude décrite dans le chapitre II. Brièvement, des rats ont été injectés avec de la capsaïcine (50mg/kg) 48h après la naissance (à P2). Puis à P21, les animaux ont été euthanasiés par une perfusion transcardiaque au paraformaldéhyde et le tronc cérébral a été prélevé.

Des tranches de 30 μm d'épaisseur ont été réalisées au cryostat puis montées sur des lames gélatinées. Le lendemain, les coupes ont été rincées 4 fois pendant 5 minutes dans une solution de Tris-Buffered Saline (TBS 1X ; pH = 7.4) et bloquées pendant 1h à température ambiante dans une solution de TBS contenant 5% de Normal Goat Serum (NGS), 0.3% de Triton X-100 et 0.25 % d'albumine de sérum bovin (BSA). Après un nouveau rinçage au TBS, les coupes ont été incubées pendant 72 h à 4°C dans une solution de TBS-BSA-Triton avec 5 % de NGS contenant les anticorps primaires anti-CGRP et anti-PKC γ (nous permettant ainsi de délimiter les couches) (**Table 4**).

A la fin du temps d'incubation, les coupes ont été rincées 3 fois pendant 5 minutes dans du TBS, puis incubées pendant deux heures soit dans une solution d'anticorps secondaires contenant l'anticorps secondaire anti-Guinea Pig couplé à Cy3, et l'anticorps secondaire anti-Mouse couplé à Alexa488, le tout dans du TBS-BSA-Triton ; soit dans une solution contenant l'anticorps secondaire anti-Guinea Pig couplé à Cy3 et l'isolectine GS-IB4 conjuguée à un fluorochrome Alexa 488 (**Table 4**). Cette glycoprotéine isolée des graines d'une légumineuse tropicale africaine (*Griffonia simplicifolia*) a la particularité de reconnaître les résidus α -D galactose à la surface des fibres-C ([Ambalavanar and Morris, 1993](#)). Les coupes ont ensuite été rincées 4 fois dans du TBS (4x5 minutes), puis déshydratées par des bains successifs de 2 minutes dans l'eau distillée, l'éthanol 100, et le Xylène, avant d'être recouvertes de DPX et montées sous lamelles.

Acquisition des images

Des images ont d'abord été prises sous les objectifs x5, x10, et x20 à l'aide du microscope Zeiss Axioplan 2. Puis pour plus de précision, un microscope confocal Zeiss (LSM510) nous a permis de réaliser un scan à x40 (avec immersion dans l'huile) sur toute l'épaisseur de la coupe (30 μm), l'épaisseur de chaque section étant inférieure à 1 μm (z-step = 0.38 μm). Pour chaque acquisition, nous avons utilisé les mêmes paramètres incluant le gain et le seuil, afin d'obtenir une conformité dans l'échelle de gris de chaque image. Toutes les images ont ensuite été enregistrées au format 8-bit.

Analyse des spectres

L'analyse a été réalisée sur une image issue du tiers moyen de chaque scan. Les fibres marquées par un fluorochrome peuvent être identifiées comme des structures curvilinéaires avec des variations locales (par exemple des boursouflures). Ces variations peuvent être détectées par l'utilisation de la matrice Hessian (Sato et al., 1998). Ainsi, un filtrage basé sur la matrice Hessian permet de nettoyer l'image en faisant une extraction des éléments ne correspondant pas à une structure curvilinéaire, de s'affranchir des effets de non-uniformité de contraste et de supprimer les artefacts. Nous avons donc utilisé ce filtre sur chacune de nos images à l'aide du plugin FeatureJ (Feature Hessian) de Fiji. Puis une analyse du niveau de gris nous a permis de déterminer l'organisation et la densité des fibres au sein du Sp5C. Pour cela, cinq droites parallèles de 200 μm de long et espacées de 25 μm les une des autres (largeur totale = 100 μm) ont été dessinées perpendiculairement à la surface externe de la coupe, à la limite entre la substance blanche et la LI. L'analyse du niveau de gris le long de chacune des droites a été réalisée grâce au plugin Plot Line de Fiji, puis les valeurs obtenues pour chacune des cinq droites ont été moyennées. Les valeurs ont été représentées sous forme de graphiques dessinés sous Prism.

Table 4-Anticorps utilisés

<i>Anticorps primaires</i>	<i>Anti-PKCγ</i>	<i>Anti-CGRP</i>
Clonalité	Polyclonal	Monoclonal
Espèce	Cochon d'inde (Guinea Pig)	Souris (Mouse)
Concentration	1:500	1:200
Fournisseur	Frontier Institute (Hokkaido, Japan)	Abcam (Royaume-Uni)
<i>Anticorps secondaires</i>	<i>Cy3</i>	<i>Alexa 488</i>
Antigène	Anti-guinea pig couplé à cy3	Anti-mouse couplé à cy2
Espèce	Chèvre (Goat)	Chèvre (Goat)
Concentration	1:200	1:200
Fournisseur	Jackson ImmunoResearch	Jackson ImmunoResearch
Excitation /Emission	~550/570	~495/519
<i>Isolectine B4</i>		
Espèce	<i>Griffonia Simplicifolia</i>	
Concentration	1:200	
Fournisseur	ThermoFisher	
	Couplé à Alexa 488	

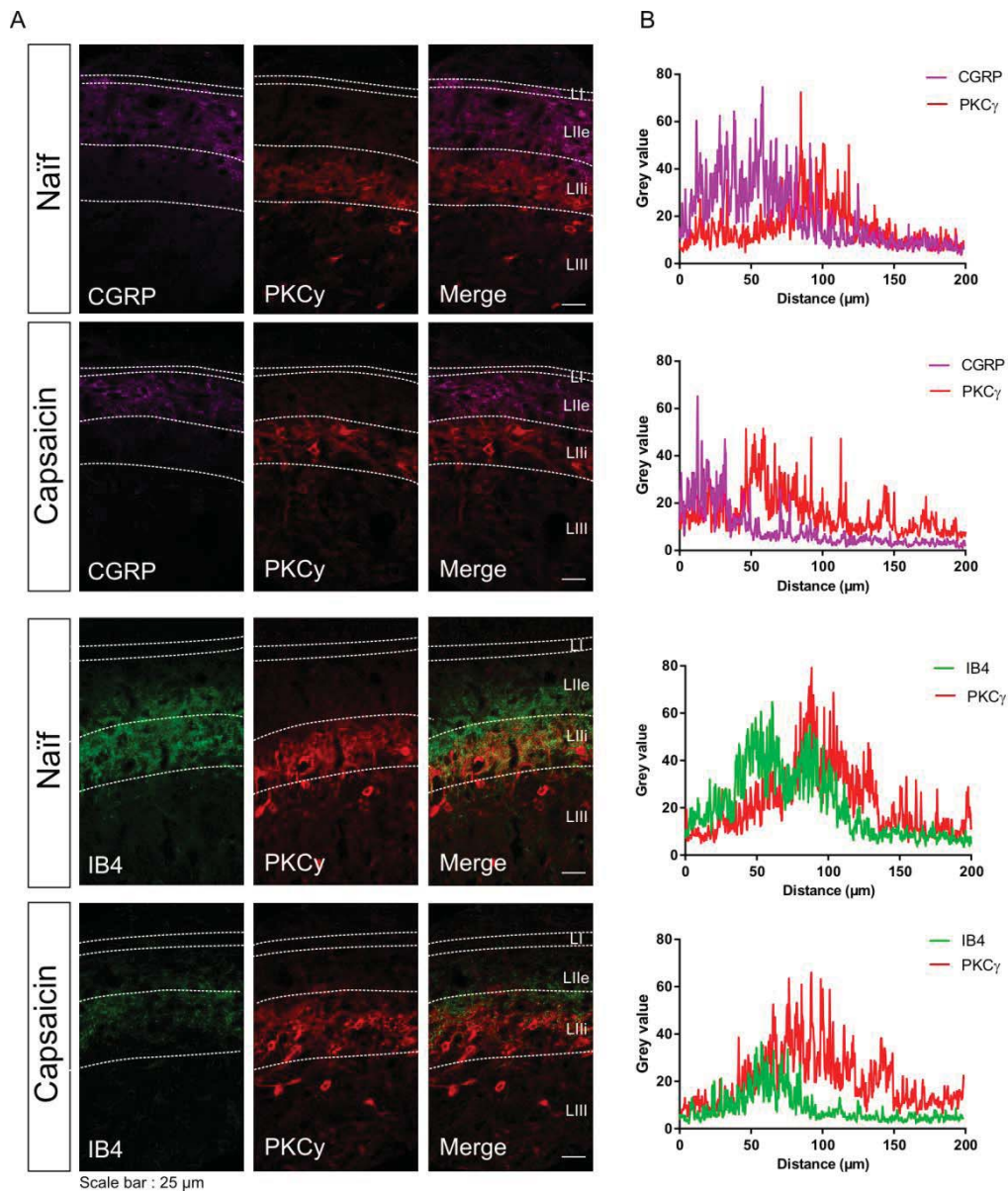


Figure 1 : L'injection néonatale de capsaïcine entraîne une dégénérescence des fibres CGRP-ir et IB4-ir. A, Photographies représentatives de l'organisation des fibres CGRP-ir et IB4-ir par rapport aux interneurons PKC γ , chez un animal naïf et un animal ayant reçu une injection de capsaïcine à P2. B, Plot-profil correspondant aux microphotographies en A.

Résultats

Les fibres CGRP-ir et IB4-ir projettent différemment dans le Sp5C du rat

Les immunomarquages des fibres-C péptidergiques immunoréactives pour le CGRP (CGRP-ir) et non-peptidergiques liant l'IB4 (IB4-ir) montrent qu'elles ont un patron de projection différent au sein du Sp5C. En effet, les fibres CGRP-ir projettent dorsalement par rapport aux interneurons PKCy c'est-à-dire en LI et LIIe, tandis que les fibres IB4-ir projettent dans la partie ventrale de la LIIe et dans la LIII (Fig. 1A, n=3).

Le traitement néonatal à la capsaïcine affecte les deux types de fibres

L'observation des immunomarquages nous a permis de constater que la distribution des fibres CGRP-ir et IB4-ir a été affectée par un traitement néonatal à la capsaïcine. En effet, la densité des fibres CGRP-ir est diminuée chez les animaux injectés à la capsaïcine à P2 par rapport aux animaux naïfs. De plus, alors que les fibres forment des amas denses et compacts en condition normale, elles semblent être plus lâches chez les animaux injectés à la capsaïcine. Concernant les fibres IB4-ir, la diminution de la densité des fibres est évidente chez les animaux injectés à la capsaïcine, notamment dans la partie ventrale de la LIII (Fig. 1A, n=3).

Ces observations sont confirmées par l'analyse des plot-profil. En effet, l'intensité du niveau de gris et la grande quantité de pics sont révélateurs d'une forte densité de fibres chez les animaux naïfs, que ce soit pour les fibres CGRP-ir que pour les fibres IB4-ir. En revanche, les plot-profil des fibres CGRP-ir et IB4-ir chez les animaux injectés à la capsaïcine sont nettement différents et révélateurs d'une désorganisation des fibres CGRP-ir et d'une diminution drastique de la densité de fibres IB4-ir (Fig. 1B). Que ce soit pour les fibres CGRP-ir ou IB4-ir, les immunomarquages et l'analyse des plot-profil indiquent qu'à P21, la déletion des fibres nociceptives n'est pas complète.

Discussion

Dans cette étude, nous avons vu qu'en condition normale les fibres nociceptives CGRP-ir et IB4-ir projettent différemment au sein du Sp5C chez le rat. Conformément à d'autres études, les fibres CGRP-ir projettent au niveau des couches les plus superficielles I et IIe, dorsalement à la bande des interneurons PKC γ localisés majoritairement en LIIIi. Les afférences IB4-ir quant à elles projettent au niveau ventral de la LIIe et dans la LIIIi (Aita et al., 2005b; Ambalavanar and Morris, 1992; Oyamaguchi et al., 2016). De plus, nos résultats montrent qu'un traitement néonatal à la capsaïcine entraîne une dégénérescence des fibres CGRP-ir et IB4-ir. A l'instar d'autres études, nos résultats montrent que l'administration néonatale de 50mg/kg de capsaïcine ne suffit pas pour entraîner une délétion complète des fibres (Buck and Burks, 1986; Holzer, 1991). Notamment, une étude réalisée au niveau spinal a montré que l'injection néonatale de capsaïcine réduit la densité des fibres CGRP-ir observée à 10 jours postnataux au niveau de la CDS mais aussi autour du canal central. Or, cette diminution est transitoire car à 6 semaines, les auteurs observent une augmentation du marquage (Hammond and Ruda, 1991). Au niveau du Sp5C, Aita et ses collaborateurs voient une dégénérescence transitoire des fibres peptidergiques libérant la substance P puisqu'elles repoussent dès la 2^e semaine de vie pour atteindre à 8 semaines une densité similaire à celle des animaux naïfs (Aita et al. 2005b). Contrairement à notre étude, Aita et ses collaborateurs n'ont pas observé de diminution des fibres CGRP-ir chez la souris (Aita et al., 2008). Pourtant, il a été montré que la capsaïcine entraîne une dégénérescence des fibres CGRP-ir de la muqueuse buccale, et dans cette même étude, les auteurs ont remarqué que la capsaïcine entraînait une délétion des neurones de petits diamètre dans le ganglion trigéminal (Mori et al., 1990). Cette différence avec les travaux de Aita et al. (2008) pourrait s'expliquer par des différences inter-espèces. En effet, il a été montré que des différences anatomiques existent entre les rats et les souris, notamment au niveau de la LII chez la souris. En effet, alors que les fibres IB4 projettent en LIIe et LIIIi où elles se superposent avec les interneurons PKC γ de la CDS de rat (Bailey and Ribeiro-da-Silva, 2006; Lorenzo et al., 2008), les fibres IB4-ir sont cantonnées dans la LII chez la souris mais ne se superposent pas aux interneurons PKC γ . Cette ségrégation des fibres IB4-ir indique que chez la souris, la LIIIi peut-être divisée en LIIIi ventrale contenant les interneurons PKC γ et en LIIIi dorsale (Neumann et al., 2008).

Nos résultats montrent également que l'effet de la capsaïcine sur les fibres CGRP-ir est moindre que celui observé sur les fibres IB4-ir. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les fibres CGRP-ir

expriment moins le récepteur TRPV1 à la capsaïcine que les fibres IB4-ir (Nakagawa et Hiura, 2006).

Ainsi, nos résultats montrent que le pattern de distribution des fibres CGRP-ir et IB4-ir est différent au sein du Sp5C du rat naïf. De plus ces fibres sont affectées par un traitement néonatal à la capsaïcine. A ce jour, il n'existe que peu d'études s'intéressant à l'effet de la capsaïcine sur les fibres projetant au sein du Sp5C du rat, la plupart des études étant réalisées au niveau de la CDS. Pourtant il existe des différences d'effets de la capsaïcine entre les niveaux rostrocaudaux (Pohl et al., 1990). Et une étude a montré qu'une mutation de la reelin, une protéine impliquée dans le développement du système nerveux central, affecte les fibres CGRP et IB4 au niveau cervical mais pas au niveau lombaire (Villeda et al., 2006). Quoi qu'il en soit, aucune étude ne s'est encore intéressée à comparer l'effet d'un traitement néonatal à la capsaïcine sur les fibres non-myélinisées au niveau spinal et trigéminal, et ceci sur le même animal.

Cette étude est en cours à l'heure où cette thèse est écrite et fera l'objet d'une prochaine publication.

Annexe n°2

Modulation sérotoninergique des interneurones PKC γ au cours du développement, implication des récepteurs 5-HT_{2A}

La sérotonine est connue depuis longtemps pour jouer un rôle important dans le contrôle de la douleur (Bardin, 2011). Chez l'adulte, de nombreuses fibres sérotoninergiques sont retrouvées au niveau de la CDS. Les effets de l'application de 5-HT ou d'agonistes 5-HT_{2A} sur les neurones des couches superficielles ont conduit à des résultats hétérogènes : certains neurones n'ont pas été sensibles, d'autres avaient des modifications des propriétés membranaires intrinsèques et présentaient parfois des courants sortants ou bien des courants entrants (Abe et al., 2009; Lu and Perl, 2007; Yasaka et al., 2010). Au niveau trigéminal, l'activation des récepteurs 5-HT_{2A} a permis d'induire une dépolarisation dans certains neurones de la substance gélatineuse (Grudt et al., 1995).

Comme mentionné dans le chapitre I et la discussion de cette thèse, de nombreuses similarités existent entre les récepteurs 5-HT_{2A} et la PKC γ . En plus de leur localisation (Doly et al., 2004; Fay and Kubin, 2000), leur voie de transduction (Codazzi et al., 2006; Hannon and Hoyer, 2008) et leur rôle dans la douleur (Kayser et al., 2007; Malmberg et al., 1997b; Nakajima et al., 2011; Ohsawa et al., 2001; Okamoto et al., 2005; Thibault et al., 2008; Van Steenwinckel et al., 2008), le développement des interneurones PKC γ dans la couche III et des fibres sérotoninergiques semble se faire au même moment, c'est-à-dire dans les 15 premiers jours après la naissance (Bregman, 1987; Mermet-Joret et al., 2016).

Ainsi, l'objectif de ce projet consiste à déterminer si la sérotonine est capable de moduler les propriétés électrophysiologiques et morphologiques des interneurones PKC γ au cours du développement et si cette modulation éventuelle passe par l'activation des récepteurs 5-HT_{2A}.

Pour cela, nous réalisons des enregistrements en patch-clamp des interneurones PKC γ de la couche III du Sp5C pendant le 1^{er} mois postnatal. Les résultats présentés sont des résultats préliminaires obtenus sur 8 interneurones PKC γ enregistrés aux stades précoces (P6-11) et testés avec la 5-HT.

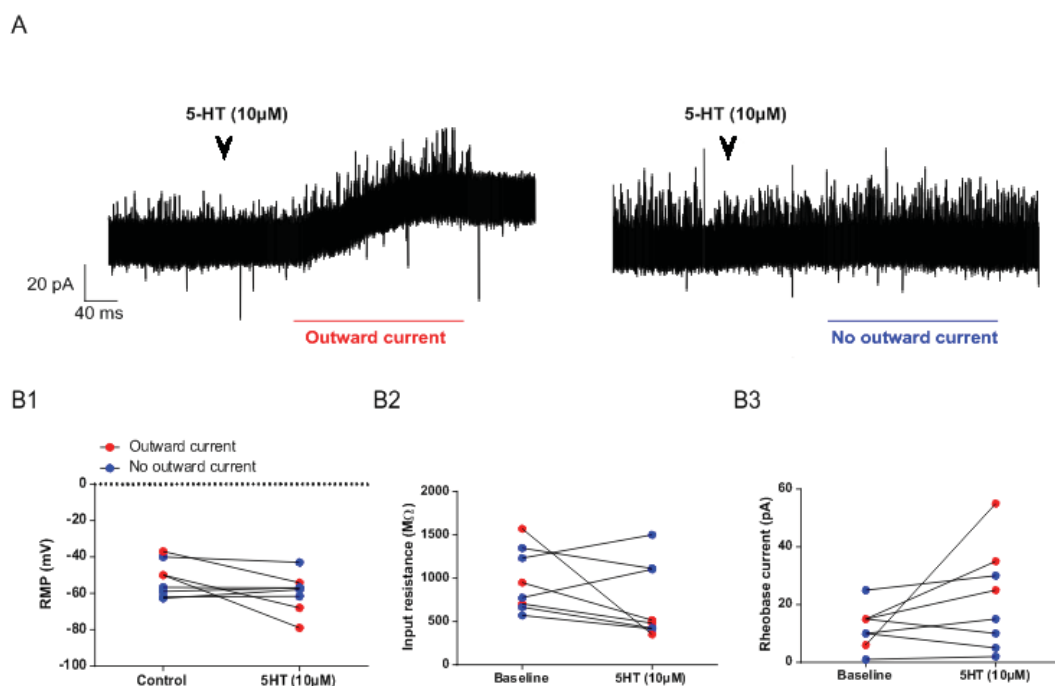


Figure 1. Les propriétés membranaires de certains interneurons PKC γ du Sp5C sont modifiées par l'application de 5-HT 10 μ M. **A**, Tracés représentatifs de la réponse des interneurons PKC γ suite à l'application de la 5-HT (en mode voltage-clamp). La 5-HT induit un courant sortant (outward current, tracé de gauche) dans certains interneurons, et dans d'autres n'induit pas de réponse (no outward current, tracé de droite). **B**, Effet de l'application de 5-HT 10 μ M sur le potentiel de repos (B1), la résistance membranaire (B2) et la rhéobase (B3). Chaque point représente un interneurone avant et après l'application de sérotonine dans le bain.

TABLE 1 *Morphological properties of PKC γ interneurons with or without the application of 5-HT 10 μ M*

	n	Length of branches (μ m)	Number of branches	Number of nodes	Number of terpoints	Field area (μ m ³)	Fractal dimension	Volume of soma (μ m ³)
		Total	Total					
Control	5	13.9 $\pm$ 2.9	15.6 $\pm$ 2.8	25.6 $\pm$ 6.49	41.4 $\pm$ 7.9	15.48 $\pm$ 6.6	1.16 $\pm$ 0.02	151 $\pm$ 20.2
5-HT 10 μ m	8	11.6 $\pm$ 1.1	11.6 $\pm$ 1.1	27.7 $\pm$ 5.5	51.4 $\pm$ 8.3	10.06 $\pm$ 1.8	1.17 $\pm$ 0.01	277.4 $\pm$ 44.07

Data represent the mean $\pm$ SEM.

Résultats préliminaires

Effet de la 5-HT sur les propriétés électrophysiologiques des interneurons PKC γ aux stades précoces

Dans 3 interneurons parmi les 8 enregistrés, l'application de 5-HT (10 μ M) a entraîné un courant sortant (**Fig. 1A**) d'une amplitude moyenne de 29 pA. Ce courant sortant a induit une hyperpolarisation du potentiel de repos (**Fig. 1B1**), avec une moyenne de diminution de 46.8 %. Les 5 autres interneurons n'ont pas répondu à la sérotonine (**Fig. 1A**). De plus, la sérotonine a induit une diminution de la résistance membranaire (-58 %) (**Fig. 1B2**) et une augmentation de la rhéobase (+220 %) (**Fig. 1B3**) sur la majorité des interneurons (6/8). De manière générale, les propriétés des potentiels d'action (PA) n'ont pas été modifiées par l'application de 5-HT. En effet, l'amplitude et la durée moyennes des PA des interneurons enregistrés ne sont pas significativement différentes avant et après l'application de 5-HT (amplitude : 59.4 ± 6.0 mV vs 54.7 ± 5.6 mV respectivement ; durée : 3.9 ± 0.4 ms vs 4.1 ± 0.6 ms respectivement). Parmi les interneurons enregistrés, 3 avaient un profil de décharge à PA unique, 2 étaient de type tonique et 2 autres de type phasique. Après l'application de 5-HT, certains interneurons ont changé leur profil de décharge. Un interneurone à PA unique est devenu tonique et un autre est devenu phasique. Un troisième interneurone ayant initialement un profil de décharge de type phasique est devenu tonique.

Effet de la 5-HT sur les propriétés morphologiques des interneurons PKC γ aux stades précoces

L'application de 10 μ M de 5-HT pendant toute la durée des enregistrements, n'a pas entraîné de modification notable de la morphologie des interneurons PKC γ (**Table 1**). En effet, si on compare par rapport aux interneurons contrôles, la longueur et le nombre de branches, le nombre de nodes et le nombre de point terminaux sont sensiblement identiques aux interneurons ayant été baignés dans la 5-HT. De plus, l'organisation dans l'espace des interneurons n'est pas modifiée puisque la densité des branches et la dimension fractale sont sensiblement identiques entre les interneurons PKC γ avec ou sans traitement à la 5-HT. Seul le volume du soma tend à augmenter après application de 5-HT.

Conclusions et perspectives

Ces résultats préliminaires suggèrent que dès leur apparition en couche III, certains interneurons PKC γ du Sp5C sont susceptibles d'être modulés physiologiquement par la 5-HT. En revanche, la morphologie de ces interneurons ne semble pas être affectée par la 5-HT. Ces résultats contrastent avec des données préliminaires que nous avons obtenues à des stades plus tardifs. En effet, l'application de 5-HT (n=5) sur des tranches de Sp5C adulte entraîne une modification de la morphologie des interneurons PKC γ : une diminution significative du nombre de branches, en particulier les branches secondaires, tertiaires et quaternaires a été observée. De plus, l'aire totale des interneurons, ainsi que la dimension fractale diminuent après l'application de 5-HT. Si ces résultats se confirment, cela pourrait signifier que la sérotonine est capable de modifier l'arborisation neuritique des interneurons chez l'adulte mais pas chez le jeune.

Comme nous l'avons mentionné dans la discussion, la croissance dendritique pourrait être modulée par l'intervention de neurotransmetteurs comme la sérotonine via l'activation des récepteurs 5-HT_{2A}. Une hypothèse serait que la sérotonine ne soit pas capable de modifier l'arborisation neuritique des interneurons chez le jeune, car l'expression des récepteurs 5-HT_{2A} n'est pas encore mature.

Ainsi, la suite de ce projet va consister i) à confirmer les résultats obtenus lors de l'application de 5-HT et ii) à identifier le moment d'apparition des récepteurs 5-HT_{2A} dans le Sp5C et son évolution au cours du développement et iii) à déterminer si l'activation de ces récepteurs module la physiologie et la morphologie des interneurons PKC γ de façon différente chez le jeune et chez l'adulte.

Références bibliographiques

A

- Abdallah, K., Monconduit, L., Artola, A., Luccarini, P., and Dallel, R. (2015). GABAergic inhibition or dopamine denervation of the A11 hypothalamic nucleus induces trigeminal analgesia. *Pain* 156, 644–655.
- Abe, K., Kato, G., Katafuchi, T., Tamae, A., Furue, H., and Yoshimura, M. (2009). Responses to 5-HT in morphologically identified neurons in the rat substantia gelatinosa in vitro. *Neuroscience* 159, 316–324.
- Adle-Biassette, H., Olivier, P., Verney, C., Fontaine, R.H., Evrard, P., Hénin, D., Massias, L., Gressens, P., and Baud, O. (2007). Cortical consequences of in vivo blockade of monocarboxylate transport during brain development in mice. *Pediatr. Res.* 61, 54–60.
- Aita, M., Seo, K., Fujiwara, N., Takagi, R., and Maeda, T. (2005a). Postnatal changes in the spatial distributions of substance P and neurokinin-1 receptor in the trigeminal subnucleus caudalis of mice. *Dev. Brain Res.* 155, 33–41.
- Aita, M., Maeda, T., Takagi, R., and Seo, K. (2005b). Postnatal development of substance P-immunoreaction in the trigeminal caudalis of neonatally capsaicin-treated mice. *Arch. Histol. Cytol.* 68, 311–320.
- Aita, M., Maeda, T., and Seo, K. (2008). The effect of neonatal capsaicin treatment on the CGRP-immunoreaction in the trigeminal subnucleus caudalis of mice. *Biomed. Res. Tokyo Jpn.* 29, 33–42.
- Akinori, M. (1998). Subspecies of protein kinase C in the rat spinal cord. *Prog. Neurobiol.* 54, 499–530.
- Alba-Delgado, C., El Khoueiry, C., Peirs, C., Dallel, R., Artola, A., and Antri, M. (2015). Subpopulations of PKC γ interneurons within the medullary dorsal horn revealed by electrophysiologic and morphologic approach. *Pain* 156, 1714–1728.
- Altman, J., and Bayer, S.A. (1980a). Development of the brain stem in the rat. I. Thymidine-radiographic study of the time of origin of neurons of the lower medulla. *J. Comp. Neurol.* 194, 1–35.
- Altman, J., and Bayer, S.A. (1980b). Development of the brain stem in the rat. II. Thymidine-radiographic study of the time of origin of neurons of the upper medulla, excluding the vestibular and auditory nuclei. *J. Comp. Neurol.* 194, 37–56.
- Ambalavanar, R., and Morris, R. (1992). The distribution of binding by isolectin I-B4 from *Griffonia simplicifolia* in the trigeminal ganglion and brainstem trigeminal nuclei in the rat. *Neuroscience* 47, 421–429.
- Ambalavanar, R., and Morris, R. (1993). An ultrastructural study of the binding of an alpha-D-galactose specific lectin from *Griffonia simplicifolia* to trigeminal ganglion neurons and the trigeminal nucleus caudalis in the rat. *Neuroscience* 52, 699–709.
- Anand, P., and Birch, R. (2002). Restoration of sensory function and lack of long-term chronic pain syndromes after brachial plexus injury in human neonates. *Brain J. Neurol.* 125, 113–122.
- Anderson, R.M., Stottmann, R.W., Choi, M., and Klingensmith, J. (2006). Endogenous bone morphogenetic protein antagonists regulate mammalian neural crest generation and survival. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 235, 2507–2520.

Andrews, K., and Fitzgerald, M. (1994). The cutaneous withdrawal reflex in human neonates: sensitization, receptive fields, and the effects of contralateral stimulation. *Pain* 56, 95–101.

Atherton, D.D., Taherzadeh, O., Elliot, D., and Anand, P. (2008). Age-dependent development of chronic neuropathic pain, allodynia and sensory recovery after upper limb nerve injury in children. *J. Hand Surg. Eur. Vol.* 33, 186–191.

Averill, S., McMahon, S.B., Clary, D.O., Reichardt, L.F., and Priestley, J.V. (1995). Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons. *Eur. J. Neurosci.* 7, 1484–1494.

B

Baas, P.W., and Lin, S. (2011). Hooks and comets: The story of microtubule polarity orientation in the neuron. *Dev. Neurobiol.* 71, 403–418.

Baccei, M.L., and Fitzgerald, M. (2004). Development of GABAergic and glycinergic transmission in the neonatal rat dorsal horn. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 4749–4757.

Baccei, M.L., and Fitzgerald, M. (2005). Intrinsic firing properties of developing rat superficial dorsal horn neurons. *Neuroreport* 16, 1325–1328.

Bae, Y.C., Oh, J.M., Hwang, S.J., Shigenaga, Y., and Valtschanoff, J.G. (2004). Expression of vanilloid receptor TRPV1 in the rat trigeminal sensory nuclei. *J. Comp. Neurol.* 478, 62–71.

Bailey, A.L., and Ribeiro-da-Silva, A. (2006). Transient loss of terminals from non-peptidergic nociceptive fibers in the substantia gelatinosa of spinal cord following chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Neuroscience* 138, 675–690.

Ballion, B., Branchereau, P., Chapron, J., and Viala, D. (2002). Ontogeny of descending serotonergic innervation and evidence for intraspinal 5-HT neurons in the mouse spinal cord. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 137, 81–88.

Bardin, L. (2011). The complex role of serotonin and 5-HT receptors in chronic pain. *Behav. Pharmacol.* 22, 390–404.

Beggs, S., Torsney, C., Drew, L.J., and Fitzgerald, M. (2002). The postnatal reorganization of primary afferent input and dorsal horn cell receptive fields in the rat spinal cord is an activity-dependent process. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1249–1258.

Bender, R.A., and Baram, T.Z. (2008). Hyperpolarization activated cyclic-nucleotide gated (HCN) channels in developing neuronal networks. *Prog. Neurobiol.* 86, 129–140.

Bender, M.T., Pradilla, G., James, C., Raza, S., Lim, M., and Carson, B.S. (2011). Surgical treatment of pediatric trigeminal neuralgia: case series and review of the literature. *Childs Nerv. Syst. ChNS Off. J. Int. Soc. Pediatr. Neurosurg.* 27, 2123–2129.

Bender, R.A., Brewster, A., Santoro, B., Ludwig, A., Hofmann, F., Biel, M., and Baram, T.Z. (2001). Differential and age-dependent expression of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channel isoforms 1-4 suggests evolving roles in the developing rat hippocampus. *Neuroscience* 106, 689–698.

Bennett, M.I., Smith, B.H., Torrance, N., and Lee, A.J. (2006). Can pain can be more or less neuropathic? Comparison of symptom assessment tools with ratings of certainty by clinicians. *Pain* 122, 289–294.

- Berki, A.C., O'Donovan, M.J., and Antal, M. (1995). Developmental expression of glycine immunoreactivity and its colocalization with GABA in the embryonic chick lumbosacral spinal cord. *J. Comp. Neurol.* *362*, 583–596.
- Bicknell, H.R., and Beal, J.A. (1984). Axonal and dendritic development of substantia gelatinosa neurons in the lumbosacral spinal cord of the rat. *J. Comp. Neurol.* *226*, 508–522.
- Bowker, R.M., Westlund, K.N., Sullivan, M.C., and Coulter, J.D. (1982). Organization of descending serotonergic projections to the spinal cord. *Prog. Brain Res.* *57*, 239–265.
- Braz, J., Solorzano, C., Wang, X., and Basbaum, A.I. (2014). Transmitting pain and itch messages: a contemporary view of the spinal cord circuits that generate gate control. *Neuron* *82*, 522–536.
- Bregman, B.S. (1987). Development of serotonin immunoreactivity in the rat spinal cord and its plasticity after neonatal spinal cord lesions. *Brain Res.* *431*, 245–263.
- Bröhl, D., Strehle, M., Wende, H., Hori, K., Bormuth, I., Nave, K.-A., Müller, T., and Birchmeier, C. (2008). A transcriptional network coordinately determines transmitter and peptidergic fate in the dorsal spinal cord. *Dev. Biol.* *322*, 381–393.
- Buck, S.H., and Burks, T.F. (1986). The neuropharmacology of capsaicin: review of some recent observations. *Pharmacol. Rev.* *38*, 179–226.

C

- Cadden, S.W., and Orchardson, R. (2001). The neural mechanisms of oral and facial pain. *Dent. Update* *28*, 359–367.
- Cameron, W.E., and Núñez-Abades, P.A. (2000). Physiological changes accompanying anatomical remodeling of mammalian motoneurons during postnatal development. *Brain Res. Bull.* *53*, 523–527.
- Castro-Lopes, J.M., Tavares, I., and Coimbra, A. (1993). GABA decreases in the spinal cord dorsal horn after peripheral neurectomy. *Brain Res.* *620*, 287–291.
- 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.
- Charlton, C.G., and Helke, C.J. (1986). Ontogeny of substance P receptors in rat spinal cord: quantitative changes in receptor number and differential expression in specific loci. *Brain Res.* *394*, 81–91.
- Chen, C.-L., Broom, D.C., Liu, Y., de Nooij, J.C., Li, Z., Cen, C., Samad, O.A., Jessell, T.M., Woolf, C.J., and Ma, Q. (2006). Runx1 determines nociceptive sensory neuron phenotype and is required for thermal and neuropathic pain. *Neuron* *49*, 365–377.
- Chen, Z.-F., Rebelo, S., White, F., Malmberg, A.B., Baba, H., Lima, D., Woolf, C.J., Basbaum, A.I., and Anderson, D.J. (2001). The Paired Homeodomain Protein DRG11 Is Required for the Projection of Cutaneous Sensory Afferent Fibers to the Dorsal Spinal Cord. *Neuron* *31*, 59–73.
- Cheng, H.T., Suzuki, M., Hegarty, D.M., Xu, Q., Weyerbacher, A.R., South, S.M., Ohata, M., and Inturrisi, C.E. (2008). Inflammatory pain-induced signaling events following a conditional deletion of the N-methyl-D-aspartate receptor in spinal cord dorsal horn. *Neuroscience* *155*, 948–958.

- Cheng, L., Arata, A., Mizuguchi, R., Qian, Y., Karunaratne, A., Gray, P.A., Arata, S., Shirasawa, S., Bouchard, M., Luo, P., et al. (2004). *Tlx3* and *Tlx1* are post-mitotic selector genes determining glutamatergic over GABAergic cell fates. *Nat. Neurosci.* 7, 510–517.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H., and Beachy, P.A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 407–413.
- Cho, H.-J., Furness, J.B., and Jennings, E.A. (2011). Postnatal maturation of the hyperpolarization-activated cation current, *I*(h), in trigeminal sensory neurons. *J. Neurophysiol.* 106, 2045–2056.
- Codazzi, F., Di Cesare, A., Chiulli, N., Albanese, A., Meyer, T., Zacchetti, D., and Grohovaz, F. (2006). Synergistic control of protein kinase Cgamma activity by ionotropic and metabotropic glutamate receptor inputs in hippocampal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 3404–3411.
- Coggeshall, R.E., Pover, C.M., and Fitzgerald, M. (1994). Dorsal root ganglion cell death and surviving cell numbers in relation to the development of sensory innervation in the rat hindlimb. *Dev. Brain Res.* 82, 193–212.
- Coimbra, A., Ribeiro-Da-Silva, A., and Pignatelli, D. (1986). Rexed's laminae and the acid phosphatase (FRAP)-band in the superficial dorsal horn of the neonatal rat spinal cord. *Neurosci. Lett.* 71, 131–136.
- Cordero-Erausquin, M., Inquimbert, P., Schlichter, R., and Hugel, S. (2016). Neuronal networks and nociceptive processing in the dorsal horn of the spinal cord. *Neuroscience*.
- Cordero-Erausquin, M., Coull, J.A.M., Boudreau, D., Rolland, M., and De Koninck, Y. (2005). Differential maturation of GABA action and anion reversal potential in spinal lamina I neurons: impact of chloride extrusion capacity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 9613–9623.
- Correia, A.C., Costa, M., Moraes, F., Bom, J., Nóvoa, A., and Mallo, M. (2007). *Bmp2* is required for migration but not for induction of neural crest cells in the mouse. *Dev. Dyn.* 236, 2493–2501.
- Costigan, M., Scholz, J., and Woolf, C.J. (2009). Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 1–32.
- Cui, M., Gosu, V., Basith, S., Hong, S., and Choi, S. (2016). Chapter Three - Polymodal Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Nociceptor: Structure, Modulators, and Therapeutic Applications. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, R. Donev, ed. (Academic Press), pp. 81–125.
- Curfs, M.H., Gribnau, A.A., and Dederen, P.J. (1993). Postnatal maturation of the dendritic fields of motoneuron pools supplying flexor and extensor muscles of the distal forelimb in the rat. *Dev. Camb. Engl.* 117, 535–541.
- Curfs, M.H., Gribnau, A.A., and Dederen, P.J. (1994). Selective elimination of transient corticospinal projections in the rat cervical spinal cord gray matter. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 78, 182–190.

D

- Dahlström, A., and Fuxe, K. (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20, 398–399.
- Dallel, R., Villanueva, L., Woda, A., and Voisin, D. (2003) Neurobiologie de la douleur trigéminal. *M/S : médecine science*, vol. 19, n° 5, 567-574
- Dallel, R., and Voisin, D. (2001). Towards a pain treatment based on the identification of the pain-generating mechanisms? *Eur. Neurol.* 45, 126–132.
- Debanne, D., Guérineau, N.C., Gähwiler, B.H., and Thompson, S.M. (1997). Action-potential propagation gated by an axonal I(A)-like K⁺ conductance in hippocampus. *Nature* 389, 286–289.
- Delfini, M.-C., Mantilleri, A., Gaillard, S., Hao, J., Reynders, A., Malapert, P., Alonso, S., François, A., Barrere, C., Seal, R., et al. (2013). TAFA4, a chemokine-like protein, modulates injury-induced mechanical and chemical pain hypersensitivity in mice. *Cell Rep.* 5, 378–388.
- Djoughri, L., and Lawson, S.N. (2004). Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 46, 131–145.
- Doly, S., Madeira, A., Fischer, J., Brisorgueil, M.-J., Daval, G., Bernard, R., Vergé, D., and Conrath, M. (2004). The 5-HT_{2A} receptor is widely distributed in the rat spinal cord and mainly localized at the plasma membrane of postsynaptic neurons. *J. Comp. Neurol.* 472, 496–511.
- Duan, B., Cheng, L., Bourane, S., Britz, O., Padilla, C., Garcia-Campmany, L., Krashes, M., Knowlton, W., Velasquez, T., Ren, X., et al. (2014). Identification of Spinal Circuits Transmitting and Gating Mechanical Pain. *Cell* 159, 1417–1432.

E

- Egemen, E., Börcek, A.Ö., Karaaslan, B., and Baykaner, M.K. (2012). Trigeminal neuralgia associated with cerebellopontine angle lipoma in childhood. *Pediatr. Neurosurg.* 48, 306–309.

F

- Falcon, M., Guendellman, D., Stolberg, A., Frenk, H., and Urca, G. (1996). Development of thermal nociception in rats. *Pain* 67, 203–208.
- Falls, W., and Gobel, S. (1979). Golgi and EM studies of the formation of dendritic and axonal arbors: the interneurons of the substantia gelatinosa of Rolando in newborn kittens. *J. Comp. Neurol.* 187, 1–18.
- Farazifard, R., Safarpour, F., Sheibani, V., and Javan, M. (2005). Eye-wiping test: A sensitive animal model for acute trigeminal pain studies. *Brain Res. Protoc.* 16, 44–49.

- Farel, P.B. (2002). Sensory neuron addition in juvenile rat: time course and specificity. *J. Comp. Neurol.* *449*, 158–165.
- Farel, P.B. (2003). Late differentiation contributes to the apparent increase in sensory neuron number in juvenile rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *144*, 91–98.
- Fay, R., and Kubin, L. (2000). Pontomedullary distribution of 5-HT_{2A} receptor-like protein in the rat. *J. Comp. Neurol.* *418*, 323–345.
- Fields, H.L., Basbaum, A.I., Clanton, C.H., and Anderson, S.D. (1977). Nucleus raphe magnus inhibition of spinal cord dorsal horn neurons. *Brain Res.* *126*, 441–453.
- Fitzgerald, M. (1983). Capsaicin and sensory neurones--a review. *Pain* *15*, 109–130.
- Fitzgerald, M. (1987). Prenatal growth of fine-diameter primary afferents into the rat spinal cord: A transganglionic tracer study. *J. Comp. Neurol.* *261*, 98–104.
- Fitzgerald, M. (2005). The development of nociceptive circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 507–520.
- Fitzgerald, M., and Jennings, E. (1999). The postnatal development of spinal sensory processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 7719–7722.
- Fitzgerald, M., and Koltzenburg, M. (1986). The functional development of descending inhibitory pathways in the dorsolateral funiculus of the newborn rat spinal cord. *Brain Res.* *389*, 261–270.
- Fiumelli, H., and Woodin, M.A. (2007). Role of activity-dependent regulation of neuronal chloride homeostasis in development. *Curr. Opin. Neurobiol.* *17*, 81–86.

G

- Gardell, L.R., Ibrahim, M., Wang, R., Wang, Z., Ossipov, M.H., Malan, T.P., Porreca, F., and Lai, J. (2004). Mouse strains that lack spinal dynorphin upregulation after peripheral nerve injury do not develop neuropathic pain. *Neuroscience* *123*, 43–52.
- Gascon, E., and Moqrich, A. (2010). Heterogeneity in primary nociceptive neurons: from molecules to pathology. *Arch. Pharm. Res.* *33*, 1489–1507.
- Gaspar, P., Cases, O., and Maroteaux, L. (2003). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 1002–1012.
- Geisler, H.C., Westerga, J., and Gramsbergen, A. (1993). Development of posture in the rat. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* *53*, 517–523.
- Gobel, S., Hockfield, S., and Ruda, A. (1981) An anatomical analysis of the similarities between medullary and spinal dorsal horn. In *Oral-Facial Sensory and motor mechanisms : international symposium on oral physiology*. Y. Kawamura and R. Dubner, eds., Quintessence, Tokyo in press.
- Gola, M., and Romey, G. Reponses anormales a des courants sous-liminaires de certaines membranes somatiques (neurones géants d'*Helix pomatia*). *Pflüg. Arch.* *327*, 105–131.
- Golden, J.P., DeMaro, J.A., Osborne, P.A., Milbrandt, J., and Johnson, E.M. (1999). Expression of neurturin, GDNF, and GDNF family-receptor mRNA in the developing and mature mouse. *Exp. Neurol.* *158*, 504–528.

- Grazzi, L., Usai, S., and Rigamonti, A. (2005). Facial pain in children and adolescents. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* *26 Suppl 2*, s101-103.
- Green, G.M., and Gibb, A.J. (2001). Characterization of the single-channel properties of NMDA receptors in laminae I and II of the dorsal horn of neonatal rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* *14*, 1590–1602.
- Grudt, T.J., and Perl, E.R. (2002). Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *J. Physiol.* *540*, 189–207.
- Grudt, T.J., Williams, J.T., and Travagli, R.A. (1995). Inhibition by 5-hydroxytryptamine and noradrenaline in substantia gelatinosa of guinea-pig spinal trigeminal nucleus. *J. Physiol.* *485*, 113–120.
- Gutierrez-Mecinas, M., Kuehn, E.D., Abaira, V.E., Polgár, E., Watanabe, M., and Todd, A.J. (2016). Immunostaining for Homer reveals the majority of excitatory synapses in laminae I-III of the mouse spinal dorsal horn. *Neuroscience* *329*, 171–181.

H

- Hammond, D.L., and Ruda, M.A. (1991). Developmental alterations in nociceptive threshold, immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P, and fluoride-resistant acid phosphatase in neonatally capsaicin-treated rats. *J. Comp. Neurol.* *312*, 436–450.
- Han, Z.S., Zhang, E.T., and Craig, A.D. (1998). Nociceptive and thermoreceptive lamina I neurons are anatomically distinct. *Nat. Neurosci.* *1*, 218–225.
- Hannon, J., and Hoyer, D. (2008). Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav. Brain Res.* *195*, 198–213.
- Harrop E. and Fitzgerald M. (Unpublished data) in *Synaptic Plasticity in Pain* (Marzia Malcangio, ed). pp76
- Helms, A.W., and Johnson, J.E. (2003). Specification of dorsal spinal cord interneurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* *13*, 42–49.
- Holmberg, H., and Schouenborg, J. (1996). Postnatal development of the nociceptive withdrawal reflexes in the rat: a behavioural and electromyographic study. *J. Physiol.* *493 (Pt 1)*, 239–252.
- Holzer, P. (1991). Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol. Rev.* *43*, 143–201.
- 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.
- Hou, B., Chen, H., Qu, X., Lin, X., Luo, F., and Li, C. (2015). Characteristics of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in dorsal root ganglion neurons at different ages and sizes. *Neuroreport* *26*, 981–987.
- Howard, R.F., Walker, S.M., Mota, P.M., and Fitzgerald, M. (2005). The ontogeny of neuropathic pain: postnatal onset of mechanical allodynia in rat spared nerve injury (SNI) and chronic constriction injury (CCI) models. *Pain* *115*, 382–389.

- Hu, H.-J., Carrasquillo, Y., Karim, F., Jung, W.E., Nerbonne, J.M., Schwarz, T.L., and Gereau, R.W. (2006). The kv4.2 potassium channel subunit is required for pain plasticity. *Neuron* 50, 89–100.
- Huang, H.-Y., Cheng, J.-K., Shih, Y.-H., Chen, P.-H., Wang, C.-L., and Tsaur, M.-L. (2005). Expression of A-type K channel alpha subunits Kv 4.2 and Kv 4.3 in rat spinal lamina II excitatory interneurons and colocalization with pain-modulating molecules. *Eur. J. Neurosci.* 22, 1149–1157.
- Huang, H.-Y., Liao, C.-W., Chen, P.-H., and Tsaur, M.-L. (2006). Transient expression of A-type K channel alpha subunits Kv4.2 and Kv4.3 in rat spinal neurons during development. *Eur. J. Neurosci.* 23, 1142–1150.
- Huang, L., Xian, Q., Shen, N., Shi, L., Qu, Y., and Zhou, L. (2015). Congenital absence of corticospinal tract does not severely affect plastic changes of the developing postnatal spinal cord. *Neuroscience* 301, 338–350.
- Hughes, A.S., Averill, S., King, V.R., Molander, C., and Shortland, P.J. (2008). Neurochemical characterization of neuronal populations expressing protein kinase C gamma isoform in the spinal cord and gracile nucleus of the rat. *Neuroscience* 153, 507–517.

J

- Jackman, A., and Fitzgerald, M. (2000). Development of peripheral hindlimb and central spinal cord innervation by subpopulations of dorsal root ganglion cells in the embryonic rat. *J. Comp. Neurol.* 418, 281–298.
- Jamon, M., and Clarac, F. (1998). Early walking in the neonatal rat: a kinematic study. *Behav. Neurosci.* 112, 1218–1228.
- Jancsó, G., and Maggi, C.A. (1987). Distribution of capsaicin-sensitive urinary bladder afferents in the rat spinal cord. *Brain Res.* 418, 371–376.
- Jancsó, G., Kiraly, E., and Jancsó-Gábor, A. (1977). Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature* 270, 741–743.
- Jennings, E., and Fitzgerald, M. (1996). C-fos can be induced in the neonatal rat spinal cord by both noxious and innocuous peripheral stimulation. *Pain* 68, 301–306.
- Jennings, E., and Fitzgerald, M. (1998). Postnatal changes in responses of rat dorsal horn cells to afferent stimulation: a fibre-induced sensitization. *J. Physiol.* 509 (Pt 3), 859–868.

K

- Kalb, R.G. (1994). Regulation of motor neuron dendrite growth by NMDA receptor activation. *Dev. Camb. Engl.* 120, 3063–3071.
- Kar, S., and Quirion, R. (1995). Neuropeptide receptors in developing and adult rat spinal cord: an in vitro quantitative autoradiography study of calcitonin gene-related peptide, neurokinins, mu-opioid, galanin, somatostatin, neurotensin and vasoactive intestinal polypeptide receptors. *J. Comp. Neurol.* 354, 253–281.

- Kardon, A.P., Polgár, E., Hachisuka, J., Snyder, L.M., Cameron, D., Savage, S., Cai, X., Karnup, S., Fan, C.R., Hemenway, G.M., et al. (2014). Dynorphin Acts as a Neuromodulator to Inhibit Itch in the Dorsal Horn of the Spinal Cord. *Neuron* 82, 573–586.
- Kayser, V., Elfassi, I.E., Aubel, B., Melfort, M., Julius, D., Gingrich, J.A., Hamon, M., and Bourgoin, S. (2007). Mechanical, thermal and formalin-induced nociception is differentially altered in 5-HT1A-/-, 5-HT1B-/-, 5-HT2A-/-, 5-HT3A-/- and 5-HTT-/- knock-out male mice. *Pain* 130, 235–248.
- Kayser, V., Viguiier, F., Ioannidi, M., Bernard, J.-F., Latrémolière, A., Michot, B., Vela, J.-M., Buschmann, H., Hamon, M., and Bourgoin, S. (2010). Differential anti-neuropathic pain effects of tetrodotoxin in sciatic nerve- versus infraorbital nerve-ligated rats--behavioral, pharmacological and immunohistochemical investigations. *Neuropharmacology* 58, 474–487.
- Kerai, B., Greensmith, L., Vrbová, G., and Navarrete, R. (1995). Effect of transient neonatal muscle paralysis on the growth of soleus motoneurons in the rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 85, 89–95.
- Kerr, F.W. (1970). The fine structure of the subnucleus caudalis of the trigeminal nerve. *Brain Res.* 23, 129–145.
- Kirstein, M., and Fariñas (2002), I. Sensing life: regulation of sensory neuron survival by neurotrophins. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 59, 1787–1802.
- Kitao, Y., Robertson, B., Kudo, M., and Grant, G. (1996). Neurogenesis of subpopulations of rat lumbar dorsal root ganglion neurons including neurons projecting to the dorsal column nuclei. *J. Comp. Neurol.* 371, 249–257.
- Kjørsvik, A., Tjølsen, A., and Hole, K. (2001). Activation of spinal serotonin(2A/2C) receptors augments nociceptive responses in the rat. *Brain Res.* 910, 179–181.
- Klein, R., Nanduri, V., Jing, S.A., Lamballe, F., Tapley, P., Bryant, S., Cordon-Cardo, C., Jones, K.R., Reichardt, L.F., and Barbacid, M. (1991). The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 66, 395–403.
- Klein, R., Lamballe, F., Bryant, S., and Barbacid, M. (1992). The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4. *Neuron* 8, 947–956.
- Knotkova, H., Pappagallo, M., and Szallasi, A. (2008). Capsaicin (TRPV1 Agonist) therapy for pain relief: farewell or revival? *Clin. J. Pain* 24, 142–154.
- Koch, S.C., and Fitzgerald, M. (2013). Activity-dependent development of tactile and nociceptive spinal cord circuits. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1279, 97–102.
- Koch, S.C., Tochiki, K.K., Hirschberg, S., and Fitzgerald, M. (2012). C-fiber activity-dependent maturation of glycinergic inhibition in the spinal dorsal horn of the postnatal rat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 12201–12206.
- Kose, A., Ito, A., Saito, N., and Tanaka, C. (1990). Electron microscopic localization of gamma- and beta II-subspecies of protein kinase C in rat hippocampus. *Brain Res.* 518, 209–217.
- Kramer, I., Sigris, M., Nooij, J.C. de, Taniuchi, I., Jessell, T.M., and Arber, S. (2006). A Role for Runx Transcription Factor Signaling in Dorsal Root Ganglion Sensory Neuron Diversification. *Neuron* 49, 379–393.

L

- Labombarda, F., Coronel, M.F., Villar, M.J., Nicola, A.F.D., and González, S.L. (2008). Neuropathic pain and temporal expression of preprodynorphin, protein kinase C and N-methyl-D-aspartate receptor subunits after spinal cord injury. *Neurosci. Lett.* *447*, 115–119.
- Lakke, E.A. (1997). The projections to the spinal cord of the rat during development: a timetable of descent. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* *135*, I–XIV, 1–143.
- Lapirot, O., Melin, C., Modolo, A., Nicolas, C., Messaoudi, Y., Monconduit, L., Artola, A., Luccarini, P., and Dallel, R. (2011). Tonic and phasic descending dopaminergic controls of nociceptive transmission in the medullary dorsal horn. *Pain* *152*, 1821–1831.
- Laquerrière A. (2010) Mise en place des voies de la douleur chez le fœtus. Congrès de médecine fœtale 2010, Morzine. *mt Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie* 2010 ; 12 (2) : 111-5
- Latrémolière, A., Mauborgne, A., Masson, J., Bourgoin, S., Kayser, V., Hamon, M., and Pohl, M. (2008). Differential implication of proinflammatory cytokine interleukin-6 in the development of cephalic versus extracephalic neuropathic pain in rats. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 8489–8501.
- Lawson, S.N., and Biscoe, T.J. (1979). Development of mouse dorsal root ganglia: an autoradiographic and quantitative study. *J. Neurocytol.* *8*, 265–274.
- Le Bars (1988) Serotonin and Pain. In: *Neuronal Serotonin* (Osborne NN, Hamon M, eds). pp 171–221. New York: Wiley.
- Lee, D.H., and Chung, J.M. (1996). Neuropathic pain in neonatal rats. *Neurosci. Lett.* *209*, 140–142.
- Lee, K.J., Dietrich, P., and Jessell, T.M. (2000). Genetic ablation reveals that the roof plate is essential for dorsal interneuron specification. *Nature* *403*, 734–740.
- Levine, S. (1994). The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *746*, 275–288–293.
- Lewin, G.R., and Moshourab, R. (2004). Mechanosensation and pain. *J. Neurobiol.* *61*, 30–44.
- Li, J., and Baccei, M.L. (2012). Developmental regulation of membrane excitability in rat spinal lamina I projection neurons. *J. Neurophysiol.* *107*, 2604–2614.
- Li, J.-L., Li, Y.-Q., Nomura, S., Kaneko, T., and Mizuno, N. (2001). Protein kinase C gamma-like immunoreactivity in the substantia gelatinosa of the medullary dorsal horn of the rat. *Neurosci. Lett.* *311*, 185–188.
- Li, L., Rutlin, M., Abaira, V.E., Cassidy, C., Kus, L., Gong, S., Jankowski, M.P., Luo, W., Heintz, N., Koerber, H.R., et al. (2011). The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons. *Cell* *147*, 1615–1627.
- Li, Y.Q., Li, H., Kaneko, T., and Mizuno, N. (1999). Substantia gelatinosa neurons in the medullary dorsal horn: An intracellular labeling study in the rat. *J. Comp. Neurol.* *411*, 399–412.

- Light, A.R., and Perl, E.R. (1979). Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers. *J. Comp. Neurol.* 186, 133–150.
- Liljencrantz, J., and Olausson, H. (2014). Tactile C fibers and their contributions to pleasant sensations and to tactile allodynia. *Front. Behav. Neurosci.* 8, 37.
- Lima, D., and Coimbra, A. (1983). The neuronal population of the marginal zone (lamina I) of the rat spinal cord. A study based on reconstructions of serially sectioned cells. *Anat. Embryol. (Berl.)* 167, 273–288.
- Liu, D., Diorio, J., Day, J.C., Francis, D.D., and Meaney, M.J. (2000). Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nat. Neurosci.* 3, 799–806.
- Löken, L.S., Wessberg, J., Morrison, I., McGlone, F., and Olausson, H. (2009). Coding of pleasant touch by unmyelinated afferents in humans. *Nat. Neurosci.* 12, 547–548.
- Longair, M.H., Baker, D.A., and Armstrong, J.D. (2011). Simple Neurite Tracer: open source software for reconstruction, visualization and analysis of neuronal processes. *Bioinformatics* 27, 2453–2454.
- Lorenzo, L.-E., Ramien, M., St Louis, M., De Koninck, Y., and Ribeiro-da-Silva, A. (2008). Postnatal changes in the Rexed lamination and markers of nociceptive afferents in the superficial dorsal horn of the rat. *J. Comp. Neurol.* 508, 592–604.
- Low, C.-M., and Wee, K.S.-L. (2010). New insights into the not-so-new NR3 subunits of N-methyl-D-aspartate receptor: localization, structure, and function. *Mol. Pharmacol.* 78, 1–11.
- Lu, Y., and Perl, E.R. (2005). Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II). *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 3900–3907.
- Lu, Y., and Perl, E.R. (2007). Selective action of noradrenaline and serotonin on neurones of the spinal superficial dorsal horn in the rat. *J. Physiol.* 582, 127–136.
- Lu, Y., Dong, H., Gao, Y., Gong, Y., Ren, Y., Gu, N., Zhou, S., Xia, N., Sun, Y.-Y., Ji, R.-R., et al. (2013). A feed-forward spinal cord glycinergic neural circuit gates mechanical allodynia. *J. Clin. Invest.* 123, 4050–4062.
- Lumsden, A., and Graham, A. (1995). Neural patterning: A forward role for hedgehog. *Curr. Biol. CB* 5, 1347–1350.

M

- Ma, W., Saunders, P.A., Somogyi, R., Poulter, M.O., and Barker, J.L. (1993). Ontogeny of GABAA receptor subunit mRNAs in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *J. Comp. Neurol.* 338, 337–359.
- Malmberg, A.B., Chen, C., Tonegawa, S., and Basbaum, A.I. (1997a). Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKCgamma. *Science* 278, 279–283.
- Malmberg, A.B., Brandon, E.P., Idzerda, R.L., Liu, H., McKnight, G.S., and Basbaum, A.I. (1997b). Diminished inflammation and nociceptive pain with preservation of neuropathic pain in mice with a targeted mutation of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 7462–7470.

- Mao, J., Price, D.D., and Mayer, D.J. (1995). Experimental mononeuropathy reduces the antinociceptive effects of morphine: implications for common intracellular mechanisms involved in morphine tolerance and neuropathic pain. *Pain* 61, 353–364.
- Marlier, L., Rajaofetra, N., Poulat, P., and Privat, A. (1990). Modification of serotonergic innervation of the rat spinal cord dorsal horn after neonatal capsaicin treatment. *J. Neurosci. Res.* 25, 112–118.
- Marlier, L., Poulat, P., Rajaofetra, N., Sandillon, F., and Privat, A. (1992). Plasticity of the serotonergic innervation of the dorsal horn of the rat spinal cord following neonatal capsaicin treatment. *J. Neurosci. Res.* 31, 346–358.
- Marsh, D., Dickenson, A., Hatch, D., and Fitzgerald, M. (1999a). Epidural opioid analgesia in infant rats I: mechanical and heat responses. *Pain* 82, 23–32.
- Marsh, D., Dickenson, A., Hatch, D., and Fitzgerald, M. (1999b). Epidural opioid analgesia in infant rats II: responses to carrageenan and capsaicin. *Pain* 82, 33–38.
- Martin, W.J., Liu, H., Wang, H., Malmberg, A.B., and Basbaum, A.I. (1999). Inflammation-induced up-regulation of protein kinase Cgamma immunoreactivity in rat spinal cord correlates with enhanced nociceptive processing. *Neuroscience* 88, 1267–1274.
- Martin, W.J., Malmberg, A.B., and Basbaum, A.I. (2001). PKCgamma contributes to a subset of the NMDA-dependent spinal circuits that underlie injury-induced persistent pain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 5321–5327.
- Mathis, L., and Nicolas, J.F. (2000). Different clonal dispersion in the rostral and caudal mouse central nervous system. *Development* 127, 1277–1290.
- Matise, M. (2002). A dorsal elaboration in the spinal cord. *Neuron* 34, 491–493.
- McKelvey, R., Berta, T., Old, E., Ji, R.-R., and Fitzgerald, M. (2015). Neuropathic pain is constitutively suppressed in early life by anti-inflammatory neuroimmune regulation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 457–466.
- Mermet-Joret, N., Chatila, N., Pereira, B., Monconduit, L., Dallel, R., and Antri, M. (2016). Lamina specific postnatal development of PKCγ interneurons within the rat medullary dorsal horn. *Dev. Neurobiol.*
- Michot, B., Bourgoin, S., Kayser, V., and Hamon, M. (2013). Effects of tapentadol on mechanical hypersensitivity in rats with ligatures of the infraorbital nerve versus the sciatic nerve. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 17, 867–880.
- Michot, B., Kayser, V., Bastian, G., Bourgoin, S., and Hamon, M. (2014). Differential pharmacological alleviation of oxaliplatin-induced hyperalgesia/allodynia at cephalic versus extra-cephalic level in rodents. *Neuropharmacology* 79, 432–443.
- Michot, B., Kayser, V., Hamon, M., and Bourgoin, S. (2015). CGRP receptor blockade by MK-8825 alleviates allodynia in infraorbital nerve-ligated rats. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 19, 281–290.
- Miletic, V., Bowen, K.K., and Miletic, G. (2000). Loose ligation of the rat sciatic nerve is accompanied by changes in the subcellular content of protein kinase C beta II and gamma in the spinal dorsal horn. *Neurosci. Lett.* 288, 199–202.

- Miranda-Contreras, L., Benítez-Díaz, P., Peña-Contreras, Z., Mendoza-Briceño, R.V., and Palacios-Prü, E. (2002). Levels of amino acid neurotransmitters during neurogenesis and in histotypic cultures of mouse spinal cord. *Dev. Neurosci.* *24*, 59–70.
- Mirauccourt, L.S., Dallel, R., and Voisin, D.L. (2007). Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through PKCgamma interneurons. *PloS One* *2*, e1116.
- Mirauccourt, L.S., Moisset, X., Dallel, R., and Voisin, D.L. (2009). Glycine inhibitory dysfunction induces a selectively dynamic, morphine-resistant, and neurokinin 1 receptor- independent mechanical allodynia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 2519–2527.
- Molander, C., Xu, Q., and Grant, G. (1984). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord. *J. Comp. Neurol.* *230*, 133–141.
- Moore, E.R., Anderson, G.C., Bergman, N., and Dowswell, T. (2012). Early skin-to-skin contact for mothers and their healthy newborn infants. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD003519.
- 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.
- Mori, M., Kose, A., Tsujino, T., and Tanaka, C. (1990). Immunocytochemical localization of protein kinase C subspecies in the rat spinal cord: light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* *299*, 167–177.
- Moss, A., Beggs, S., Vega-Avelaira, D., Costigan, M., Hathway, G.J., Salter, M.W., and Fitzgerald, M. (2007). Spinal microglia and neuropathic pain in young rats. *Pain* *128*, 215–224.

N

- Nakagawa, H., and Hiura, A. (2006). Capsaicin, transient receptor potential (TRP) protein subfamilies and the particular relationship between capsaicin receptors and small primary sensory neurons. *Anat. Sci. Int.* *81*, 135–155.
- Nakajima, A., Tsuboi, Y., Suzuki, I., Honda, K., Shinoda, M., Kondo, M., Matsuura, S., Shibuta, K., Yasuda, M., Shimizu, N., et al. (2011). PKCgamma in Vc and C1/C2 is involved in trigeminal neuropathic pain. *J. Dent. Res.* *90*, 777–781.
- Nakao, A., Takahashi, Y., Nagase, M., Ikeda, R., and Kato, F. (2012). Role of capsaicin-sensitive C-fiber afferents in neuropathic pain-induced synaptic potentiation in the nociceptive amygdala. *Mol. Pain* *8*, 51.
- Nandi, R., and Fitzgerald, M. (2005). Opioid analgesia in the newborn. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* *9*, 105–108.
- Nandi, R., Beacham, D., Middleton, J., Koltzenburg, M., Howard, R.F., and Fitzgerald, M. (2004). The functional expression of mu opioid receptors on sensory neurons is developmentally regulated; morphine analgesia is less selective in the neonate. *Pain* *111*, 38–50.
- Narikawa, K., Furue, H., Kumamoto, E., and Yoshimura, M. (2000). In vivo patch-clamp analysis of IPSCs evoked in rat substantia gelatinosa neurons by cutaneous mechanical stimulation. *J. Neurophysiol.* *84*, 2171–2174.

- Narita, M., Suzuki, M., Narita, M., Yajima, Y., Suzuki, R., Shioda, S., and Suzuki, T. (2004). Neuronal protein kinase C γ -dependent proliferation and hypertrophy of spinal cord astrocytes following repeated in vivo administration of morphine. *Eur. J. Neurosci.* *19*, 479–484.
- Neumann, S., Braz, J.M., Skinner, K., Llewellyn-Smith, I.J., and Basbaum, A.I. (2008). Innocuous, not noxious, input activates PKC γ interneurons of the spinal dorsal horn via myelinated afferent fibers. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 7936–7944.
- Ni, T.-S., Wu, S.-X., and Li, Y.-Q. (2002). Co-existence of protein kinase C γ and calcium-binding proteins in neurons of the medullary dorsal horn of the rat. *Neurosignals* *11*, 88–94.
- Niitsu, Y., Hamada, S., Hamaguchi, K., Mikuni, M., and Okado, N. (1995). Regulation of synapse density by 5-HT_{2A} receptor agonist and antagonist in the spinal cord of chicken embryo. *Neurosci. Lett.* *195*, 159–162.

O

- Obata, H., Saito, S., Sasaki, M., Ishizaki, K., and Goto, F. (2001). Antiallodynic effect of intrathecally administered 5-HT₂ agonists in rats with nerve ligation. *Pain* *90*, 173–179.
- Obata, H., Saito, S., Sasaki, M., and Goto, F. (2002). Possible involvement of a muscarinic receptor in the anti-allodynic action of a 5-HT₂ receptor agonist in rats with nerve ligation injury. *Brain Res.* *932*, 124–128.
- van Oers, H.J., de Kloet, E.R., Whelan, T., and Levine, S. (1998). Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *18*, 10171–10179.
- Ohsawa, M., Narita, M., Mizoguchi, H., Cheng, E., and Tseng, L.F. (2001). Reduced hyperalgesia induced by nerve injury, but not by inflammation in mice lacking protein kinase C γ isoform. *Eur. J. Pharmacol.* *429*, 157–160.
- Ohtani, A., Kozono, N., Senzaki, K., and Shiga, T. (2014). Serotonin 2A receptor regulates microtubule assembly and induces dynamics of dendritic growth cones in rat cortical neurons in vitro. *Neurosci. Res.* *81–82*, 11–20.
- Okamoto, K., Imbe, H., Tashiro, A., Kimura, A., Donishi, T., Tamai, Y., and Senba, E. (2005). The role of peripheral 5HT_{2A} and 5HT_{1A} receptors on the orofacial formalin test in rats with persistent temporomandibular joint inflammation. *Neuroscience* *130*, 465–474.
- Okamoto, K., Kimura, A., Donishi, T., Imbe, H., Nishie, Y., Matsushita, H., Tamai, Y., and Senba, E. (2006). Contribution of peripheral 5-HT_{2A} or 5-HT₃ receptors to Fos expression in the trigeminal spinal nucleus produced by acute injury to the masseter muscle during persistent temporomandibular joint inflammation in rats. *Neuroscience* *143*, 597–606.
- Okamoto, K., Imbe, H., Kimura, A., Donishi, T., Tamai, Y., and Senba, E. (2007). Activation of central 5HT_{2A} receptors reduces the craniofacial nociception of rats. *Neuroscience* *147*, 1090–1102.
- Otten, U., Lorez, H.P., and Businger, F. (1983). Nerve growth factor antagonizes the neurotoxic action of capsaicin on primary sensory neurones. *Nature* *301*, 515–517.
- Oyamaguchi, A., Abe, T., Sugiyo, S., Niwa, H., and Takemura, M. (2016). Selective elimination of isolectin B4-binding trigeminal neurons enhanced formalin-induced nocifensive behavior in the upper lip of rats and c-Fos expression in the trigeminal subnucleus caudalis. *Neurosci. Res.* *103*, 40–47.

P

- Parekh, D.B., Ziegler, W., and Parker, P.J. (2000). Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J.* *19*, 496–503.
- Park, J.S., Nakatsuka, T., Nagata, K., Higashi, H., and Yoshimura, M. (1999). Reorganization of the primary afferent termination in the rat spinal dorsal horn during post-natal development. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *113*, 29–36.
- Patapoutian, A., Peier, A.M., Story, G.M., and Viswanath, V. (2003). ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 529–539.
- Peirs, C., Patil, S., Bouali-Benazzouz, R., Artola, A., Landry, M., and Dallel, R. (2014). Protein kinase C gamma interneurons in the rat medullary dorsal horn: distribution and synaptic inputs to these neurons, and subcellular localization of the enzyme. *J. Comp. Neurol.* *522*, 393–413.
- Peirs, C., Williams, S.-P.G., Zhao, X., Walsh, C.E., Gedeon, J.Y., Cagle, N.E., Goldring, A.C., Hioki, H., Liu, Z., Marell, P.S., et al. (2015). Dorsal Horn Circuits for Persistent Mechanical Pain. *Neuron* *87*, 797–812.
- Peirs, C., Bourgois, N., Artola, A., and Dallel, R. (2016). Protein Kinase C γ Interneurons Mediate C-fiber-induced Orofacial Secondary Static Mechanical Allodynia, but Not C-fiber-induced Nociceptive Behavior. *Anesthesiology* *124*, 1136–1152.
- van Pelt, J., and Uylings, H.B.M. (2002). Branching rates and growth functions in the outgrowth of dendritic branching patterns. *Netw. Bristol Engl.* *13*, 261–281.
- Petitjean, H., Pawlowski, S.A., Fraine, S.L., Sharif, B., Hamad, D., Fatima, T., Berg, J., Brown, C.M., Jan, L.-Y., Ribeiro-da-Silva, A., et al. (2015). Dorsal Horn Parvalbumin Neurons Are Gate-Keepers of Touch-Evoked Pain after Nerve Injury. *Cell Rep.* *13*, 1246–1257.
- Pham-Dang, N., Descheemaeker, A., Dallel, R., and Artola, A. (2016). Activation of medullary dorsal horn γ isoform of protein kinase C interneurons is essential to the development of both static and dynamic facial mechanical allodynia. *Eur. J. Neurosci.* *43*, 802–810.
- Pichon, X., Wattiez, A.S., Becamel, C., Ehrlich, I., Bockaert, J., Eschali r, A., Marin, P., and Courteix, C. (2010). Disrupting 5-HT(2A) receptor/PDZ protein interactions reduces hyperalgesia and enhances SSRI efficacy in neuropathic pain. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *18*, 1462–1470.
- Pignatelli, D., Ribeiro-da-Silva, A., and Coimbra, A. (1989). Postnatal maturation of primary afferent terminations in the substantia gelatinosa of the rat spinal cord. An electron microscopic study. *Brain Res.* *491*, 33–44.
- Pohl, M., Benoliel, J.J., Bourgoin, S., Lombard, M.C., Mauborgne, A., Taquet, H., Carayon, A., Besson, J.M., Cesselin, F., and Hamon, M. (1990). Regional distribution of calcitonin gene-related peptide-, substance P-, cholecystokinin-, Met5-enkephalin-, and dynorphin A (1-8)-like materials in the spinal cord and dorsal root ganglia of adult rats: effects of dorsal rhizotomy and neonatal capsaicin. *J. Neurochem.* *55*, 1122–1130.
- Polg r, E., Fowler, J.H., McGill, M.M., and Todd, A.J. (1999). The types of neuron which contain protein kinase C gamma in rat spinal cord. *Brain Res.* *833*, 71–80.

- Polgár, E., Hughes, D.I., Riddell, J.S., Maxwell, D.J., Puskár, Z., and Todd, A.J. (2003). Selective loss of spinal GABAergic or glycinergic neurons is not necessary for development of thermal hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Pain* 104, 229–239.
- Polgár, E., Sardella, T.C.P., Tiong, S.Y.X., Locke, S., Watanabe, M., and Todd, A.J. (2013). Functional differences between neurochemically defined populations of inhibitory interneurons in the rat spinal dorsal horn. *Pain* 154, 2606–2615.
- Poyatos, I., Ponce, J., Aragón, C., Giménez, C., and Zafra, F. (1997). The glycine transporter GLYT2 is a reliable marker for glycine-immunoreactive neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 49, 63–70.
- Prescott, S.A., and De Koninck, Y. (2002). Four cell types with distinctive membrane properties and morphologies in lamina I of the spinal dorsal horn of the adult rat. *J. Physiol.* 539, 817–836.
- Price, T.J., and Flores, C.M. (2007). Critical Evaluation of the Colocalization Between Calcitonin Gene-Related Peptide, Substance P, Transient Receptor Potential Vanilloid Subfamily Type 1 Immunoreactivities, and Isolectin B4 Binding in Primary Afferent Neurons of the Rat and Mouse. *J. Pain* 8, 263–272.
- Punnakkal, P., von Schoultz, C., Haenraets, K., Wildner, H., and Zeilhofer, H.U. (2014). Morphological, biophysical and synaptic properties of glutamatergic neurons of the mouse spinal dorsal horn. *J. Physiol.* 592, 759–776.

R

- Rajaofetra, N., Sandillon, F., Geffard, M., and Privat, A. (1989). Pre- and post-natal ontogeny of serotonergic projections to the rat spinal cord. *J. Neurosci. Res.* 22, 305–321.
- Ramon y Cajal S. (1909) by Pedro J. Andres-Barquin in *Ramón y Cajal: a century after the publication of his masterpiece*.
- Reynders, A., and Moqrich, A. (2015). Analysis of cutaneous MRGPRD free nerve endings and C-LTMRs transcriptomes by RNA-sequencing. *Genomics Data* 5, 132–135.
- Rexed, B. (1952). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J. Comp. Neurol.* 96, 414–495.
- Romand, S., Wang, Y., Toledo-Rodriguez, M., and Markram, H. (2011). Morphological development of thick-tufted layer V pyramidal cells in the rat somatosensory cortex. *Front. Neuroanat.* 5, 5.
- Ruscheweyh, R., and Sandkühler, J. (2002). Lamina-specific membrane and discharge properties of rat spinal dorsal horn neurones in vitro. *J. Physiol.* 541, 231–244.
- Ryan, S.J., Ehrlich, D.E., and Rainnie, D.G. (2014). Morphology and dendritic maturation of developing principal neurons in the rat basolateral amygdala. *Brain Struct. Funct.* 221, 839–854.

S

- Saito, N., and Shirai, Y. (2002). Protein kinase C gamma (PKC gamma): function of neuron specific isotype. *J. Biochem. (Tokyo)* 132, 683–687.
- Sandkühler, J. (2009). Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol. Rev.* 89, 707–758.

- Sardella, T.C., Polgár, E., Garzo, F., Furuta, T., Kaneko, T., Watanabe, M., and Todd, A.J. (2011). Dynorphin is Expressed Primarily by GABAergic Neurons That Contain Galanin in the Rat Dorsal Horn. *Mol. Pain* 7, 1744-8069-7–76.
- Sato, Y., Nakajima, S., Shiraga, N., Atsumi, H., Yoshida, S., Koller, T., Gerig, G., and Kikinis, R. (1998). Three-dimensional multi-scale line filter for segmentation and visualization of curvilinear structures in medical images. *Med. Image Anal.* 2, 143–168.
- Schaffner, A.E., Behar, T., Nadi, S., Smallwood, V., and Barker, J.L. (1993). Quantitative analysis of transient GABA expression in embryonic and early postnatal rat spinal cord neurons. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 72, 265–276.
- Schlichter, R., Bader, C.R., and Bernheim, L. (1991). Development of anomalous rectification (I_h) and of a tetrodotoxin-resistant sodium current in embryonic quail neurones. *J. Physiol.* 442, 127.
- Schmid, B., Schindelin, J., Cardona, A., Longair, M., and Heisenberg, M. (2010). A high-level 3D visualization API for Java and ImageJ. *BMC Bioinformatics* 11, 274.
- Schwaller, F., Kwok, C., and Fitzgerald, M. (2016). Postnatal maturation of the spinal-bulbo-spinal loop: brainstem control of spinal nociception is independent of sensory input in neonatal rats. *Pain* 157, 677–686.
- Seal, R.P., Wang, X., Guan, Y., Raja, S.N., Woodbury, C.J., Basbaum, A.I., and Edwards, R.H. (2009). Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature* 462, 651–655.
- Senba, E., Shiosaka, S., Hara, Y., Inagaki, S., Sakanka, M., Takatsuki, K., Kawai, Y., and Tohyama, M. (1982). Ontogeny of the peptidergic system in the rat spinal cord: Immunohistochemical analysis. *J. Comp. Neurol.* 208, 54–66.
- Seo, H., Seol, M.-J., and Lee, K. (2015). Differential expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel subunits during hippocampal development in the mouse. *Mol. Brain* 8, 13.
- Shechter, R., Ziv, Y., and Schwartz, M. (2007). New GABAergic interneurons supported by myelin-specific T cells are formed in intact adult spinal cord. *Stem Cells* Dayt. Ohio 25, 2277–2282.
- Sherman, S.E., and Loomis, C.W. (1996). Strychnine-sensitive modulation is selective for non-noxious somatosensory input in the spinal cord of the rat. *Pain* 66, 321–330.
- Shi, Y., Chichung Lie, D., Taupin, P., Nakashima, K., Ray, J., Yu, R.T., Gage, F.H., and Evans, R.M. (2004). Expression and function of orphan nuclear receptor TLX in adult neural stem cells. *Nature* 427, 78–83.
- Shigetani, Y., Howard, S., Guidato, S., Furushima, K., Abe, T., and Itasaki, N. (2008). Wnt3 promotes coalescence of cells of neural crest and placode origins in the trigeminal region during head development. *Dev. Biol.* 319, 346–358.
- Shumilla, J.A., Liron, T., Mochly-Rosen, D., Kendig, J.J., and Sweitzer, S.M. (2005). Ethanol Withdrawal–Associated Allodynia and Hyperalgesia: Age-Dependent Regulation by Protein Kinase C ϵ and γ Isozymes. *J. Pain* 6, 535–549.
- Skagerberg, G., and Björklund, A. (1985). Topographic principles in the spinal projections of serotonergic and non-serotonergic brainstem neurons in the rat. *Neuroscience* 15, 445–480.
- Smith, J.L., and Schoenwolf, G.C. (1997). Neurulation: coming to closure. *Trends Neurosci.* 20, 510–517.

- Smith, K.M., Boyle, K.A., Madden, J.F., Dickinson, S.A., Jobling, P., Callister, R.J., Hughes, D.I., and Graham, B.A. (2015). Functional heterogeneity of calretinin-expressing neurons in the mouse superficial dorsal horn: implications for spinal pain processing. *J. Physiol.* *593*, 4319–4339.
- Smith Jr., T.G., Lange, G.D., and Marks, W.B. (1996). Fractal methods and results in cellular morphology — dimensions, lacunarity and multifractals. *J. Neurosci. Methods* *69*, 123–136.
- Stottmann, R.W., and Klingensmith, J. (2011). Bone morphogenetic protein signaling is required in the dorsal neural folds before neurulation for the induction of spinal neural crest cells and dorsal neurons. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *240*, 755–765.
- Streit, A. (2004). Early development of the cranial sensory nervous system: from a common field to individual placodes. *Dev. Biol.* *276*, 1–15.
- Sugimoto, T., Fujiyoshi, Y., He, Y.F., Xiao, C., and Ichikawa, H. (1997). Trigeminal primary projection to the rat brain stem sensory trigeminal nuclear complex and surrounding structures revealed by anterograde transport of cholera toxin B subunit-conjugated and *Bandeiraea simplicifolia* isolectin B4-conjugated horseradish peroxidase. *Neurosci. Res.* *28*, 361–371.
- Sweitzer, S.M., Wong, S.M.E., Peters, M.C., Mochly-Rosen, D., Yeomans, D.C., and Kendig, J.J. (2004). Protein kinase C epsilon and gamma: involvement in formalin-induced nociception in neonatal rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *309*, 616–625.
- Szabo, N.E., da Silva, R.V., Sotocinal, S.G., Zeilhofer, H.U., Mogil, J.S., and Kania, A. (2015). *Hoxb8* intersection defines a role for *Lmx1b* in excitatory dorsal horn neuron development, spinofugal connectivity, and nociception. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *35*, 5233–5246.
- Szallasi, A. (1994). The vanilloid (capsaicin) receptor: receptor types and species differences. *Gen. Pharmacol.* *25*, 223–243.
- Szöke, É., Seress, L., and Szolcsányi, J. (2002). Neonatal capsaicin treatment results in prolonged mitochondrial damage and delayed cell death of B cells in the rat trigeminal ganglia. *Neuroscience* *113*, 925–937.
- Szolcsányi, J., Jancsó-Gábor, A., and Joo, F. (1975). Functional and fine structural characteristics of the sensory neuron blocking effect of capsaicin. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* *287*, 157–169.

T

- Tadros, M.A., Harris, B.M., Anderson, W.B., Brichta, A.M., Graham, B.A., and Callister, R.J. (2012). Are all spinal segments equal: intrinsic membrane properties of superficial dorsal horn neurons in the developing and mature mouse spinal cord. *J. Physiol.* *590*, 2409–2425.
- Tanabe, Y., and Jessell, T.M. (1996). Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* *274*, 1115–1123.
- Tanaka, C., and Saito, N. (1992). Localization of subspecies of protein kinase C in the mammalian central nervous system. *Neurochem. Int.* *21*, 499–512.
- Tanaka, H., Amamiya, S., Miura, N., Araki, A., Ohinata, J., and Fujieda, K. (2006). Postnatal development of brainstem serotonin-containing neurons projecting to lumbar spinal cord in rats. *Brain Dev.* *28*, 586–591.

- Thibault, K., Van Steenwinckel, J., Brisorgueil, M.-J., Fischer, J., Hamon, M., Calvino, B., and Conrath, M. (2008). Serotonin 5-HT_{2A} receptor involvement and Fos expression at the spinal level in vincristine-induced neuropathy in the rat. *Pain* *140*, 305–322.
- Thiels, E., Alberts, J.R., and Cramer, C.P. (1990). Weaning in rats: II. Pup behavior patterns. *Dev. Psychobiol.* *23*, 495–510.
- Todd, A.J. (2010). Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat. Rev. Neurosci.* *11*, 823–836.
- Todd, A.J., and Sullivan, A.C. (1990). Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat. *J. Comp. Neurol.* *296*, 496–505.
- Todd, A.J., Hughes, D.I., Polgár, E., Nagy, G.G., Mackie, M., Ottersen, O.P., and Maxwell, D.J. (2003). The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn. *Eur. J. Neurosci.* *17*, 13–27.
- Torsney, C., Meredith-Middleton, J., and Fitzgerald, M. (2000). Neonatal capsaicin treatment prevents the normal postnatal withdrawal of A fibres from lamina II without affecting fos responses to innocuous peripheral stimulation. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *121*, 55–65.
- Tractenberg, S.G., Levandowski, M.L., de Azeredo, L.A., Orso, R., Roithmann, L.G., Hoffmann, E.S., Brenhouse, H., and Grassi-Oliveira, R. (2016). An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: Evidence from a four-stage methodological systematic review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *68*, 489–503.

U

- Ulfhake, B., Cullheim, S., and Franson, P. (1988). Postnatal development of cat hind limb motoneurons. I: Changes in length, branching structure, and spatial distribution of dendrites of cat triceps surae motoneurons. *J. Comp. Neurol.* *278*, 69–87.

V

- Van Steenwinckel, J., Brisorgueil, M.-J., Fischer, J., Vergé, D., Gingrich, J.A., Bourgoin, S., Hamon, M., Bernard, R., and Conrath, M. (2008). Role of spinal serotonin 5-HT_{2A} receptor in 2',3'-dideoxycytidine-induced neuropathic pain in the rat and the mouse. *Pain* *137*, 66–80.
- Vasseur and Delion (2013) Périodes sensibles dans le développement psychomoteur de l'enfant de 0 à 3 ans. Edition : érès. 1001BB
- Vega-Avelaira, D., McKelvey, R., Hathway, G., and Fitzgerald, M. (2012). The emergence of adolescent onset pain hypersensitivity following neonatal nerve injury. *Mol. Pain* *8*, 30.
- Villeda, S.A., Akopians, A.L., Babayan, A.H., Basbaum, A.I., and Phelps, P.E. (2006). Absence of Reelin results in altered nociception and aberrant neuronal positioning in the dorsal spinal cord. *Neuroscience* *139*, 1385–1396.
- Vogel, C., Mössner, R., Gerlach, M., Heinemann, T., Murphy, D.L., Riederer, P., Lesch, K.-P., and Sommer, C. (2003). Absence of thermal hyperalgesia in serotonin transporter-deficient mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 708–715.

Volgin, D.V., Fay, R., and Kubin, L. (2003). Postnatal development of serotonin 1B, 2 A and 2C receptors in brainstem motoneurons. *Eur. J. Neurosci.* *17*, 1179–1188.

W

Walsh, M.A., Graham, B.A., Brichta, A.M., and Callister, R.J. (2009). Evidence for a critical period in the development of excitability and potassium currents in mouse lumbar superficial dorsal horn neurons. *J. Neurophysiol.* *101*, 1800–1812.

Wang, S., Lim, G., Zeng, Q., Sung, B., Ai, Y., Guo, G., Yang, L., and Mao, J. (2004). Expression of central glucocorticoid receptors after peripheral nerve injury contributes to neuropathic pain behaviors in rats. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 8595–8605.

Wang, Y.-Y., Wei, Y.-Y., Huang, J., Wang, W., Tamamaki, N., Li, Y.-Q., and Wu, S.-X. (2009). Expression patterns of 5-HT receptor subtypes 1A and 2A on GABAergic neurons within the spinal dorsal horn of GAD67-GFP knock-in mice. *J. Chem. Neuroanat.* *38*, 75–81.

Watanabe, M., Mishina, M., and Inoue, Y. (1994). Distinct spatiotemporal distributions of the N-methyl-D-aspartate receptor channel subunit mRNAs in the mouse cervical cord. *J. Comp. Neurol.* *345*, 314–319.

Wattiez, A.-S., Pichon, X., Dupuis, A., Hernández, A., Privat, A.-M., Aissouni, Y., Chalus, M., Pelissier, T., Eschalier, A., Marin, P., et al. (2013). Disruption of 5-HT_{2A} receptor-PDZ protein interactions alleviates mechanical hypersensitivity in carrageenan-induced inflammation in rats. *PloS One* *8*, e74661.

West, S.J., Bannister, K., Dickenson, A.H., and Bennett, D.L. (2015). Circuitry and plasticity of the dorsal horn – Toward a better understanding of neuropathic pain. *Neuroscience* *300*, 254–275.

Westerga, J., and Gramsbergen, A. (1990). The development of locomotion in the rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *57*, 163–174.

Westerga, J., and Gramsbergen, A. (1992). Structural changes of the soleus and the tibialis anterior motoneuron pool during development in the rat. *J. Comp. Neurol.* *319*, 406–416.

Woda, A., and Pionchon, P. (2001). [Orofacial idiopathic pain: clinical signs, causes and mechanisms]. *Rev. Neurol. (Paris)* *157*, 265–283.

Woodbury, C.J., and Koerber, H.R. (2003). Widespread projections from myelinated nociceptors throughout the substantia gelatinosa provide novel insights into neonatal hypersensitivity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 601–610.

Woodbury, C.J., Kullmann, F.A., McIlwraith, S.L., and Koerber, H.R. (2008). Identity of myelinated cutaneous sensory neurons projecting to nociceptive laminae following nerve injury in adult mice. *J. Comp. Neurol.* *508*, 500–509.

Woolf, C.J., and Ma, Q. (2007). Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron* *55*, 353–364.

Woolf, C.J., Shortland, P., and Coggeshall, R.E. (1992). Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* *355*, 75–78.

X

Xu, Y., Lopes, C., Wende, H., Guo, Z., Cheng, L., Birchmeier, C., and Ma, Q. (2013). Ontogeny of excitatory spinal neurons processing distinct somatic sensory modalities. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 14738–14748.

Y

Yaksh, T.L. (1989). Behavioral and autonomic correlates of the tactile evoked allodynia produced by spinal glycine inhibition: effects of modulatory receptor systems and excitatory amino acid antagonists. *Pain* *37*, 111–123.

Yaksh, T.L., 1999a. Central pharmacology of nociceptive transmission. In: Wall, P.D., Melzack, R. (Eds.), *Textbook of Pain*, 4th Edition. Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 253–308.

Yasaka, T., Kato, G., Furue, H., Rashid, M.H., Sonohata, M., Tamae, A., Murata, Y., Masuko, S., and Yoshimura, M. (2007). Cell-type-specific excitatory and inhibitory circuits involving primary afferents in the substantia gelatinosa of the rat spinal dorsal horn in vitro. *J. Physiol.* *581*, 603–618.

Yasaka, T., Tiong, S.Y.X., Hughes, D.I., Riddell, J.S., and Todd, A.J. (2010). Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach. *Pain* *151*, 475–488.

Yoshimura, M., and Jessell, T.M. (1989). Membrane properties of rat substantia gelatinosa neurons in vitro. *J. Neurophysiol.* *62*, 109–118.

Z

Zafra, F., Gomeza, J., Olivares, L., Aragón, C., and Giménez, C. (1995). Regional distribution and developmental variation of the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 in the rat CNS. *Eur. J. Neurosci.* *7*, 1342–1352.

Zeilhofer, H.U., Wildner, H., and Yébenes, G.E. (2012). Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiol. Rev.* *92*, 193–235.

Zhang, X., and Bao, L. (2006). The development and modulation of nociceptive circuitry. *Curr. Opin. Neurobiol.* *16*, 460–466.

Zhang, Y., Chen, Y., Liedtke, W., and Wang, F. (2015). Lack of evidence for ectopic sprouting of genetically labeled A β touch afferents in inflammatory and neuropathic trigeminal pain. *Mol. Pain* *11*, 18.

Zhao, C., Leitges, M., and Gereau, R.W. (2011). Isozyme-specific effects of protein kinase C in pain modulation. *Anesthesiology* *115*, 1261–1270.

Zigmond, M. (1999) *Fundamental Neuroscience*

Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* *16*, 109–110.

Résumé

Les premières semaines postnatales sont essentielles pour le développement de la sensibilité à la douleur et sont associées à une réorganisation structurelle et fonctionnelle des systèmes sensoriels. Les interneurons localisés dans la couche II interne (II_i) du sous noyau caudal du trijumeau (Sp5C), premier relai de l'information tactile et nociceptive orofaciale, sont des éléments clés des circuits responsables de l'allodynie mécanique orofaciale. L'objectif de ce travail de thèse est d'étudier le développement postnatal, à la fois morphologique (en utilisant l'immunohistochimie et l'analyse morphologique tridimensionnelle) et fonctionnel (enregistrements en patch-clamp sur tranches de Sp5C), de ces interneurons.

Nous nous sommes d'abord intéressés à une population très particulière d'interneurons de la couche II_i, qui expriment l'isoforme gamma de la protéine kinase C (PKC γ). Au stade le plus précoce de notre étude (3 jours postnataux, P3), les interneurons PKC γ sont présents dans toutes les couches superficielles sauf, précisément, la couche II_i. Ce n'est qu'à P6 que les premiers interneurons PKC γ peuvent être observés dans cette couche. Leur nombre y croît ensuite progressivement jusqu'à P11-15. A cet âge, leur nombre dans la couche II_i est quasiment identique à celui observé aux âges plus tardifs. De plus, nous montrons que cette augmentation du nombre d'interneurons PKC γ dans la couche II_i n'est liée ni à une prolifération cellulaire ni à l'arrivée progressive des fibres afférentes nociceptives dans le Sp5C.

Nous avons également étudié le développement des interneurons de la couche II_i dans leur ensemble. Ces neurones sont l'objet d'un grand nombre de changements morphologiques, aussi bien au niveau de leur soma (augmentation du volume) que de leurs neurites (augmentation de leur longueur combinée à une diminution de leur nombre et de leurs ramifications). Sur le plan fonctionnel, les neurones de la couche II_i, à la naissance, sont plus dépolarisés, ont une rhéobase plus basse – ils seraient donc plus excitables – et montrent plus fréquemment un profil de décharge avec un seul potentiel d'action, comparés aux mêmes interneurons chez l'adulte.

Toutes ces modifications structurelles et fonctionnelles des interneurons de la couche II_i du Sp5C pourraient contribuer au développement de la sensibilité orofaciale.

Abstract

The first postnatal weeks are pivotal for the development of pain sensitivity and are associated with structural and functional reorganization of sensory systems. Interneurons located in the inner part of lamina II (II_i) of the caudal trigeminal subnucleus (Sp5C), the first central node in orofacial tactile and nociceptive pathways, are key elements in circuits underlying the orofacial mechanical allodynia. The aim of this thesis is to study the morphological (by using immunohistochemistry and tridimensional morphological analysis) and functional (by using whole-cell patch-clamp recordings) postnatal development of these interneurons.

First, we looked at a very specific population of lamina II_i interneurons expressing the gamma isoform of the protein kinase C (PKC γ). At the earliest stage of our study (3 postnatal days, P3), PKC γ interneurons are present in all superficial layers but PKC γ interneurons can be observed in lamina II_i only at P6. The number of PKC γ interneurons within this lamina then increases gradually up to P11-15. At this age, the number of PKC γ interneurons in lamina II_i is almost the same as that at later ages. Interestingly, we show that neither cell proliferation nor the gradual projection of nociceptive fibers within the Sp5C accounts for such increase. We also studied the development of the whole population of lamina II_i interneurons. These interneurons undergo a large number of morphological changes, in their soma (increased volume) as well as neurites (concomitant increase in length and decrease in number and branching). Furthermore, according to electrophysiological properties, lamina II_i interneurons, at birth, are more depolarized, have a lower rheobase – suggesting that they are more excitable – and exhibit more frequently a single action potential discharge profile compared with mature ones.

All these structural and functional changes of lamina II_i interneurons might contribute to the development of orofacial sensitivity.

Mots clés: Sp5C, développement postnatal, électrophysiologie, morphologie, interneurons PKC γ

Key words: MDH, postnatal development, electrophysiology, morphology, PKC γ interneurons