



Encodage de l'information sensorielle nociceptive par la moelle épinière et son implication dans les douleurs neuropathiques et leur traitement

Thèse

Guillaume Lavertu

Doctorat en Neurobiologie
Philosophiae doctor (Ph.D.)

Québec, Canada

© Guillaume Lavertu, 2013

Résumé

Les douleurs neuropathiques sont une maladie qui a une forte prévalence dans notre société et malgré ceci leurs traitements sont généralement décevants. La cause principale de l'échec de notre pharmacologie moderne dans ce domaine est notre manque de connaissances sur le fonctionnement du système douloureux. Dans cette thèse, je me suis concentré sur un aspect de cette lacune : comment l'information nociceptive est-elle encodée par la moelle épinière avant d'être relayée au cerveau et comment cet encodage est-il altéré dans les douleurs neuropathiques ? Nos résultats démontrent qu'il y a deux types de neurones de projection spinothalamique (STT) qui encodent l'information nociceptive: les « wide dynamic range » (WDR) et les nociceptifs spécifiques (NS). Suite au développement des douleurs neuropathiques, seul le seuil d'activation des NS est altéré.

Grâce à cette caractérisation, il est possible de tester plusieurs pharmacologies afin de cibler les mécanismes potentiellement impliqués dans le développement des douleurs neuropathiques. Nous avons démontré que lorsque l'on bloque les canaux GABA_A et/ou glycine, on génère une diminution du seuil d'activation des NS-STT. Ces résultats confirment donc la participation de ces deux mécanismes inhibiteurs dans le développement de la pathologie. À l'inverse, nous avons aussi démontré que l'utilisation d'un nouveau composé, le CLP 257 (un activateur du KCC2), pouvait renverser l'hypersensibilisation dans notre modèle de douleurs neuropathiques en ramenant le seuil d'activation des NS à des valeurs physiologiques.

Une autre avenue de traitement intéressante serait de cibler directement les NS de projection et de normaliser leur réponse plutôt que de tenter de décortiquer chacun des changements survenant dans la moelle. Par contre, pour ce faire, il nous faut les identifier et déterminer s'ils ont des cibles pharmacologiques qui leur sont spécifiques. Certains outils doivent donc être mis en place. Nous avons créé une microsonde permettant de photoconvertir un marqueur fluorescent dans les cellules enregistrées pour les retrouver à posteriori. L'ensemble des résultats de cette thèse améliore notre compréhension du système douloureux, oriente les recherches futures sur le traitement des douleurs chroniques et apporte de nouvelles technologies de recherche.

Abstract

Neuropathic pain is a disease with a high prevalence in our society and despite this our treatments are generally disappointing at best. One of the main causes of the failure of our modern pharmacology for this treatment is our lack of understanding of how the pain system works. In this thesis I focused on one of these gaps: how nociceptive information is encoded by the spinal cord before being relayed to the brain and how this encoding is altered in neuropathic pain? Our results show that there are two types of projection neurons spinothalamic (STT) that encode nociceptive information: the wide dynamic range (WDR) and nociceptive specific (NS). Following the development of neuropathic pain only the activation threshold of the NS is altered.

With this characterization, it is possible to test several drugs to target potential mechanisms involved in the development of neuropathic pain. We have demonstrated that the block of GABA_A and/or glycine inhibitory channels decrease the activation threshold of NS-STT. These results confirm the involvement of these two inhibitory mechanisms in the development of this disease. On the other hand we have also demonstrated that the use of a new compound named CLP 257, an activator of KCC2, could reverse the hypersensitivity in our model of neuropathic pain by reducing the activation threshold of the NS-STT to physiological values.

Another potential avenue of treatment, rather than trying to dissect each change in the spinal cord, would be to directly target NS-STT and normalize their response. To do so, we must first identify them and determine if they have specific pharmacological targets and to do this some tools had to be developed. For this reason among others, we have created a microprobe which allows us to photoswitch fluorescently labeled cells after their electrophysiological recording to recover them afterwards.

The overall results of this thesis improve our understanding of the pain system, direct future research on the treatment of chronic pain and bring new research technologies.

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	iii
Table des matières	v
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations	xiii
Avant-Propos.....	xvii
Remerciements	xix
Chapitre 1 Introduction générale	1
L'importance de la perception de la douleur.....	2
Douleur/nociception introduction.....	3
Types de douleur	5
Études humaines.....	14
Études animales.....	15
Modèle animal de douleur neuropathique	22
L'organisation du réseau nociceptif	25
Organisation des neurones d'afférences primaires.....	26
Organisation de la moelle épinière	31
Organisation des voies de projection.....	50
Organisation au niveau du cerveau.....	53
Encodage spinal de la nociception	56
Théories sur les causes des douleurs neuropathiques.....	61
Objectifs de la thèse.....	66
Objectif général	66
L'orientation des questionnements.....	66
Objectifs spécifiques des différents chapitres	68
Chapitre 2 Enhancing K ⁺ -Cl ⁻ -cotransport restores normal encoding within the spinothalamic tract in a model of neuropathic pain.....	73
Résumé	74

Abstract.....	75
Introduction.....	75
Results.....	76
Discussion.....	83
Methods.....	86
ACKNOWLEDGEMENTS.....	90
Figures.....	91
Figure 4. Pharmacological disinhibition replicates the signature of changes produced by nerve injury in STT neurons.	95
Figure 5. Negative and positive modulation of Cl ⁻ transport respectively replicates and rescues change in NS-STT response threshold.....	97
Supplementary Data.....	100
Chapitre 3 Chloride extrusion enhancers as novel therapeutics	103
Résumé.....	104
Abstract.....	105
Results.....	105
Discussion.....	109
Methods.....	110
Figures.....	118
Supplementary Data.....	125
Chapitre 4 Monostructure microprobe for parallel optical and electrical recordings from single neurons <i>in vivo</i>	133
Résumé.....	134
Abstract.....	135
Introduction.....	135
Results.....	137
Discussion.....	143
Acknowledgements.....	144
Author Contributions	144

Online Methods	160
Supplementary Data	166
Chapitre 5 A multimodal micro-optrode combining field and single unit recording, multispectral detection and photolabeling capabilities.....	175
Résumé	176
Abstract.....	177
Introduction	177
Materials and Methods	178
Results	183
Discussion.....	186
Figures	189
Acknowledgment.....	195
Chapitre 6 Discussion générale	197
Récapitulation.....	198
Vers une identification des nociceptifs spécifiques.....	200
Questions qui restent en suspens	207
Potentiel thérapeutique important.....	217
Conclusion.....	220
Bibliographie	221

Liste des figures

<i>Figure 1 Représentation simplifiée du parcours de l'information nociceptive dans le corps humain. (von Hehn CA et al., 2012)</i>	3
<i>Figure 2 : Représentation de la perception d'une douleur nociceptive (modifiée (Costigan et al., 2009))</i>	6
<i>Figure 3 : Représentation de la perception d'une douleur inflammatoire (modifiée (Costigan et al., 2009))</i>	7
<i>Figure 4 : Représentation des trois principales hypothèses pour expliquer la sensibilisation centrale</i>	8
<i>Figure 5 : Représentation de la perception d'une douleur neuropathique (modifiée (Costigan et al., 2009))</i>	9
<i>Figure 6 : Représentation de la complexité et de la variabilité dans les douleurs neuropathiques (von Hehn CA et al., 2012)</i>	10
<i>Figure 7 : Nouvelles et anciennes définitions de l'allodynie et de l'hyperalgésie (modifiée (Sandkuhler, 2009))</i>	12
<i>Figure 8 : Exemple de résultats classiques d'un test de seuil de retrait de la patte avec comparaison d'une valeur contrôle et d'un modèle de lésion de nerf (PNI)</i>	18
<i>Figure 9 : Exemple de résultats d'un test de distribution pondérale « Weight bearing » (Rivat et al., 2008)</i>	19
<i>Figure 10 : Test de lieu de préférence conditionnelle pour l'étude des douleurs spontanées (King et al., 2009a)</i>	21
<i>Figure 11 : Représentation des différents types de lésion de nerfs utilisés comme modèles de douleur neuropathique (Decosterd and Derta, 2008).</i>	25
<i>Figure 12 : Propriétés des différents types de fibres d'afférence primaire. (modifié (Julius and Basbaum, 2001))</i>	28
<i>Figure 13 : Différents types de récepteurs sensibles à l'environnement sur les neurones d'afférence primaire (Patapoutian et al., 2009)</i>	29
<i>Figure 14 : Exemple de décharge ectopique des fibres Aβ (Amir et al., 2002)</i>	31

<i>Figure 15 : Représentation des sites de connexion par les différents types de fibres d'afférence primaire (Todd, 2010).</i>	32
<i>Figure 16 : Différents sites de projection des différents types de fibre selon leurs marqueurs neuronaux (Ringkamp and Meyer, 2008).</i>	33
<i>Figure 17 : Morphologie des différents neurones de la lamina I de la moelle épinière (Prescott and De Koninck, 2002).</i>	34
<i>Figure 18 : Différents patrons de décharge des neurones des couches superficielles de la moelle épinière (Prescott and De Koninck, 2002).</i>	35
<i>Figure 19 : Morphologie des cellules de la lamina II (Todd and Spike, 1993).</i>	36
<i>Figure 20 : Modèle du réseau neuronal de la corne sensorielle créé à partir des données de la littérature actuelle (Ribeiro-Da-Silva and De Koninck, 2008).</i>	37
<i>Figure 21 : Effet différentiel des différentes sous-unités GABA_A (Zeilhofer et al., 2009).</i>	45
<i>Figure 22 : Visualisation de la distribution des neurones GABAergique et glycinergique dans la corne dorsale de la moelle épinière.</i>	47
<i>Figure 23 : Schématisation de l'effet d'une augmentation de l'activité du NKCC1 dans les neurones d'afférences primaires dans l'inflammation. (Price 2005)</i>	49
<i>Figure 24 : Régions corticales impliquées dans la perception de la douleur (Apkarian et al., 2005).</i>	54
<i>Figure 25 : Schéma représentant la complexité des différents éléments modulant la nociception, affectant ainsi la perception de la douleur (Millan, 2002).</i>	56
<i>Figure 26 : Schéma de la théorie du portillon (Melzack and Wall, 1965).</i>	57
<i>Figure 27 : Schématisation de la potentialisation à long terme (LTP) comme hypothèse expliquant l'allodynie et l'hyperalgésie (Sandkuhler, 2009).</i>	62
<i>Figure 28 : Schématisation sur la désinhibition comme hypothèse expliquant l'allodynie et l'hyperalgésie (Labrakakis et al., 2011).</i>	63
<i>Figure 29 : Vulgarisation des différentes avancées sur le KCC2 et son implication dans les douleurs neuropathiques (Labrakakis et al., 2011).</i>	65
<i>Figure 30 Réseau neuronal simplifié utilisant les conclusions de cette thèse.</i>	200
<i>Figure 31 : Spectre d'émission des différents marqueurs inorganique classique (invitrogen).</i>	203

<i>Figure 32 : Effet de la photoconversion de DiD au niveau du site d'injection.....</i>	204
<i>Figure 33 : Effet de la photoconversion de DiD au niveau de neurones individuels.</i>	204
<i>Figure 34 : Effet de la pression appliquée sur le nombre de mouvements de tête.....</i>	211
<i>Figure 35 : Effet de l'inhibition des neurones STT par l'allatostatine.</i>	216

Liste des abréviations

[Cl ⁻] _i	Concentration intracellulaire d'ions chlorures
[K ⁺] _e	Concentration extracellulaire d'ions potassiques
Al	Aluminium
AMPA	Alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionate
ARA-C	Cytosine arabinofuranoside
ATP	Adénosine triphosphate
BDNF	Facteur neurotrophique dérivé du cerveau
cAMP	Adénosine monophosphate cyclique
CamKII	Protéine kinase Ca ²⁺ /calmoduline-dépendente II
CCI	Modèle de lésion de nerf par constriction chronique
ChR2-	Channelrhodopsin
CGRP	Peptide relié au gène de la calcitonine
cRNA	ARN complémentaire
Da	Dalton
DC	Courant direct
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DRG	Ganglions de la racine dorsale
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EGFP	Protéine fluorescente verte amplifiée
EPSC	Courant excitateur postsynaptique
FMRI	Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
FRET	Fréquence de résonance du transfert d'énergie
FWHM	Moitié de la largeur maximale
GABA	Acide γ-aminobutyrique
GAD65	Décarboxylase de l'acide glutamique 65
GAD67	Décarboxylase de l'acide glutamique 67

GIRK	Protéine G couplée à un canal générant un courant potassique rectifiant
GluR	Récepteur glutamatergique
HEK	Cellule dérivée de tissus embryonic humain
HPC	Neurones réagissant aux stimuli thermiques et mécaniques
Hz	Hertz
IASP	Association international sur l'étude de la douleur
IB4	Anticorps anti isolectine B4
IgG	Immunoglobuline G
IP	Voie d'injection intrapérionéale
KA	Kainite
KCC2	Cotransporteur Potassium-Chlore 2
LT/LTM	Neurone réagissant à de faible seuil mécanique
LTD	Dépression à long-term
LTP	Potentialisation à long-term
mEOS2	Protéine photoactivable
mEPSC	Courant excitateur postsynaptique miniature
mIPSC	Courant inhibiteur postsynaptique miniature
mGluR	Récepteur glutamatergique métabotrope
MΩ	Mega Ohm
NaV1.7,	Canal sodique de type 1.7
NEW	Nouvelle classe neuronale de nociceptif spécifique hypersensibilisé
NG	Cellules en culture dérivées de neuroblastes
NGF	Facteur de croissance neuronale
NKCC1	Cotransporteur sodium–potassium-chlore 1
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NN	Neurone non nociceptif
NS	Neurone nociceptif spécifique
MQAE	N-6-methoxyquinolinium acetoethylester
P2X4	Récepteur purinergique 4
PAG	Substance grise périaqueducule

Per os	Voie d'administration orale
PGE2	Prostaglandines E2
PLC γ	Phospholipase C gamma
PMT	Tube photomultiplicateur
PSL	Modèle de lésion de nerf par ligature partielle du nerf sciatique
ROI	Région d'intérêt
RMS	Moyenne quadratique
S/N	Ratio signal sur bruit
SNI	Modèle de lésion de nerf épargné
SNL	Modèle de lésion de nerf par ligature
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
STT	Neurone de projection spinothalamique
t1/2	Demi-vie biologique
TACO	Tomographie axiale calculée par ordinateur
Thy1	Précurseur antigène de différenciation thymocyte 1
TrkB	Tyrosine kinase B
TRP	Recepteur à potentiel transitoire
UV	Ultraviolet
VPM	Ventre postéro médian
VPL	Ventre postéro latéral
W	Watt
WDR	Neurone à large gamme de réponse
YFP	Protéine fluorescente jaune

Avant-Propos

La présente thèse est écrite sous forme d'insertion d'articles. Les résultats présentés dans les chapitres 2 et 3 sont composés de textes et figures de manuscrits soumis pour publication. Les chapitres 4 et 5 sont composés de matériel publié. La contribution de chacun des auteurs va comme suit :

Chapitre 2 : Enhancing K^+ - Cl^- -cotransport restores normal encoding within the spinothalamic tract in a model of neuropathic pain. **Guillaume Lavertu**, Sylvain L. Côté, Yves De Koninck

Pour cette étude, j'ai effectué toutes les expériences électrophysiologiques et pharmacologiques ainsi que l'ensemble des analyses statistiques. Sylvain L. Côté m'a aidé à l'automatisation de certaines analyses et il m'a aidé dans l'interprétation de certains résultats. J'ai composé l'ensemble des figures et écrit le texte sous la supervision de mon directeur de recherche Yves De Koninck.

Chapitre 3 : Chloride extrusion enhancers as novel therapeutics. Authors: Martin Gagnon, Annie Castonguay, **Guillaume Lavertu**, Marc Bergeron, Karine Bachand, Christian Tardif, Mariève Jacob-Wagner, Jeffrey Coull, Paul Isenring, Giorgio Attardo, Yves De Koninck

Pour cette étude, j'ai effectué toutes les expériences électrophysiologiques de champs avec les tests pharmacologiques *in vivo*. Les expériences de biochimie ont été effectuées par Martin Gagnon, Marc Bergeron, Mariève Jacob-Wagner, Jeffrey Coull, Paul Isenring, Giorgio Attardo. Les tests comportementaux ont été faits par Karine Bachand et les tests d'extrusion des ions chlorure ont été réalisés par Annie Castonguay et Christian Tardif. Au niveau de l'écriture de l'article, j'ai rédigé le texte et composé les figures qui concernent

les tests électrophysiologiques *in vivo* et la majorité du papier a été écrit par Martin Gagnon et Yves De Koninck.

Chapitre 4 : Monostructure microprobe for parallel optical and electrical recordings from single neurons *in vivo*. Yoan LeChasseur, **Guillaume Lavertu***, Suzie Dufour*, Cyril Bories, Martin Deschênes, Réal Vallée, Yves De Koninck. * Ces auteurs ont participé à contribution égale au manuscrit.

Pour cette étude, j'ai effectué les expériences électrophysiologiques *in vivo* chez le rat. La conception de la microsonde a été faite par Yoan LeChasseur, Suzie Dufour, Réal Vallée et Yves De Koninck. Suite à la conception, Yoan LeChasseur, Suzie Dufour et moi avons optimisé l'efficacité de la microsonde. Les expériences de photostimulation et de mesure de calcium ont été faites par Suzie Dufour. J'ai analysé les différents résultats des expériences électrophysiologiques avec Suzie Dufour. L'ensemble des auteurs ont participé à la rédaction du manuscrit.

Chapitre 5: A multimodal micro-optrode combining field and single unit recording, multispectral detection and photolabeling capabilities. Suzie Dufour, **Guillaume Lavertu**, Sophie Dufour Beauséjour, Alexandre Juneau Fecteau, Nicole Calakos, Martin Deschênes, Réal Vallée, Yves De Koninck.

Pour cette étude, ma participation a été principalement concentrée au niveau des expériences de photoconversion et sur l'analyse des différentes données électrophysiologiques. Les expériences de détection multispectrale et de champ électrique ont été faites par Suzie Dufour, Sophie Dufour Beauséjour, Alexandre Juneau Fecteau. La professeure Nicole Calakos a fourni la souris transgénique *Drd1a-tdTomato/Drd2-EGFP*. Le manuscrit a été écrit en majeure partie par Suzie Dufour et Yves De Koninck, avec la contribution de Martin Deschênes, Réal Vallée et moi-même.

Remerciements

Avec les années, j'en suis venu à réaliser qu'une thèse de doctorat, c'est comme un marathon. Au début, on est frais et plein d'énergie, ce qui nous donne l'impression qu'on peut déplacer des montagnes. On se dit que finalement, tous ceux qui ont dit que c'était dur avaient sûrement tort. En avançant dans notre projet, on comprend mieux ce que les autres disaient et on se rend compte que notre beau parcours sans obstacles tel qu'idéalisé au début est plus complexe que prévu (manip supplémentaire), écriture d'article, manip supplémentaire, soumission, manip supplémentaire, révision, manip supplémentaire, re-soumission,.... manip supplémentaire.). Comme dans un marathon, à un moment donné (idéalement pas trop loin de la fin) l'énergie n'y est plus et chacun des pas vers l'avant est un défi. Par contre, à un moment on voit la ligne d'arrivée (la fin de la thèse) se profiler au loin et heureusement, cela insuffle un deuxième souffle qui nous permet de finir notre course (thèse). Pour tous ceux qui lisent cette thèse et qui sont dans la phase difficile du marathon ... je vous encourage, ne lâchez pas ... votre fil d'arrivée approche.

Je m'en voudrais de ne pas remercier les gens qui, tout au long de mon marathon, étaient là pour m'aider en me tendant des bouteilles d'eau « aide » et en me donnant des encouragements « conseils » dans ma course. (Fin de la métaphore)

Premièrement, je voudrais remercier mon directeur de recherche Dr. Yves De Koninck. Yves je sais que cela n'a pas du toujours été facile de contenir le gars d'action que je suis, qui veut toujours avancer plus vite et qui meurt dans l'inaction, merci de ta patience. Je te remercie aussi de la confiance et de la latitude que tu m'as laissée durant toutes ces années. En y repensant, je te revois me donner ton appui pour plusieurs de mes projets secondaires, parfois saugrenus, alors que tu savais d'avance que certains d'entre eux étaient voués à l'échec, mais aussi que ces échecs et cette liberté créatrice me seraient bénéfiques. Merci à celui que j'ai souvent appelé mon papa scientifique, grâce à qui j'ai grandi comme scientifique et qui m'a beaucoup appris et influencé. Pour citer certaines de tes expressions favorites Yves, tu as été plus que « sufficient to explain » la réussite de mon doctorat, on pourrait même dire que tu as été un des « substrate » « underlying » ma réussite.

Merci aussi à Cyril Bories, que certains ont cru greffé à la chaise dans mon bureau tant il y a passé du temps, qui fut d'une aide immense sur le plan scientifique : si Cyril l'a déjà vu quelque part, c'est certain qu'il s'en souvient (tellement que ç'en est parfois frustrant) !! Pour toutes nos discussions scientifiques sur nos projets respectifs et sur d'autres domaines, parfois loin de la neurobiologie et surtout, pour son amitié.

Merci aussi à Sylvain Côté, mon plus coriace « reviewer » qui m'a toujours poussé à l'amélioration, autant celle de ma recherche que du scientifique derrière. J'ai aimé nos discussions, même si elles étaient parfois très enflammées (la bonne recherche ne se fait que comme ça tu disais), et j'admets même avoir aimé ton éternel scepticisme et ton pessimisme, car c'était à chaque fois un bon défi de te convaincre (parfois mission impossible, mais qu'est la vie sans défis?). Je te remercie aussi pour ton aide dans mon projet ; sans toi, je serais encore en train d'analyser mes données manuellement, comme un homme des cavernes (!). J'ai toujours considéré qu'un vrai chum te dit les choses que tu as besoin d'entendre et pas celles que tu veux entendre, et c'est comme ça que tu as toujours agi, pour ça merci.

Merci à Karine Bachand, celle avec qui j'ai commencé dans le labo de Yves, qui m'a montré en tant que petit stagiaire d'été comment faire les injections stéréotaxiques et avec qui j'ai travaillé pendant 7 ans par la suite. Merci Karine pour tout le travail que tu as fait pour que je puisse finir cette thèse, et aussi pour avoir embarqué dans tous mes projets parallèles et y avoir investi toi aussi du temps. Merci pour la centaine de cuffs, la centaine d'injections, mais surtout pour ton support.

Merci aussi à l'ensemble de notre gros laboratoire, les membres présents et passés: Charalampos, Karen, Sophie, Dominic, Yoan, Suzie, Marc, Louis-Etienne, Modesto, César, Annie, Harold, Gabrielle, Rob, Feng, Jimena. Merci aussi au docteur Martin Deschênes, sa porte toujours ouverte pour les questions de dernière minute m'a été souvent d'un grand aide.

Hors laboratoire, un immense merci à ma femme Claudine qui doit être une des 10 personnes au monde qui connaissent le mieux l'encodage nociceptif des neurones STT dans la moelle épinière du rat à force d'en entendre parler plusieurs fois par semaine. Merci, Clau pour toute l'aide et la compréhension que tu m'as apportées. Merci aussi à mes deux enfants Louis-Félix et Mathieu qui en fin de course m'ont permis de raligner mes priorités de vie.

Merci aussi à tous ceux que j'oublie dans ce texte que j'ai côtoyé et qui m'ont influencé durant ces années.

MERCI

Chapitre 1

Introduction générale

L'importance de la perception de la douleur

La douleur est un mécanisme de défense très important pour la survie d'un individu et cette protection se situe à plusieurs niveaux. Le plus évident est celui de prévenir l'organisme en cas de danger, ou forcer celui-ci à s'éloigner de ce danger dans le cas du réflexe. L'absence de cette protection, comme il a été vu dans des cas de maladie génétique rare, est souvent associée avec de nombreuses lésions graves qui auraient normalement été évitées ou grandement diminuées avec une perception douloureuse normale (Goldberg et al., 2007).

Un autre niveau de protection est le facteur motivationnel de la douleur. La peur d'avoir mal est un motivateur puissant dans la prise de décision. Encore une fois, ceci a été tristement démontré chez les personnes n'ayant aucune de perception douloureuse (Goldberg et al., 2007) qui meurent beaucoup plus fréquemment que les autres de causes qui peuvent sembler absurdes ou suicidaires. La peur de se blesser et d'avoir mal nous influence à faire des choix plus sécuritaires.

Une autre fonction de la perception de la douleur est de forcer l'organisme à se reposer ou préserver une région blessée pour lui permettre une bonne guérison. Encore une fois, les personnes ne percevant pas la douleur ont souvent des complications graves, car ils n'ont pas protégé leurs membres en guérison. Un exemple frappant de ceci est la fréquence des difformités au niveau des os causés par des fractures qui n'ont pas été traitées dans les maladies génétiques affectant la perception douloureuse (Dimon et al., 1965).

À cause de tous ces éléments, je considère comme plusieurs la perception douloureuse comme un sens en soi, un sixième sens avec une fonction de protection ou d'aide à la survie.

Douleur/nociception introduction

L'élément le plus important que l'on doit toujours garder en tête est le fait que la douleur n'est que la résultante d'un long processus de transmission et d'intégration d'un type d'information spécialisé dans la protection de l'intégrité du corps. Pour faire un rapide survol du système que je décrirai plus en détail dans ma thèse, prenons un exemple classique de douleur : le coup de marteau donné par erreur sur un doigt. Lorsque le marteau frappe le doigt, les neurones d'afférences primaires qui l'innervent réagissent et transmettent l'information à la corne dorsale de la moelle épinière. Au niveau de cette dernière, une première étape d'intégration de l'information survient avant que ce message encodé soit envoyé aux aires supérieures. Au niveau des aires supérieures, plusieurs régions sont impliquées dans l'intégration et l'interprétation de ces données encodées et c'est seulement suite à l'interprétation faite par le cerveau que l'on parle de douleur ; toutes les étapes précédant cette interprétation sont décrites comme de la nociception. (Fig 1)

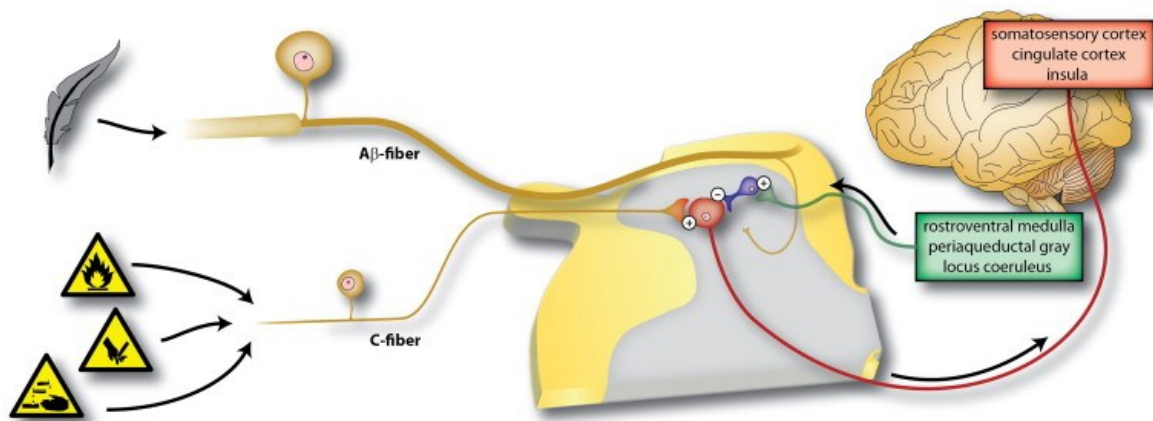


Figure 1 Représentation simplifiée du parcours de l'information nociceptive dans le corps humain. (von Hehn CA et al., 2012)

Pendant longtemps, on a cru que la douleur n'était qu'une version extrême d'un type sensoriel. Par exemple, le coup de marteau n'était que l'activation extrême d'une voie tactile ou une brûlure n'était qu'une activation excessive d'une voie de sensorielle thermique. Cette version simplifiée ne tient plus la route, car plusieurs études ont clairement démontré la présence de composantes spécialisées qui servent uniquement à la

douleur/nociception (Szallasi et al., 2007), démontrant que la douleur/nociception possède un système sensoriel dédié et qu'elle ne nécessite pas automatiquement une autre voie sensorielle « classique » (tactile, thermique, etc.). Par contre, encore aujourd'hui les frontières restent floues entre le système nociceptif et le système sensoriel (tactile et thermique), car même s'il s'agit de systèmes différents, certaines études parlent aussi de voies communes entre les deux (Dubner et al., 1989; Chung et al., 1986).

Peu importe comment l'information est acheminée au cerveau, la douleur demeure complexe et ce n'est pas seulement une expérience sensorielle. Il a été démontré que la douleur est modulée par de nombreux facteurs autres que l'intensité du stimulus. Selon l'association internationale sur l'étude de la douleur (IASP) la douleur est décrite comme *«une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à un dommage tissulaire existant ou potentiel ou décrite en terme d'un tel dommage»*. La douleur est donc une expérience s'articulant autour de quatre composantes fondamentales (Calvino, 2006) :

- Sensori-discriminative, qui peut être décrite comme les informations de la stimulation (localisation, intensité, durée et qualité)
- Affective et émotionnelle (côté désagréable, agaçant, pénible, etc.)
- cognitive (reliée à d'autres systèmes comme la mémoire, l'attention et l'anticipation)
- comportementale (la notion de réaction, mouvement, vocalisation, retrait, etc.)

Cette classification est aisément décrite en mots lorsqu'on analyse nos différentes expériences de douleur. Toutefois, les mécanismes derrière chacune de ces classes et les liens qu'il y a entre elles sont encore méconnus et semblent très complexes.

Types de douleur

Physiologique

Lorsqu'on observe un proche en douleur, il est facile d'oublier que l'abolition totale de sa douleur ne serait qu'avantageuse à court terme et que la douleur est, dans la grande majorité du temps, utile à l'organisme. Son rôle protecteur apparaît évident lorsqu'on considère les très rares cas familiaux de mutation génétique (principalement observée au niveau de certains canaux ioniques liés à la douleur, ex : NaV1.7, TRPV1) affectant la capacité de percevoir les douleurs. Privés de ce mécanisme de protection, les infortunés membres de ces familles ont souvent de nombreuses cicatrices et des vestiges de blessures ou de brûlures. Dans certains cas extrêmes, les personnes n'ayant jamais ressenti de douleur n'ont jamais eu la « peur d'avoir mal » qui influence les décisions chez la majorité des gens. Ces personnes ont tendance à se mettre dans des situations dangereuses et leur espérance de vie en est réduite. Par exemple, un enfant du Pakistan qui avait une de ces mutations est mort avant l'âge de 14 ans suite à un saut du haut d'un immeuble, après une longue série d'actions dangereuses. (Cox et al., 2006; Cregg et al., 2010)

Douleur nociceptive

La douleur aiguë, physiologique ou nociceptive est un mécanisme de protection qui informe l'organisme d'un danger que les autres sens n'avaient peut-être pas remarqué. Ce type de douleur « normale » répond uniquement aux stimuli douloureux (*Figure 2*) Cette douleur peut même affecter d'autres systèmes comme le système moteur, sans la participation des aires supérieures, permettant de générer une réaction de retrait pour se protéger (le réflexe). Elle est aussi nommée douleur nociceptive, car elle permet d'évader ou de réduire notre contact avec des stimuli nocifs pour l'organisme. Au niveau médical, ce type de douleur est le mieux traité et une panoplie d'analgésiques locaux ou généraux sont disponibles. Malgré le fait que ces médicaments sont utilisés depuis des centaines d'années, la classe des opiacés demeure le cheval de bataille le plus efficace et le plus utilisé pour le traitement de la douleur aiguë.

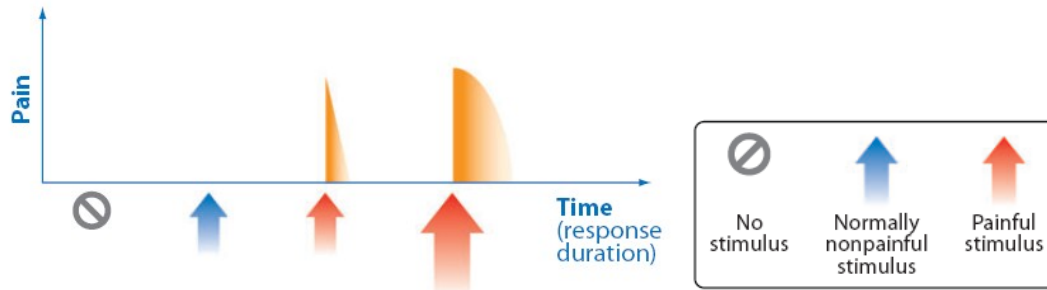


Figure 2 : Représentation de la perception d'une douleur nociceptive (modifiée (Costigan et al., 2009))

Douleur inflammatoire

La douleur inflammatoire est aussi un mécanisme physiologique de protection, mais celui-ci est plus souvent impliqué dans le mécanisme de guérison d'une lésion. Si une blessure n'a pas pu être évitée par la protection du système de douleur nociceptive, la douleur inflammatoire prend le relais pour favoriser le rétablissement de l'organisme. Suite à une lésion, il y a développement d'une inflammation locale autour de la blessure. Cette inflammation est provoquée par une batterie de facteurs endogènes libérés à la fois par des neurones nociceptifs locaux, mais aussi par des cellules non neuronales résidentes ou qui s'infiltrent autour de la lésion (incluant les mastocytes, les basophiles, plaquettes, macrophages, neutrophiles, cellules endothéliales, kératinocytes et fibroblastes). Toutes ces cellules produisent un ensemble de facteurs souvent appelé « soupe inflammatoire » composée de neurotransmetteurs, peptides (substance P, bradykinine, Calcitonin gene-related peptide (CGRP)), lipides (prostaglandines, thromboxanes, leucotriènes, les endocannabinoïdes), cytokines, chimiokines, protéases et protons (Basbaum et al., 2009). Ce cocktail de substances provoque une hypersensibilité locale qui décourage les contacts ou les mouvements de cette région du corps afin de permettre une guérison plus rapide de la lésion (*Figure 3*) (Woolf and Salter, 2000). Une autre composante de l'inflammation, autre que celle périphérique décrite plus haut, est la composante centrale qui partage un grand nombre de médiateurs avec celle périphérique (substance P, Calcitonin gene-related

peptide (CGRP), ATP etc.). Cette composante centrale de l'inflammation est principalement générée par une entrée massive d'influx nociceptifs provenant des fibres nociceptives au niveau de la moelle épinière. Cette stimulation participe à plusieurs mécanismes de sensibilisation au niveau de la moelle épinière dorsale qui sont résumés plus loin (*Figure 4*) (Basbaum et al., 2009). Certains de ces mécanismes sont communs à ceux liés à l'apparition des douleurs chroniques. Le point important à noter est qu'au niveau des douleurs inflammatoires, la sensibilisation devrait se résorber dans le temps avec la guérison de la lésion l'ayant induite.

Encore une fois, une mutation empêchant cette hypersensibilité provoque de graves problèmes pour le rétablissement. Par exemple, une personne peut mettre trop de poids sur une jambe cassée, empêchant les os de se ressouder correctement (Cox et al., 2006; Cregg et al., 2010).

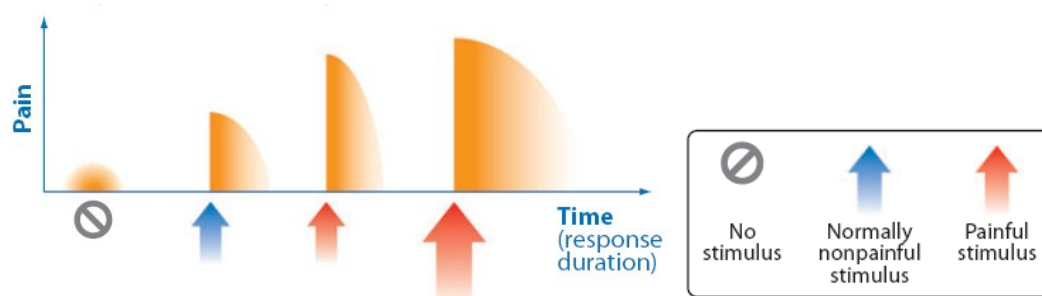


Figure 3 : Représentation de la perception d'une douleur inflammatoire (modifiée (Costigan et al., 2009))

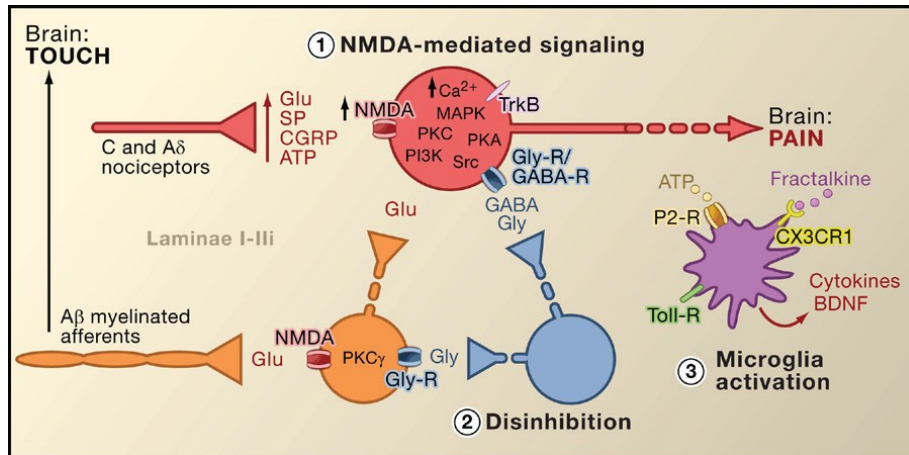


Figure 4 : Représentation des trois principales hypothèses pour expliquer la sensibilisation centrale

1- Une amplification des entrées excitatrices 2- Une désinhibition des mécanismes d'inhibitions 3- Une activation microgliale générant une hypersensibilisation (Basbaum et al., 2009)

Pathologique

Neuropathique

Lorsque la douleur perd sa fonction protectrice et devient néfaste, on parle de « douleur pathologique ». De la même manière que le système immunitaire perd sa fonction de protection et se retourne contre l'organisme dans le cas des maladies auto-immunes, les douleurs pathologiques peuvent être considérées comme un état « malade » du système de perception de la douleur. Souvent, deux paramètres sont à considérer pour le passage d'une douleur physiologique à celle d'une douleur pathologique: la durée et l'irréversibilité de celle-ci. Par exemple, suite à une blessure importante, une douleur inflammatoire de quelques semaines est normale ; cela devient inquiétant si celle-ci est toujours présente 6 mois plus tard, alors que la blessure est guérie. La prévalence de ce problème médical est

très forte et ces cas de douleur neuropathique s'ajoutent à ceux provoqués par plusieurs autres maladies (zona, cancer, fibromyalgie, etc.). On estime que la prévalence des douleurs neuropathiques dans la population générale peut aller jusqu'à 5 % (Daousi et al., 2004) et un quart de ces cas sont plus sévères (McDermott et al., 2006; Baron, 2008). Les douleurs pathologiques altèrent considérablement la qualité de la vie des patients, en plus d'avoir un impact économique important sur la société (Smith and Torrance, 2012).

Traditionnellement, l'association internationale sur l'étude de la douleur (IASP) décrivait les douleurs neuropathiques comme « une douleur initiée ou causée par une lésion primaire ou une dysfonction du système nerveux ». Par contre, une nouvelle définition a été avancée en 2008, définissant la douleur neuropathique comme « une douleur qui est la conséquence directe d'une lésion ou maladie affectant le système somatosensoriel » (Treede et al., 2008). Peu importe la définition utilisée la douleur neuropathique s'accompagne de douleurs similaires, mais souvent plus importantes, aux douleurs inflammatoires et ceux-ci sont présentes à plus long terme (*Figure 5*).

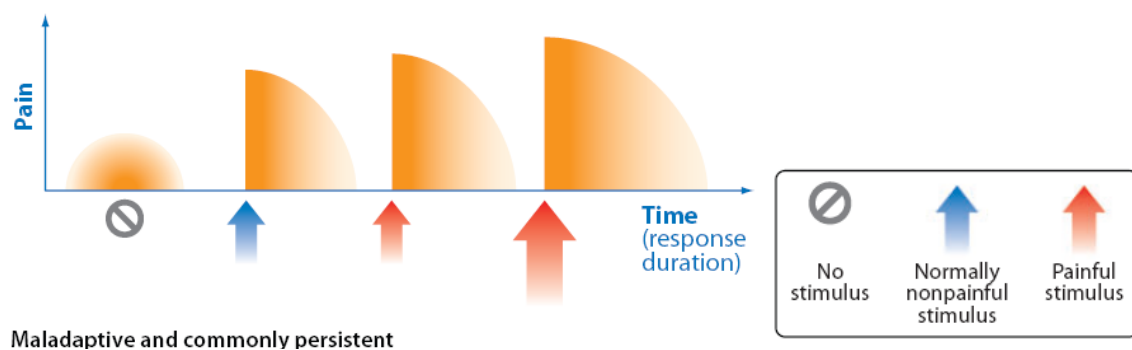


Figure 5 : Représentation de la perception d'une douleur neuropathique (modifiée (Costigan et al., 2009))

Au point de vue diagnostique, peu importe laquelle de ces définitions est utilisée puisque les deux décrivent un problème au niveau du système nerveux (somatosensoriel ou autre). Le problème lorsqu'on tente de décrire ou de caractériser les douleurs neuropathiques est que la source de celles-ci peut se localiser un peu partout sur le corps et semble pouvoir découler de nombreuses causes. C'est pourquoi de nombreuses maladies cliniques peuvent

s’y greffer, comme la fibromyalgie, la sclérose en plaques, le zona, les douleurs du bas du dos, le diabète, etc. Normalement, le diagnostic clinique tente en premier lieu de déterminer l’origine de ces douleurs, mais jusqu’à très récemment, cette étape marquait la fin du diagnostic et aucune analyse du mécanisme neuronal impliqué n’était faite. Comme les douleurs neuropathiques sont très hétérogènes, on tente maintenant d’établir « l’empreinte digitale » de la douleur en fonction de facteurs étiologiques, génétiques, environnementaux ainsi que les processus neurobiologiques impliqués. (von Hehn CA et al., 2012) (Figure 6)

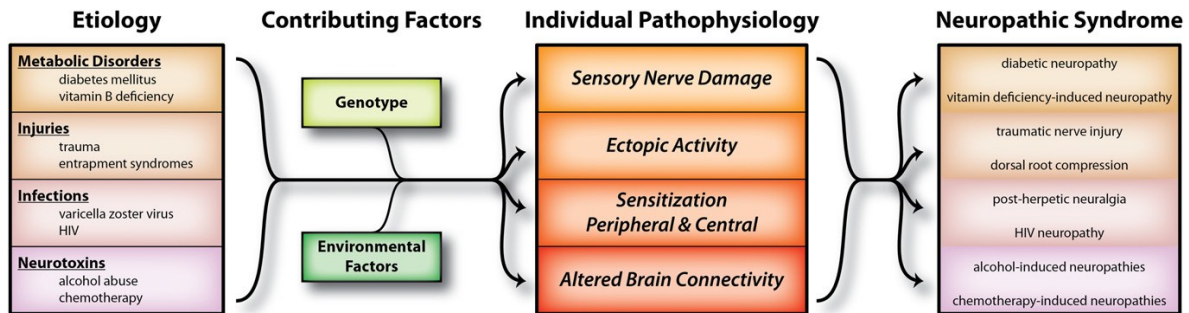


Figure 6 : Représentation de la complexité et de la variabilité dans les douleurs neuropathiques (von Hehn CA et al., 2012)

Souvent, la première grande classification utilisée est celle de l’origine de l’atteinte du système nerveux en fonction du site de lésion. Il y a des douleurs neuropathiques dites du système nerveux périphérique (SNP) : traumatisme mécanique, brûlure, agent chimique, infection, tumeur, etc. Elles s’opposent aux douleurs neuropathiques du système nerveux central (SNC), qui sont plus souvent associées à une blessure au niveau de la moelle épinière ou à un accident cérébral vasculaire. (Woolf and Mannion, 1999; Ducreux et al., 2006).

Malgré cette hétérogénéité, les symptômes majeurs associés aux douleurs neuropathiques peuvent être regroupés en trois catégories, soit l'allodynie, l'hyperalgésie et les douleurs spontanées (décrites en détail dans les prochains paragraphes).

Allodynie

L'allodynie est définie comme une perception douloureuse à un stimulus normalement non douloureux. Celle-ci peut survenir dans une situation physiologique, comme lorsqu'on touche une blessure récente, ou dans une condition pathologique, comme dans le cas des douleurs neuropathiques. Pour expliquer l'allodynie aux patients atteints de douleurs neuropathiques, on utilise souvent l'exemple d'une perception de douleur en réponse à une douce caresse.

Une nouvelle définition a été avancée par l'IASP pour décrire l'allodynie, mais celle-ci n'est pas encore bien acceptée par l'ensemble de la communauté scientifique. Les changements apportés décrivent l'allodynie comme une perception douloureuse suite à une activation des fibres non douloureuse ($A\beta$ ou $A\delta$ et C à faible seuil d'activation). Ce que la communauté scientifique reproche à cette définition, c'est l'*a priori* qu'elle apporte quand à l'origine du symptôme. Bien sûr, d'après la littérature, il y a de fortes possibilités que l'allodynie nécessite ces fibres non douloureuses, mais ce n'est pas encore prouvé hors de tout doute. ((Sandkuhler, 2009) *Figure 7*)

Hyperalgésie

L'hyperalgésie est un autre symptôme souvent décrit par les patients atteints de douleurs neuropathiques et se définit comme une perception douloureuse exagérée face à un stimulus normalement douloureux. Comme l'allodynie, cette hyperalgésie n'est pas seulement un symptôme pathologique et est aussi ressentie en condition normale. Par exemple, la perception douloureuse sera grandement amplifiée si on se frappe vigoureusement un orteil pour une deuxième fois dans un court laps de temps.

L’IASP a récemment redéfini le terme hyperalgésie comme un terme fourre-tout pour toute hypersensibilité douloureuse. Ce terme est lui aussi contesté par la communauté comme étant redondant avec hypersensibilité ((Sandkuhler, 2009) *Figure 7*). Il est important de noter que l’hyperalgésie et l’allodynie ne sont pas mutuellement indépendantes et qu’elles arrivent souvent, mais pas automatiquement en paire chez les patients. Tous les exemples apportés décrivent des perceptions à des stimuli mécaniques, mais les deux termes (allodynie et hyperalgésie) s’appliquent aussi pour des stimuli thermiques. Il y a aussi une nouvelle caractéristique récemment décrite dans la littérature décrivant une hypersensibilité comme soit statique si le stimulus reste stable, soit dynamique si la stimulation doit être en mouvement (Liljencrantz et al., 2013).

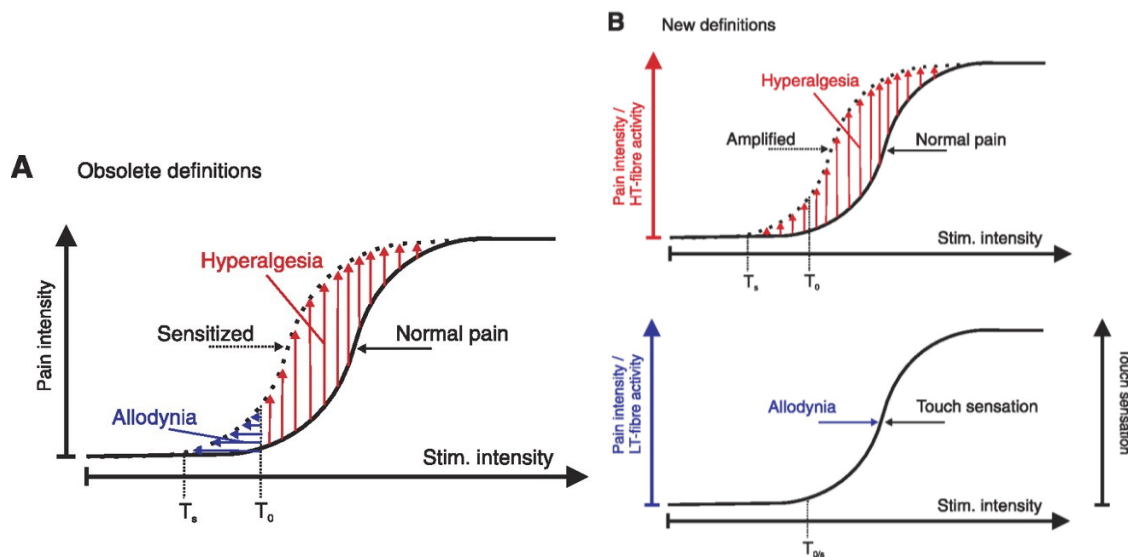


Figure 7 : Nouvelles et anciennes définitions de l’allodynie et de l’hyperalgésie (modifiée (Sandkuhler, 2009))

A- Dans les anciennes définitions on définissait l’allodynie comme une perception douloureuse à un stimulus normalement non douloureux (section en bleu) et l’hyperalgésie comme une perception douloureuse amplifiée en réponse à un stimulus normalement douloureux. B- Dans les nouvelles définitions on regroupe toutes amplifications

douloureuses dans le terme général d'hyperalgésie et on parle d'allodynie seulement si la douleur provient de fibres à faible seuil.

Douleurs spontanées

Le troisième principal symptôme des douleurs neuropathiques est l'apparition de douleurs qui surviennent en l'absence de stimulation. Celles-ci sont souvent décrites par les patients comme une perception douloureuse qui arrive subitement, qui ressemble à une électrocution locale et qui dure plusieurs secondes. Le niveau de douleur des différentes crises est variable et d'autres perceptions qu'une « électrocution » sont parfois rapportées. Ce type de douleur est particulièrement insupportable, car il est souvent associé à la constante peur de voir ces épisodes survenir et est aussi souvent lié à de l'insomnie lorsque les épisodes surviennent durant le sommeil. Certains décrivent aussi un lien entre la fatigue et la fréquence d'épisodes de douleurs spontanées (Baron et al., 2010; Baron, 2008). Plus récemment de nouveaux concepts et définitions ont été avancés au niveau des douleurs spontanées et ceux-ci méritent d'être soulignés (Bennett, 2012). Cet auteur suggère le besoin d'une subdivision de ce que l'on considère actuellement comme de la douleur spontanée. Le premier groupe serait la douleur persistante, provoquée la présence de décharges persistantes induit par la présence de substances inflammatoires. Le deuxième groupe serait les douleurs spontanées, présentent dans les douleurs neuropathiques et provoquées par des décharges spontanées induit par des changements au niveau des neurones eux-mêmes. Un troisième groupe serait l'addition des douleurs, causée par la sommation temporelle des épisodes de douleur allodynic et hyperalgésique provoquée par les stimulations de la vie quotidienne (Bennett, 2012).

Comorbidités

Les comorbidités fréquentes rapportées chez les patients souffrant de douleurs neuropathiques sont : trouble du sommeil, humeur dépressive et anxiété. Tous ces paramètres affectent la perception douloureuse et peuvent donc amplifier les problèmes d'allodynie, d'hyperalgésie et de douleurs spontanées. Dans une étude sur une population

allemande, on remarque que 60 % des patients souffrant de douleurs neuropathiques souffrent aussi de dépression modérée à sévère, comparativement à 25 % chez le groupe contrôle en douleur nociceptive. Au niveau du sommeil, seulement 27% des patients en douleur neuropathique ont un sommeil réparateur versus 49% des patients en douleur nociceptive (Baron, 2008).

Études humaines

Notion du rapport de la perception douloureuse

Tel qu'expliqué précédemment, la douleur est la forme intégrée par le cerveau d'une perception du corps et cette intégration est altérée par une multitude de facteurs qui varient d'une personne à l'autre. À cause de la complexité et variabilité de cette intégration, la douleur n'est pas mesurable comme l'est par exemple la température corporelle. Il est tout de même possible de mesurer plusieurs facteurs qui peuvent nous donner des informations sur cette douleur (imagerie par résonance pour voir les régions actives, tests de réflexes moteurs pour analyser certaines atteintes périphériques, etc.).

Par contre, seule la description qu'une personne fait de sa douleur nous permet de réellement quantifier la douleur ressentie. À cause de ce côté subjectif et pour uniformiser les résultats dans la pratique et la recherche, plusieurs protocoles de description de la douleur sont utilisés, dont l'exemple le plus connu : l'Échelle visuelle analogue de la douleur décrivant l'intensité de la douleur entre 1 et 10 (Litcher-Kelly et al., 2007).

Avantages/inconvénients humains versus animaux

Même si tous n'estiment pas la même intensité de stimulation de la même manière, l'avantage avec les études humaines est la possibilité d'obtenir des valeurs quantitatives de perception douloureuse. De plus, les études faites sur les humains permettent d'obtenir des informations sur la qualité de la douleur (brûlure, élancement, picotement, etc.) qui sont impossibles à collecter chez les animaux. Un autre avantage avec les études humaines est

la plus grande facilité d'utilisation des systèmes d'imagerie non invasive (FMRI, TACO, etc.) qui sont parfois aussi utilisés chez les modèles animaux, mais qui sont souvent beaucoup moins disponibles et moins précis (un cerveau humain est plus gros qu'un cerveau de rongeur).

Un autre point important est que tout modèle animal ne demeure qu'un modèle qui tente de reproduire au mieux une maladie chez l'homme. Ceci fait qu'automatiquement, les études chez les patients se rapprochent davantage de la réalité. Par contre, avec les études chez les animaux, il est possible de faire des interventions plus contrôlées que chez l'humain et on peut se permettre des manipulations plus invasives qu'il serait impossible de faire sur des humains pour des questions éthiques.

Études animales

Tests comportementaux

Problème de quantification de la douleur

Lorsqu'on utilise un modèle animal, le problème majeur rencontré est la perte du principal moyen de quantifier et qualifier la douleur due à l'incapacité de l'animal de nous communiquer ces informations. Pour compenser ceci, on doit se rabattre sur une réaction de l'animal que l'on peut mesurer et que l'on associe à une perception douloureuse. Il est important de toujours garder en tête que, peu importe la réaction observée, il nous est impossible de savoir avec certitude si cette réaction est vraiment une réponse à une douleur. Le comportement des animaux pourrait n'être en fait qu'une réaction d'un autre type (peur d'avoir mal, anxiété, surprise, etc.).

Une des critiques majeures de la majorité des techniques de quantification de douleur chez les modèles animaux est qu'elles quantifient une réponse réflexe chez l'animal. Une réponse réflexe n'a pas besoin d'une intégration par le cerveau et s'il n'y a pas participation du cerveau, on ne peut décrire cette réponse comme douloureuse. En contre-argument, des hypothèses ont été avancées comme quoi le réflexe est une réponse

douloureuse court-circuitant le cerveau pour réagir plus vite à un danger, mais qu'une copie de cette information est aussi envoyée au cerveau. De toute façon, il n'existe pas d'autre façon de faire alors nous devons nous contenter de réactions comportementales comme repère douloureux chez l'animal (Mogil, 2009).

Mécanique

La douleur n'est pas seulement une perception quantifiable en intensité, il est aussi possible de la qualifier : picotement, coupure, brûlure, élancement, etc. Dans le milieu de la recherche fondamentale, tous ces qualificatifs plus subjectifs sont impossibles à obtenir chez l'animal. Par contre, une différenciation est souvent faite entre la nociception mécanique et thermique. Cette distinction est d'autant plus importante que l'on remarque des différences au niveau du type d'hypersensibilité générée par les différents modèles de douleurs neuropathiques. Certains modèles ne génèrent qu'une allodynie thermique ; d'autres, l'ensemble des hypersensibilités. Dans ma thèse, je me suis concentré sur le côté mécanique avec des tests d'allodynie comportementale et des stimulations mécaniques pour les expériences électrophysiologiques (voir chapitre 2,3).

Allodynie

Test manuel du seuil de retrait de la patte « Paw withdrawal threshold »

De loin le plus utilisé des tests de sensibilité douloureuse, ce test relativement simple consiste à stimuler la patte d'un animal avec des fils de force croissante (appelés des fils de von Frey) jusqu'à ce que l'animal ait un réflexe de retrait. Ce test est particulièrement efficace pour identifier la présence ou non d'une hypersensibilité, car dans majorité des modèles de neuropathie, les animaux montrent un seuil de réponse beaucoup plus faible que les animaux contrôles (Keller et al., 2007; Mogil, 2009). Différents protocoles sont utilisés pour obtenir une valeur plus précise du seuil de retrait de la patte ex: (Chaplan et al., 1994)) (*Figure 8*). Les fils de von Frey sont conçus pour qu'à une certaine force appliquée sur une surface, le fil plie. Une fois pliée, l'application de force supplémentaire n'augmente pas la force générée sur la patte, mais résulte seulement en une courbure plus

prononcée du fil. Par contre, la faiblesse de cette technique est que pour obtenir un fil ayant une force de stimulation plus élevée, le fabricant augmente le diamètre du fil. Cette variation de diamètre pour obtenir une variation de force entraîne donc une variation de la surface de stimulation, provoquant donc une augmentation non linéaire de la pression (force/surface) appliquée. Ceci est un problème majeur, car comme l'ont démontré von Frey (Von Frey M, 1896) et ses successeurs (Bishop, 1949), le seuil de douleur est constant lorsqu'il est exprimé en force par unité de surface (c'est-à-dire en pression) (voir chapitre 2 figure 6 pour plus de détails).

Un des biais à considérer quand on utilise le test manuel du seuil de retrait de la patte est que, pour un expérimentateur entraîné, il est relativement facile de reconnaître un animal contrôlé d'un animal ayant subi un modèle d'hypersensibilité douloureuse. Cela veut donc dire qu'il est très difficile, voire impossible de faire des expériences « à l'aveugle ». Un expérimentateur pourrait inconsciemment sous-évaluer les seuils de douleur des animaux hypersensibles ou surévaluer ceux des animaux contrôlés.

Dans ma thèse, j'ai utilisé ce test de comportement avec la technique « up and down » (Chaplan et al., 1994), mais j'ai fait certaines modifications dans l'analyse des résultats en convertissant toutes les stimulations de force à pression (voir chapitre 2). Je vais quand même décrire certaines des autres alternatives souvent utilisées pour déterminer le seuil de douleur comportementale.

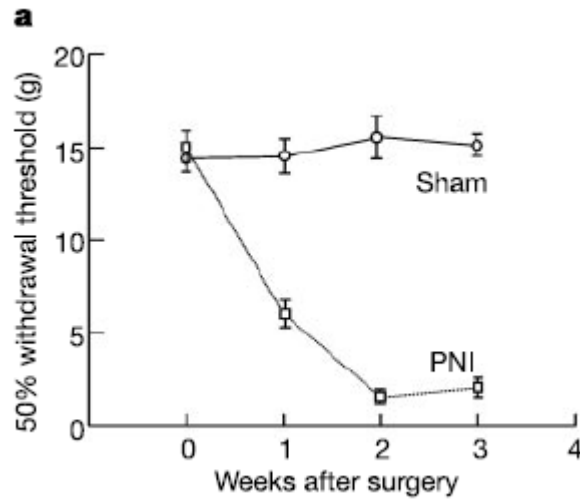


Figure 8 : Exemple de résultats classiques d'un test de seuil de retrait de la patte avec comparaison d'une valeur contrôle et d'un modèle de lésion de nerf (PNI)

Test automatique du seuil de retrait de la patte

Plus récent que la version manuelle, ce test, communément appelé von Frey électronique, est un système plus automatisé basé sur le même principe de réflexe de retrait de patte induit par une stimulation mécanique au niveau de la patte. Ce système utilise un seul fil, génère une stimulation d'intensité croissante dans le temps et enregistre la dernière force appliquée lorsque l'animal retire sa patte (Clapper et al., 2010). Cette technique a de nombreux avantages. Comme le fil est unique, l'aire de stimulation est stable, peu importe l'intensité, et donc la force appliquée est en relation directe avec la pression. Également, puisque la stimulation est automatisée, on s'affranchit du biais d'expérimentateur.

Lors de discussions avec d'autres groupes de recherche en douleur, j'ai appris que plusieurs chercheurs sont revenus à la méthode classique de von Frey après avoir essayé la version automatique, car ils n'arrivaient pas à reproduire leurs résultats précédents. Une des possibilités pour ces différences est que la version automatique applique une rampe de stimulation et que plusieurs fibres afférentes ont des propriétés d'encodage adaptatives

(Levy and Strassman, 2002), ce qui peut impliquer que les fibres s'adaptent en partie au stimulus au fur et à mesure que celui-ci s'intensifie.

Test de distribution pondérale « Weight bearing »

Une autre technique d'évaluation d'hypersensibilité en émergence est l'analyse de la répartition du poids de l'animal sur ses quatre pattes. Un animal ayant une hypersensibilité sur une de ses pattes aura tendance à mettre moins de poids sur cette patte afin de diminuer la douleur (*Figure 9*) (Rivat et al., 2008). L'avantage majeur de cette technique sur le von Frey est qu'elle n'implique pas la mesure d'un réflexe et que le choix de la posture de l'animal fait intervenir les aires supérieures par contre la posture peut ne pas être liée uniquement à une perception douloureuse.

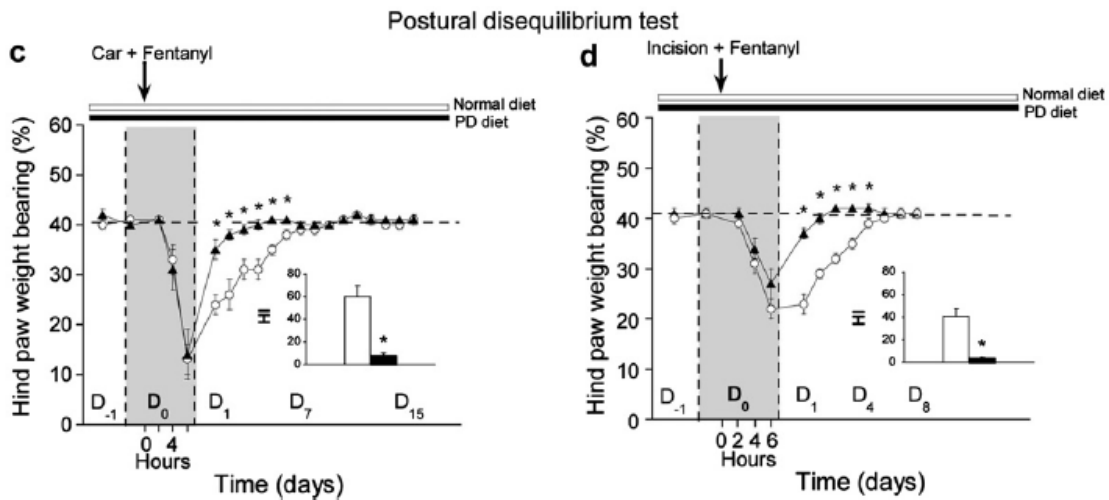


Figure 9 : Exemple de résultats d'un test de distribution pondérale « Weight bearing » (Rivat et al., 2008)

Hyperalgésie

La quantification de l'hyperalgésie mécanique est plus complexe que celle de l'allodynie, car on doit pouvoir trouver un paramètre quantifiable pour mesurer l'intensité de la réponse douloureuse. Pour ce faire, on se doit de ne pas seulement identifier la présence ou

l'absence de réponse douloureuse (avant le seuil). Pour vraiment analyser une hyperalgésie, l'on doit s'affranchir du seuil et utiliser un paramètre lié à une intensité de douleur. En plus, on doit être capable d'observer une augmentation de ce paramètre suite à un traitement. Certaines études semblent avoir oublié cette notion d'intensité de douleur dans l'interprétation de leurs résultats (Petrus et al., 2007; Nasu et al., 2010; Kubo A et al., 2012). Ces études quantifient le nombre de fois qu'un seuil a été atteint et décrivent ces résultats comme de l'hyperalgésie plutôt que de l'allodynie.

Certaines techniques analysent l'intensité de réponse en utilisant la vocalisation. L'avantage de la vocalisation, c'est qu'il est facile de quantifier un nombre de vocalises et de conclure avec ces résultats (Attal et al., 1991; Da Silva et al., 2010). Le problème est que ce n'est pas l'ensemble du spectre vocal (ultrason et audible) qui correspond à des cris de douleur et les fréquences et types de cris chez le rongeur ne sont pas encore bien définis. Sans une analyse poussée de l'ensemble du spectre, il est possible de se méprendre sur les intentions de l'animal (avertissement des pairs, vocalise de peur, de surprise, etc.).

Douleur spontanée : douleur survenant sans stimulation

Les douleurs spontanées sont un des symptômes dont les personnes atteintes de douleurs chroniques se plaignent le plus et, malheureusement, parmi les moins étudiés en recherche fondamentale (Baron et al., 2010). La raison principale de cette lacune est la difficulté d'évaluer la douleur spontanée chez un animal ayant subi une lésion de nerf à cause, encore une fois, de l'impossibilité des animaux de communiquer leur douleur. Pour le moment, le principal moyen utilisé pour extrapoler la présence de douleurs spontanées est d'observer les comportements de l'animal comme les grattements, l'agitation de la patte, l'élévation spontanée de la patte, etc. (Kupers et al., 1998). Certains chercheurs utilisent aussi la vocalisation, mais les cris des rongeurs sont audibles à l'humain seulement à des stimulations douloureuses très élevées et certaines études affirment que la vocalisation dans l'ultrason est inutilisable comme index de douleur (Mogil, 2009; Jourdan et al., 2002; Wallace et al., 2005). Une autre méthode utilisée pour quantifier la présence de douleur spontanée ou tonique est une technique appelée lieu de préférence conditionnelle.

Cette technique consiste à diviser une chambre de comportement en deux sections. Dans une phase de conditionnement, on place l'animal dans une section en lui injectant de la saline et dans l'autre section, on lui injecte un traitement. Suite à ce conditionnement, on laisse l'animal libre et celui-ci va choisir de passer plus ou moins de temps dans une chambre ou dans l'autre. L'hypothèse derrière cette technique est que si la drogue administrée produit un effet bénéfique sur la douleur spontanée ou tonique, l'animal passera plus de temps dans la section associée à cette drogue plutôt que celle associée à la saline.

Cette technique permet deux types d'analyse. La première permet de déterminer si un modèle animal de douleur neuropathique génère des douleurs spontanées en utilisant une drogue connue pour réduire les douleurs spontanées. La deuxième permet de déterminer l'efficacité d'une drogue pour diminuer les douleurs spontanées en utilisant un modèle de douleur neuropathique connu pour induire des douleurs spontanées (*Figure 10*) (King et al., 2009b).

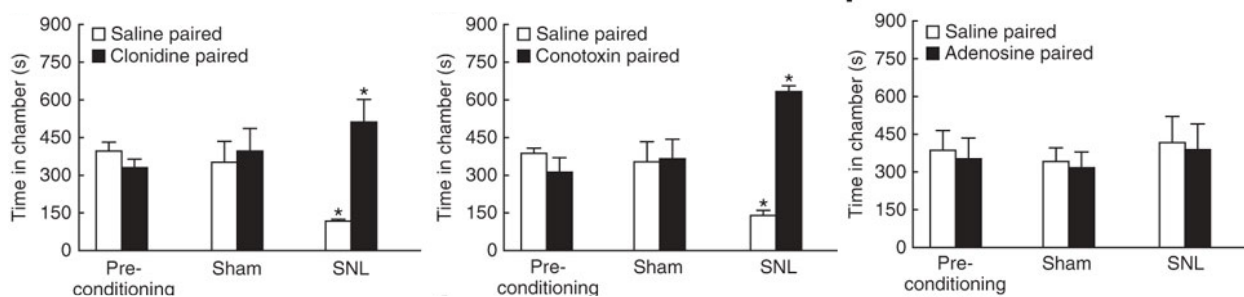


Figure 10 : Test de lieu de préférence conditionnelle pour l'étude des douleurs spontanées (King et al., 2009a).

Thermique

Des tests comportementaux d'hypersensibilité thermique relativement semblables aux tests mécaniques sont aussi disponibles pour l'allodynie et l'hyperalgésie. L'avantage avec les tests thermiques est que les stimuli sont beaucoup plus facilement contrôlables et des

systèmes générant des stimulations précises (en dessous du degré Celsius de précision) sont commercialement disponibles. Une des différences majeures par rapport aux stimulations mécaniques concerne l'hyperalgésie thermique ; pour celle-ci, beaucoup de gens utilisent la latence de retrait à une stimulation thermique douloureuse (laser, chaleur radiante, etc.). Dans ces tests, plus l'animal retire sa patte rapidement, plus l'animal est considéré hyperalgésique. Personnellement, j'ai beaucoup de réserves quant à cette technique, car selon moi ce test ne mesure aucunement de l'hyperalgésie, sensation douloureuse exagérée, mais il s'agit plutôt d'une autre manière de tester l'allodynie. Lorsqu'on stimule la patte avec une source thermique, la température au niveau du site stimulé augmente graduellement et à un certain moment, le seuil de douleur thermique est atteint et l'animal retire sa patte. Cela signifie qu'un animal qui retire sa patte plus rapidement est seulement un animal qui a un seuil thermique plus faible, donc allodynique, mais pas automatiquement hyperalgésique (Lloyd et al., 2012). Dans ma thèse, je me suis concentré sur les hypersensibilités mécaniques.

Modèle animal de douleur neuropathique

Au cours des années, beaucoup de modèles ont été créés pour tenter de reproduire une hypersensibilité comme celle ressentie chez les personnes souffrant de douleurs neuropathiques. Par contre, plusieurs paramètres de la maladie sont extrêmement difficiles à reproduire expérimentalement ; par exemple, le fait que pour une même blessure, seulement un très faible pourcentage de gens vont développer des douleurs neuropathiques. Au fil des ans, les modèles ont évolué principalement pour trois raisons : une meilleure reproductibilité entre les différents laboratoires, une diminution de la perte de fibres afférentes et des effets plus près des douleurs neuropathique chez les patients.

Modèle de constriction chronique « Chronic constriction injury (CCI) »

Ce modèle consiste à mettre quatre ligatures lâches autour du nerf sciatique qui vont provoquer une constriction du nerf et induire les différentes formes d'hypersensibilités. La critique majeure de ce modèle, c'est qu'il y a un monde d'interprétation pour une « ligature lâche » et ceci se reflétait lors de la comparaison des différents résultats entre les différents laboratoires (Bennett and Xie, 1988b).

Modèle de ligature partielle du nerf sciatique « Partial sciatic nerve ligation (PSL)»

Ce modèle créé par l'équipe du Dr. Seltzer utilise une seule ligature, mais cette fois, serrée autour d'une portion du faisceau de fibres du nerf sciatique (33% à 50 %). Le modèle provoque aussi une allodynie, hyperalgésie et un comportement suggérant des douleurs spontanées. Le problème majeur de cette technique est, encore une fois, la variabilité entre les différents groupes de recherche sur l'évaluation de la portion du nerf sciatique qui est ligaturée (Seltzer et al., 1990).

Modèle de ligature des nerfs spinaux «Spinal nerve ligation (SNL)»

Ce modèle sélectionne les nerfs spinaux L5-L6 (ou dans certain cas, L6 uniquement) pour une ligature serrée. Cette technique évite ainsi les variabilités des ligatures lâches et, comme les nerfs spinaux sont entièrement ligaturés, elle élimine aussi la variabilité du PLS. Ce modèle est l'un des plus stables dans le temps (Kim and Chung, 1992).

Modèle de constriction chronique modifiée « Altered Chronic constriction injury (CCI)»

Le modèle modifié est semblable au CCI classique de Bennett, c'est-à-dire qu'il ne coupe ou ne détruit pas directement de nerfs avec une ligature serrée puisqu'on utilise une constriction. L'amélioration vient du fait qu'on enlève le côté subjectif de la ligature lâche et vient aussi du fait que la constriction crée moins d'inflammation qu'une suture. Pour cette modification, on pose à des animaux de taille constante un petit tube de plastique de taille fixe autour de leur nerf sciatique. Lorsque l'animal grandit, son nerf devient comprimé par le tube de plastique et ceci génère une hypersensibilité en deux à trois semaines. L'hypersensibilisation ne dure pas aussi longtemps qu'avec le SNL (Mosconi and

Kruger, 1996). Dans ma thèse, j'ai utilisé ce modèle en application courante dans notre laboratoire (Coull et al., 2005; Coull et al., 2003; Keller et al., 2007).

Modèle de nerf épargné « Spared nerve injury (SNI)»

Ce modèle, plus récent, consiste à ligaturer et couper deux branches du nerf sciatique, soit le nerf péronier commun et le nerf tibial, tout en laissant le nerf sural intact. Même si ce modèle est plus récent et implique une ligature moins volumineuse, celui-ci semble très valable. Ce modèle provoque une forte allodynie mécanique stable sur une longue période (Decosterd and Woolf, 2000).

Modèle de lésion du nerf saphène

Un autre modèle développé plus récemment, contrairement à la majorité des autres modèles, utilise le nerf saphène plutôt que le nerf sciatique (ou une sous section de celui-ci) (*Figure 11*). L'avantage principal pour l'utilisation du nerf saphène vient du fait que ce nerf est purement sensoriel ne causant donc aucun effet moteur. Ce modèle a été montré comme générant à la fois de l'allodynie et de l'hyperalgésie (Gunduz et al., 2011).

Autres

Les modèles décrits plus haut sont une partie des modèles impliquant une compression, une coupure ou une ligature de sections de nerf (*Figure 11*), mais d'autres modèles existants utilisent d'autres principes induisant des altérations physiques des nerfs. Pour générer les symptômes semblables aux douleurs neuropathiques, certains modèles utilisent des activateurs du système immunitaire, des toxines, des agents viraux, des médicaments utilisés à fortes doses ou même des modèles d'autres maladies comme les rats diabétiques (Colleoni and Sacerdote, 2010).

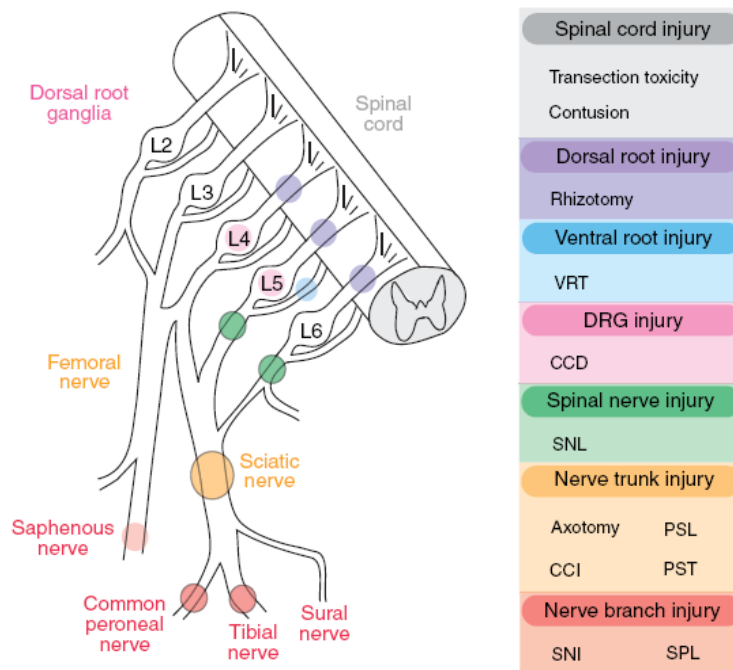


Figure 1 Anatomy of the rat lumbar plexus and the location of the different injuries used to create the different neuropathic pain models. VRT, ventral root transection; CCD, chronic constriction of dorsal root ganglia; SNL, spinal nerve ligation; CCI, chronic constriction injury; PSL, partial sciatic ligation; PST, partial sciatic nerve transection; SNI, spared nerve injury (tibial and c. peroneal nerves are injured, sural nerve is intact); SPL, saphenous nerve partial ligation (30–50% of the saphenous is transected).

Figure 11 : Représentation des différents types de lésion de nerfs utilisés comme modèles de douleur neuropathique (Decosterd and Dert, 2008).

L'organisation du réseau nociceptif

Telle que décrite précédemment, la perception de la douleur passe premièrement par les neurones d'afférences primaires qui transmettent l'information provenant de la périphérie à la moelle épinière, qui elle, encode et transmet l'information aux aires supérieures. Cette section de la thèse sera divisée dans cet ordre en trois groupes. La moelle épinière sera décrite plus en profondeur par la suite, car cette thèse est principalement orientée sur cette région qui, d'après la littérature, est la principale région impliquée dans le développement des douleurs neuropathiques.

Organisation des neurones d'afférences primaires

Les neurones d'afférences primaires font partie du système nerveux périphérique. Leur corps cellulaire est situé dans les ganglions de la racine dorsale (DRG). Les DRG ont une forme neuronale particulière ; ils possèdent deux sites d'initiation des potentiels d'action : un site distal au niveau de la périphérie qui innerve les tissus comme la peau et dont les terminaisons réagissent aux stimuli sensoriels, et un autre proximal au niveau du corps cellulaire qui transfère l'information au système nerveux central (CNS) au niveau de la moelle épinière (Patapoutian et al., 2009).

Types de fibre

La classification la plus populaire qui a été faite pour différencier les différentes fibres afférentes du DRG est basée sur leur niveau de myélinisation et donc, leur vitesse de conduction. Les fibres à gros diamètre qui ont une épaisse couche de myéline sont nommées A β et sont responsables de transmettre l'information non nociceptive avec une vitesse de conduction rapide de 7 à 50 m/s. Par contre, cette vision classique de fibre A β ne véhiculant que de l'information non nociceptive est remise en question avec plusieurs données montrant des fibres à haute vitesse de conduction (> 7 m/s) qui transmettent de l'information nociceptive. Cette sous-classe a été nommée fibre A β nociceptive et la proportion de ces neurones pourrait aller jusqu'à 50 % chez le rongeur, selon certaines études (Djoughri and Lawson, 2004).

Un autre type de fibres, les A δ , sont classées comme faiblement myélinisées avec une vitesse de conduction moyenne (2 à 7 m/s). Les fibres qui ont cette vitesse de conduction sont connues classiquement comme transmettant un message nociceptif. Par contre, il faut faire attention à cette généralisation, car des entrées non nociceptives sont aussi véhiculées par des fibres ayant cette vitesse de conduction. Les cellules A δ transmettant un message non nociceptif les plus connues sont les « D hair unit » des cellules particulièrement sensibles aux mouvements des poils chez les rongeurs (Djoughri and Lawson, 2004).

La dernière classe de fibres d'afférence est celle des fibres C, non myélinisées, qui véhiculent un message nociceptif. Cette absence de myéline résulte en une conduction des potentiels d'action très lente (< 2 m/s). Encore une fois, la généralisation faite en associant les fibres C uniquement à la transmission nociceptive n'est pas vraie dans tous les cas et certaines fibres C sont classées parmi les cellules avec un faible seuil d'activation mécanique « LTM » (Djouhri and Lawson, 2004; Perl et al., 1997).

L'immunohistochimie nous apporte aussi une couche supplémentaire de complexité dans la classification des fibres C, qui peuvent être divisées en deux sous-groupes. Le premier comprend les fibres C peptidergiques habituellement identifiées par la présence de CGRP, mais contenant aussi de la substance P et du glutamate et réagissant au facteur de croissance neuronale (NGF). Le second regroupe les fibres C non peptidergiques identifiées par leur liaison avec l'anticorps anti-isolectine B4 (IB4). Ces neurones contiennent du glutamate, mais aucun neuropeptide et réagissent au facteur neurotrophique dérivé de la glie GDNF (Braz et al., 2005; Basbaum and Bushnell, 2008).

En faisant volontairement abstraction des fibres A β nociceptives pour lesquels nous avons, pour le moment, très peu d'information dans la littérature, je parlerai dans le reste de cette thèse des entrées sensorielles nociceptives comme étant les entrées provenant des fibres A δ et C.

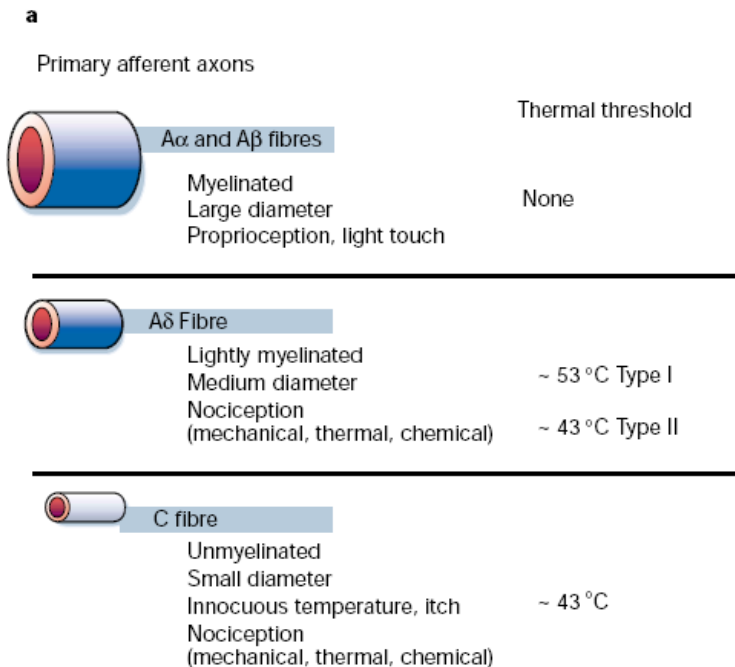


Figure 12 : Propriétés des différents types de fibres d'afférence primaire. (modifié (Julius and Basbaum, 2001))

Nocicepteur

Sur ces différentes fibres, un autre niveau de spécificité s'ajoute, car de nombreux types de nocicepteurs sont présents sur les différentes fibres. De manière très grossière, on distingue trois classes de nocicepteurs en fonction de la nature du stimulus : les mécanonocicepteurs, qui répondent à des pressions d'intensité très élevée ; les thermonocicepteurs, qui répondent soit à des températures basses (inférieures à 10 °C, thermonocicepteurs au froid) soit à des températures élevées (supérieures à 43 °C, thermonocicepteurs au chaud) ; les chémorécepteurs qui répondent à des molécules chimiques alogènes comme, par exemple, la capsaïcine, un extrait du piment (Calvino, 2006). Un type de récepteur important, les canaux ioniques de type « Transient Receptor Potential (TRP) », est particulièrement lié à la nociception au niveau des neurones d'afférence primaire (Figure 13). Il y a aussi la possibilité qu'un nocicepteur soit sensible à une combinaison de deux types de stimulation.

28

Par exemple, le récepteur TRPM8 est sensible à la fois au froid et au menthol et c'est la raison de la perception de froid ressentie lorsqu'on mange quelque chose de mentholé (Gaudioso et al., 2012). Beaucoup a été écrit sur les différents types de récepteurs périphériques et plus d'information est disponible dans les revues de littératures suivantes (Figure 13) (Patapoutian et al., 2009; Basbaum et al., 2009; Stucky et al., 2009).

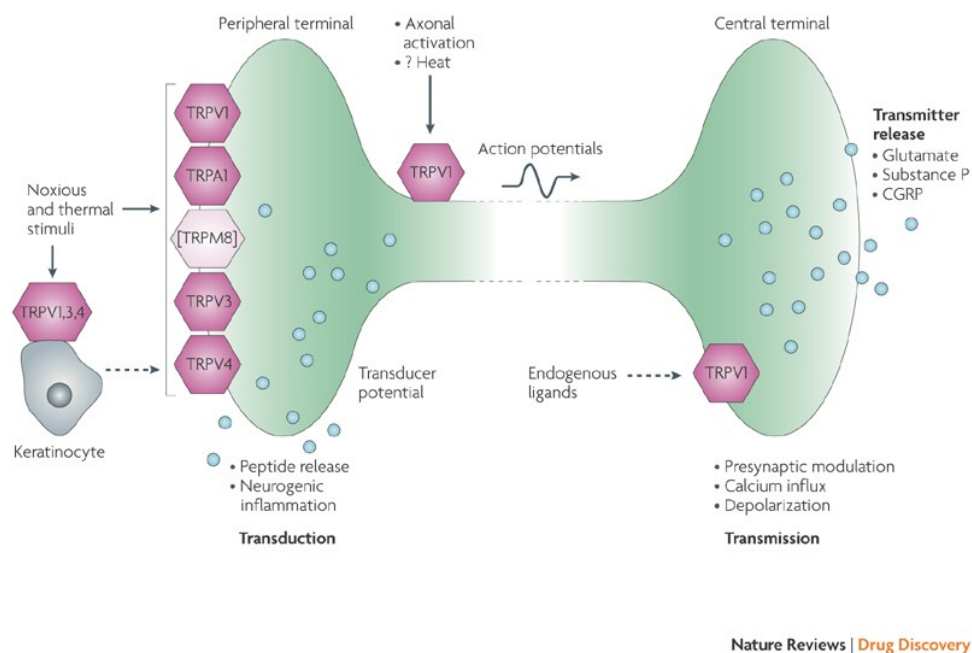


Figure 13 : Différents types de récepteurs sensibles à l'environnement sur les neurones d'afférence primaire (Patapoutian et al., 2009).

Au niveau des terminaisons nerveuses des fibres afférentes du DRG, les nocicepteurs participent à la douleur nociceptive ; mais c'est aussi à ce niveau que la sensibilisation se produit en cas de douleurs inflammatoires. Tel que décrit dans la section précédente sur l'inflammation (voir plus haut), la « soupe inflammatoire », un cocktail de messagers, hypersensibilise la région et cause une allodynie et hyperalgésie passagère (Basbaum et al., 2009).

Changements au niveau des afférences primaires dans les douleurs neuropathiques

Dans le domaine des douleurs neuropathiques, plusieurs études ont été faites sur l'effet des modèles de lésions périphériques sur les différents neurones d'afférence primaire (Djouhri L 2006; Fukuako T 2002).

Certains résultats démontrent des activités aberrantes ou continues des neurones d'afférences lésés ou de leurs voisins intacts (Gold, 2000). Un des changements les mieux caractérisés est l'apparition chez des patients d'une décharge ectopique des neurones de faible seuil A β . Plusieurs hypothèses ont été avancées sur le fait que ces décharges ectopiques pourraient être la cause de l'initiation ou du maintien des principaux changements dans les douleurs neuropathiques (Torebjork et al., 1992; Gracely et al., 1992). Chez les modèles animaux, principalement dans le modèle SNL, une activité ectopique a été démontrée sur les fibres A β , mais aucune sur les fibres C. En plus, le patron de changement des fibres A β corrèle avec les changements comportementaux des animaux. À l'opposé, un seul groupe a enregistré une décharge ectopique chez les fibres C et ce, seulement sur une période d'une semaine post chirurgie (*Figure 14*) (Han et al., 2000; Liu et al., 2000b; Liu et al., 2000a; Amir et al., 2002). D'autres preuves démontrant l'absence de participation des fibres C dans l'initiation ou le maintien de l'hypersensibilité due au modèle SNL sont des expériences utilisant la resiniferatoxine. Cette toxine désensibilise les fibres C sensibles à la capsaïcine et n'a aucun effet sur le comportement des animaux ayant subi le modèle SNL (Ossipov et al., 1999). L'ensemble de tous ces éléments semble indiquer que dans les douleurs neuropathiques, autant chez les modèles animaux et que chez les patients, les fibres A β , mais pas les fibres C, développent un mode de décharge ectopique. Ces changements sur les fibres A β semblent aussi être nécessaires à l'initiation et au maintien de l'allodynie et hyperalgésie. Étant donné le très faible seuil d'activation des fibres A β , en dessous du seuil comportemental de douleur, une hypersensibilité de ces fibres ne peut expliquer à elle seule une diminution du seuil douloureux. Par contre, cette activité pourrait générer et maintenir un changement au niveau de la moelle épinière (Voir Chapitre 2).

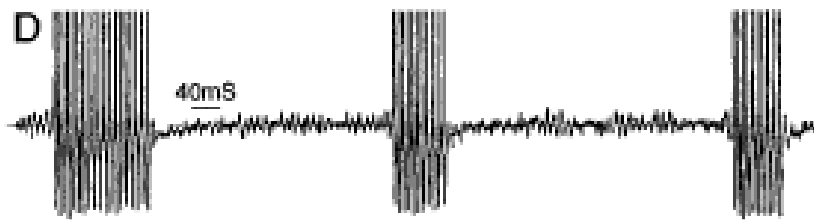


Figure 14 : Exemple de décharge ectopique des fibres A β (Amir et al., 2002)

Lorsqu'on s'intéresse à l'encodage sensoriel de la douleur, déterminer les variations de seuil d'activation des différentes fibres dans les modèles de douleurs neuropathiques est particulièrement important. Même si les modèles générant une hypersensibilité tactile peuvent diminuer les seuils d'activation des terminaisons sensorielles, très peu de fibres originellement nociceptives voient leur seuil diminuer à un niveau pouvant expliquer l'allodynie tactile (Schlegel et al., 2004; Basbaum and Bushnell, 2008).

Une autre observation intrigante suite au développement des douleurs neuropathiques avec le modèle SNL est la disparition au niveau DRG de pratiquement toutes les fibres non peptidergiques (IB4 positive), une semaine après la ligature, suivie d'un retour progressif aux valeurs normales après 20 semaines. Dans ce même article, on constate aussi une faible, mais persistante perte de fibres peptidergiques, mais aucune diminution des fibres myélinisées (Hammond et al., 2004). Le fait que les fibres transmettant des informations douloureuses sont celles qui diminuent dans un modèle où la douleur est amplifiée peut paraître contre-intuitif. Par contre, ces résultats peuvent être un autre argument appuyant l'absence d'implication de la périphérie dans le maintien à long terme des douleurs neuropathiques.

Organisation de la moelle épinière

Cytoarchitecture

La moelle épinière peut être divisée en dix couches (lamina I à X) et en deux grandes sections liées à leur fonction : la corne dorsale sensorielle et la corne ventrale motrice. Au

niveau de l'encodage sensoriel, la corne dorsale s'étend de la couche I à la couche VI. Dans la littérature sur la douleur, les régions encodant l'information nociceptive sont souvent séparées en couches superficielles (lamina I-II) et les couches profondes (lamina III-V). Certains auteurs parlent aussi parfois des couches intermédiaires (lamina II-III) (*Figure 15*).

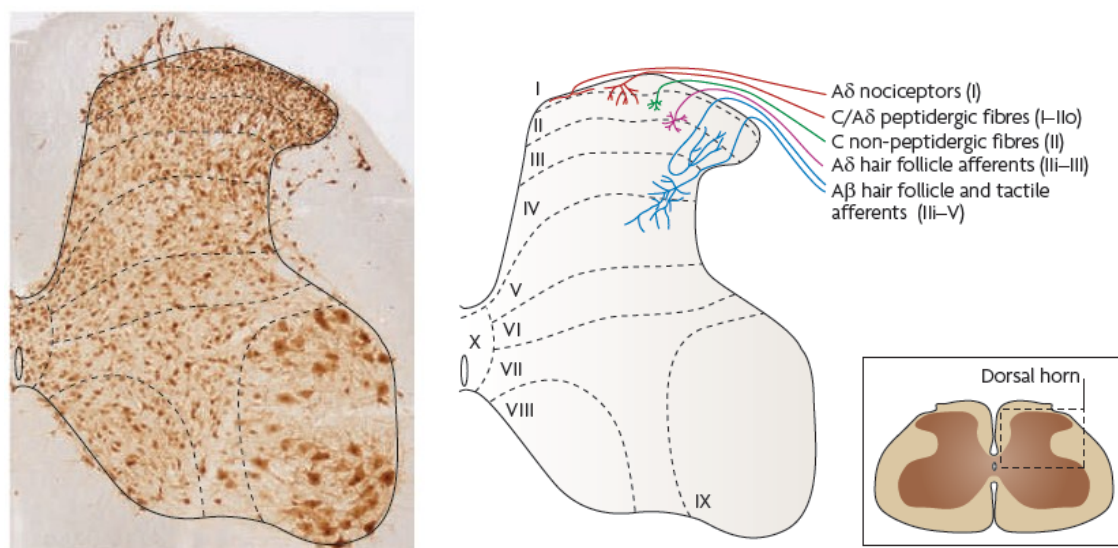


Figure 15 : Représentation des sites de connexion par les différents types de fibres d'afférence primaire (Todd, 2010).

Lamina I

La lamina I est une couche très mince située directement en dessous de la matière blanche dans le haut de la corne dorsale (*Figure 15*). Il a été démontré que la majorité des neurones (61%) de la couche I sont des neurones nociceptifs spécifiques (NS) réagissant à des stimulations mécaniques, thermiques (chaude ou froide) ou même à toutes ces modalités, dans certains cas : les fameux neurones HPC (heat, pinch cold) (Andrew and Craig, 2002). En plus de ces neurones dits nociceptifs spécifiques, d'autres équipes ont constaté une faible population de neurones encodant aussi la gamme non nociceptive appelée Wide Dynamic Range (WDR) (Giesler et al., 1976). Il a été démontré que les neurones de la

lamina I qui reçoivent normalement des entrées monosynaptiques des fibres afférentes C et A δ (Figure 15) peuvent aussi recevoir, sous certaines conditions pathologiques ou pharmacologiques, des entrées polysynaptiques A β (Torsney and MacDermott, 2006). Les principaux sites de projection de la lamina I sont le parabrachial, le thalamus, la formation réticulée médullaire et l'hypothalamus (Ringkamp and Meyer, 2008).

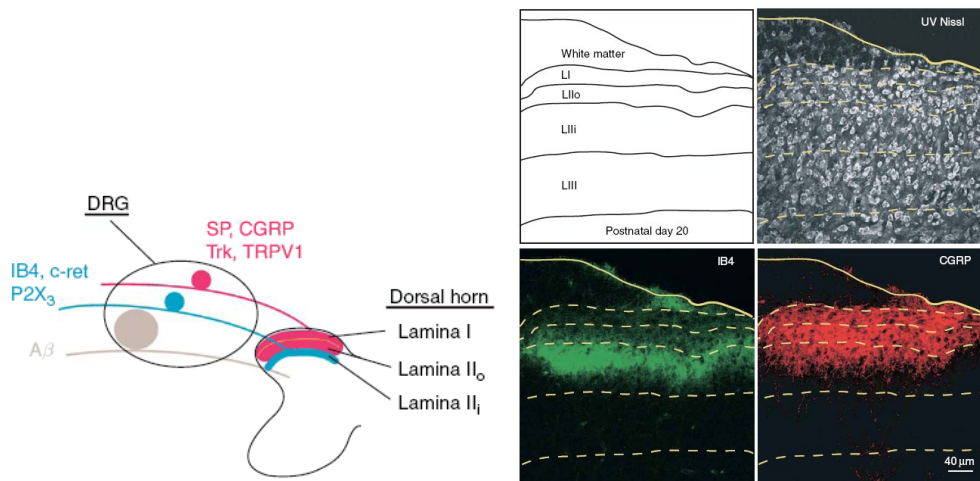
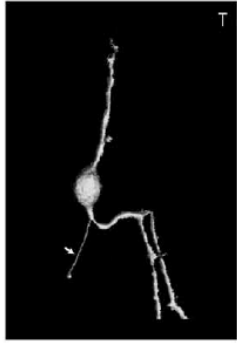
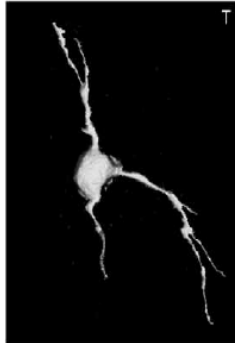


Figure 16 : Différents sites de projection des différents types de fibre selon leurs marqueurs neuronaux (Ringkamp and Meyer, 2008).

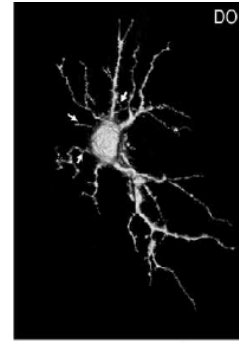
Cette couche très mince ne contient pas un très grand nombre de neurones, mais une forte proportion de ceux-ci projettent au cerveau. Cette proportion, combinée avec le fait que la majorité de ses neurones répondent uniquement à des stimuli douloureux, donne à cette couche un rôle très important dans le relais de l'information nociceptive aux aires supérieures (Craig, 1996). Une autre particularité des neurones de projection de la lamina I est qu'une forte proportion (80%) d'entre eux exprime le récepteur à la neurokinine 1 (NK-1) (Spike et al., 2003). Au point de vue morphologique, trois groupes ont pu être identifiés : les cellules fusiformes, pyramidales et multipolaires (Prescott and De Koninck, 2002; Lima and Almeida, 2002) (Figure 17).



Fusifforme



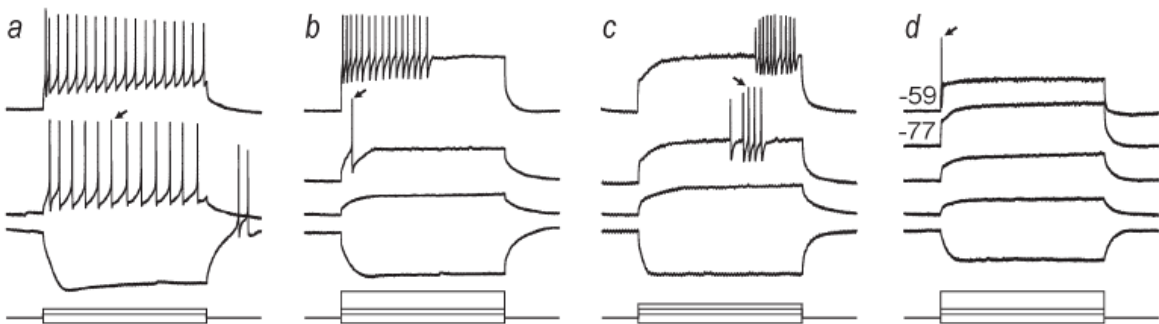
Pyramidale



Multipolaire

Figure 17 : Morphologie des différents neurones de la lamina I de la moelle épinière (Prescott and De Koninck, 2002).

Du point de vue des propriétés électrophysiologiques, on a enregistré quatre différents types de mode de décharge en tranche : tonique, phasique, décharge retardée et potentiel d'action unique. On dénote aussi une certaine corrélation entre la morphologie et le mode de décharge en tranche (Figure 18) (Prescott and De Koninck, 2002) mais aucune corrélation n'est encore établie avec des enregistrements *in vivo*.



Tonique

Phasique

Delay Onset

Single Spike

Figure 18 : Différents patrons de décharge des neurones des couches superficielles de la moelle épinière (Prescott and De Koninck, 2002).

Au cours des deux dernières décennies, une attention particulière a été portée sur les neurones de la lamina I (Coull et al., 2003; Coull et al., 2005; Craig et al., 1994; Spike et al., 2003; Zhang et al., 1996) etc.). Cet intérêt s'explique par la forte proportion de neurones de projection nociceptifs spécifiques, mais aussi selon moi, par la plus grande facilité technique pour l'enregistrement électrique de cellules en tranche au niveau de cette couche. À mon avis, cet engouement pour la lamina I ces dernières années, a entraîné un désintéressement de la communauté scientifique pour les couches plus profondes qui, pour certaines, encodent aussi l'information nociceptive et sont également composées de neurones de projection (voir plus loin).

Lamina II

Les premières données que nous avons sur la lamina II sont principalement des études morphologiques montrant différents types de neurones : les cellules « stalked », « large islet » et « small islet » (*Figure 19*) (Todd and Spike, 1993).

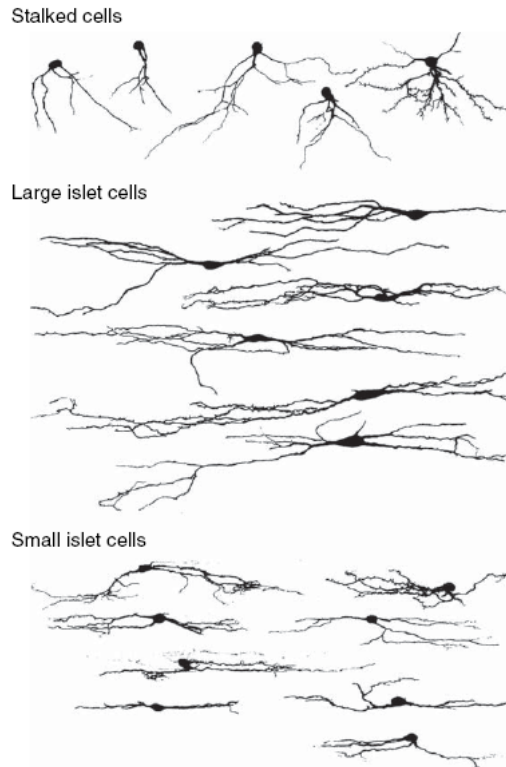


Figure 19 : Morphologie des cellules de la lamina II (Todd and Spike, 1993)

Les fonctions des différents types de cellules de cette région n'ont pas encore été clairement identifiées, mais plusieurs études ont démontré qu'une bonne proportion de ces cellules reçoivent des entrées synaptiques directes provenant des afférences primaires et que très peu, voir aucun, de ces neurones ne semblent être des neurones de projection. Les neurones de la lamina II ont souvent été décrits comme des interneurons ayant des connexions vers les autres couches. Ces connexions avec la lamina I (Figure 20) et les couches profondes ont amené certains auteurs à élaborer des hypothèses sur leur implication pour l'entrée polysynaptique A β sur les neurones de la couche I en condition pathologique (Eckert et al., 2003; Lu and Perl, 2003; Lu and Perl, 2005; Torsney and MacDermott, 2006). Par contre, jusqu'à ce jour, les réseaux neuronaux précis ainsi que leur

participation dans l'encodage de l'information nociceptive sont encore une source de débat.

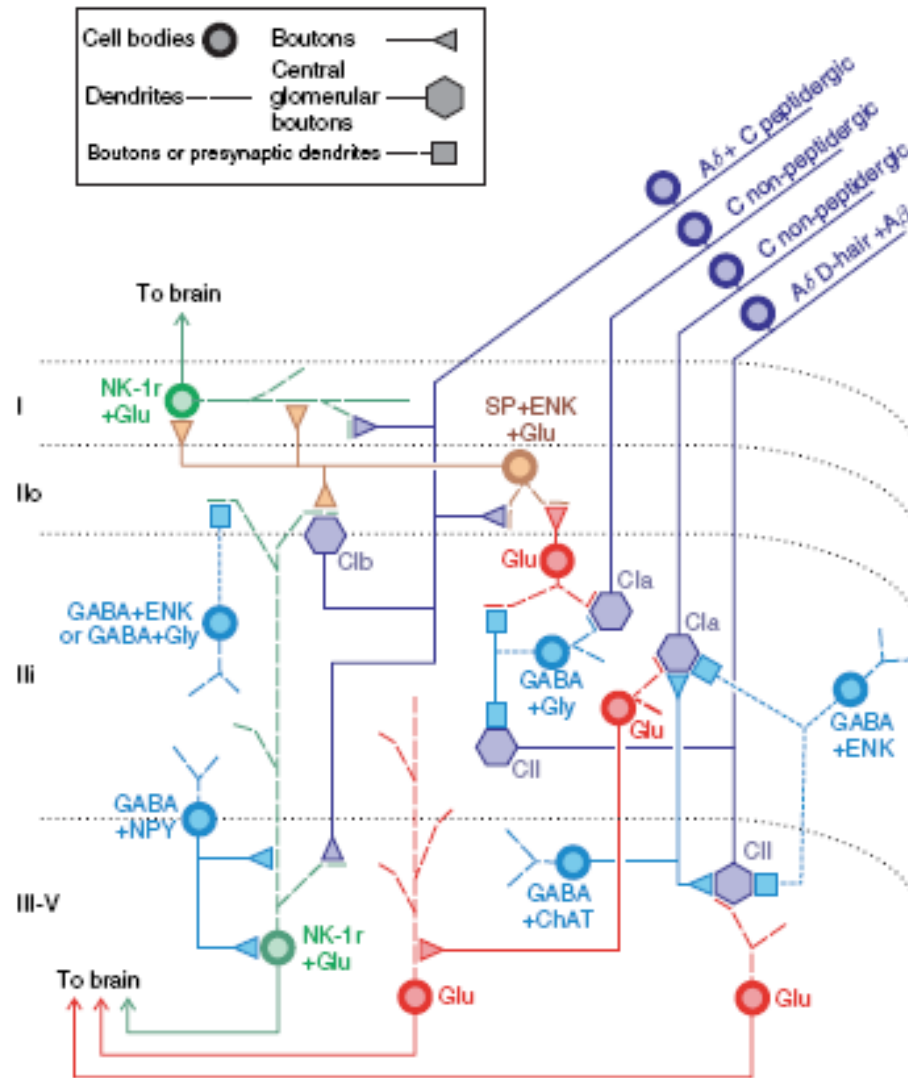


Figure 20 : Modèle du réseau neuronal de la corne sensorielle créé à partir des données de la littérature actuelle (Ribeiro-Da-Silva and De Koninck, 2008).

Lamina III

Les neurones de la lamina III sont principalement des neurones sensibles aux stimulations mécaniques d'intensité non douloureuse (Price and Mayer, 1974). Par contre, on trouve

aussi quelques neurones qui réagissent également aux stimuli nociceptifs mécaniques, thermiques ou chimiques. Les entrées monosynaptiques provenant du DRG innervant cette couche passent par des fibres A δ et A β (*Figure 15*). La fonction ou l'importance de la lamina III dans la nociception est encore inconnue. Certains vont même jusqu'à décrire la lamina III comme étant comparable à la partie extérieure de la lamina II. On retrouve chez le rat et le primate quelques neurones de projection reliant cette couche aux noyaux de la colonne dorsale (Rustioni et al., 1979; Giesler et al., 1984). Comme pour la lamina II intérieure, le PKC γ dans les neurones est régulé à la hausse suite au développement de douleurs chroniques ou d'inflammation (Ribeiro-Da-Silva and De Koninck, 2008; Polgar et al., 1999).

Lamina IV

Au niveau de cette couche, on continue à avoir une prédominance de neurones avec des entrées provenant de stimuli mécaniques non douloureux (56%), mais on commence à avoir une proportion grandissante de neurones réagissant aussi aux stimulations douloureuses (neurones WDR) (37%) et un très faible taux de neurones purement nociceptif (6%) (Light and Durkovic, 1984). Cette couche semble être liée au noyau cervical latéral, car un nombre considérable des neurones de cette couche sont projetés à ce noyau. La fonction spécifique de ce faisceau spinocervical est encore inconnue, mais l'équipe du Dr. Willis a avancé que cette voie pourrait être une voie alternative de transmission douloureuse dissociée de la voie spinothalamique (Willis and Westlund, 1997).

Lamina V et VI

Les couches profondes sont connues pour contenir une proportion importante de neurones sensibles à un large spectre d'intensité de stimulation mécanique (neurones WDR) et de neurones purement nociceptif (neurones NS), ainsi qu'une faible proportion de neurones sensibles aux stimuli non douloureux. Les couches sensorielles profondes sont aussi connues comme étant la localisation principale des neurones de la voie spinothalamique

(STT) dont une bonne proportion répondent aux stimulations nociceptives (Hillman and Wall, 1969).

Ce qui est surprenant avec la lamina V et qui contraste avec les couches superficielles, c'est que très peu d'entrées nociceptives provenant du DRG y connectent de manière monosynaptique ; principalement les fibres A β non nociceptives s'y connectent directement (*Figure 15*). Cela veut donc dire que, malgré l'implication nociceptive de cette couche, la majorité des entrées nociceptives se font par l'intermédiaire d'un réseau d'interneurones locaux.

À cause du taux important de neurones de projection et de neurones nociceptifs, la lamina V, au même titre que la lamina I, est considérée comme une région primordiale dans le mécanisme spinal d'encodage de la nociception. Une abondante littérature est disponible sur les couches profondes de la moelle épinière dans le contexte de la douleur (Dubner et al., 1989; Willis et al., 1974; Willis et al., 1975). Le problème est que la très grande majorité de ces études ont été faites dans les années '70 et '80, ce qui fait que plusieurs concepts plus récents dans le domaine, souvent avancés pour les couches superficielles, n'ont pas été vérifiés pour les couches profondes. Dans la littérature, les couches superficielles et les couches profondes sont souvent opposées et certains vont même jusqu'à décrire les couches superficielles comme étant composées uniquement de neurones NS et les couches profondes, uniquement WDR, ce qui est loin d'être le cas (Leem et al., 1994).

À cause de la différence temporelle entre la majorité des études sur les couches profondes et les couches superficielles, je considère que le « combat » entre les deux ne se fait pas à armes égales. Selon moi, l'étude des couches profondes de la moelle est une niche importante pour la recherche sur la douleur puisque les théories et hypothèses émises au cours des dernières années n'ont souvent été vérifiées que sur les couches superficielles. Plusieurs nouvelles technologies qui ont le potentiel de répondre à de précieuses questions sur cette région n'existaient tout simplement pas à l'époque de la majorité des recherches sur ces neurones.

Type de neurones

Les études *in vivo* sur la moelle épinière utilisent comme principal critère de séparation la sensibilité des neurones aux différents stimuli naturels. Au cours de ma thèse, je me suis concentré sur le côté mécanique de la nociception, donc les différentes descriptions seront faites uniquement en relation avec des stimulations naturelles mécaniques. Il est important de garder en tête qu'une littérature aussi abondante, sinon plus, existe pour les stimulations thermiques.

Dans la très grande majorité des articles, les tests de sensibilité des neurones de la moelle épinière utilisent une technique qualitative de caractérisation surnommée le « brush, press, pinch ». Cette technique simple consiste à appliquer trois différents stimuli sur le champ récepteur : brosser avec un pinceau à poils souples la patte de l'animal (brush), appuyer avec un poinçon sur la patte (press) et pincer avec une pince (pinch). Les neurones sont classés selon leur réponse à ces trois stimuli. Cette technique a deux principaux défauts. Premièrement, la reproductibilité : l'intensité des stimulations à appliquer est très subjective et varie de manière importante entre les différents utilisateurs et laboratoires. Deuxièmement, ces trois stimuli représentent en théorie trois niveaux d'intensité de stimulation mécanique, mais les caractéristiques de ces stimulations sont très différentes entre elles. Le « brush » stimule une plus grande surface et est dynamique, le « press » génère une stimulation statique unidirectionnelle sur une surface de la taille du poinçon tandis que le « pinch » stimule par les deux côtés de la pince et sur une aire différente du « press » (Leem et al., 1994).

Plus récemment, certaines études ont commencé à utiliser des stimulations quantitatives. Je souligne (Andrew and Craig, 2002) qui utilise un système très précis de stimulation mécanique ; mais leur utilisation en électrophysiologie est encore marginale. Une stimulation mécanique quantitative précise et stable est difficile à obtenir à cause de l'adaptation de la peau durant de longues ou intenses stimulations (enfouissement de la peau). Cet enfouissement provoque une variation de la force initialement appliquée, d'où l'importance de l'utilisation d'un stimulateur en réaction de force qui permet une

correction constante de la force générée pour conserver une stimulation stable (voir Chapitre 2).

Au niveau de la réponse aux stimuli mécaniques, une classification élémentaire est utilisée depuis de nombreuses années et divise les neurones de la moelle en trois groupes : les non nociceptifs (NN), les nociceptifs spécifiques (NS) et les neurones à large gamme de réponses (WDR) (Chung et al., 1986). Il est important de spécifier que cette classification est uniquement basée sur la réponse des neurones en relation avec une stimulation périphérique ; ces neurones peuvent donc être des neurones de projection autant que des interneurons inhibiteurs ou excitateurs.

(NN) Neurone non nociceptif ou à faible seuil (LT)

Les neurones NN, ou LT sont classiquement décrits comme des neurones ayant une réponse plus forte ou plafonnée lors de la stimulation de « brush ». Comme leur réponse est maximale/saturée au niveau de cette stimulation non douloureuse, on considère ces neurones comme ne participant pas à l'encodage de la nociception dans la moelle épinière, du moins pas à la nociception physiologique. Les neurones NN ou LT sont les moins étudiés dans le domaine, certainement parce qu'on suspecte qu'ils ne jouent pas un rôle d'importance dans la douleur. Ce pourrait aussi être parce que ces neurones se retrouvent en faible proportion dans les lamina les plus étudiées pour la douleur. Ils sont pratiquement absents dans la lamina I, et présents en faible proportion dans les couches profondes (13% des STT (Chung et al., 1986)).

(WDR) Neurone à large gamme de réponses

Selon la même classification, les WDR sont des neurones qui répondent aux trois types de stimuli : « brush, press, pinch », mais aussi avec une réponse graduée entre chacune des supposées « intensités » de stimulation. La particularité des neurones WDR est qu'ils semblent encoder au moins deux types d'information : l'information non nociceptive et nociceptive. Les WDR reçoivent des entrées provenant des neurones d'afférences de tous les types ($A\beta$, $A\delta$ et C) ce qui explique leur large gamme de réponses (Wagman and Price,

1969). Ces neurones semblent aussi être capables, d'une certaine manière, de quantifier l'intensité de stimulation, car ceux-ci semblent avoir un taux de décharge en relation avec l'intensité de la stimulation. Cette propriété d'encodage d'intensité doit tout de même être confirmée dans des études avec une série de stimuli quantitatifs (voir Chapitre 2). Ces neurones se retrouvent principalement au niveau des couches profondes et sont décrits comme la population principale dans cette région (65% des STT (Chung et al., 1986)). Les WDR sont aussi décrits comme ayant un taux de décharge maximal plus élevé que les autres types de neurones (Dougherty and Willis, 1992a). La participation de ces neurones dans l'encodage nociceptif sera discutée plus loin dans cette thèse.

(NS) Neurones nociceptifs spécifiques

Comme leur nom le dit, les NS sont des neurones qui ne répondent qu'à des intensités douloureuses. Dans la classification classique, ces neurones ne réagissent qu'aux « pinch » ou « squeeze », très faiblement au « press » et aucunement au « brush » (Chung et al., 1986). Les NS reçoivent les entrées sensorielles provenant des fibres d'afférence de type A δ et C en condition contrôle et des entrées polysynaptiques A β lors de l'application d'un antagoniste des récepteurs GABA_A et glycinergique (Torsney and MacDermott, 2006). Certaines des hypothèses pouvant expliquer cette nouvelle communication avec des fibres non nociceptives sont amenées dans la section « Théorie sur les causes des douleurs neuropathiques » plus loin dans cette thèse. Comme mentionné plus haut les NS sont présents en plus grand nombre dans les couches qui ont une forte proportion de neurones de projection : principalement la lamina I, et la lamina V dans une proportion plus faible. Les neurones NS sont particulièrement importants dans cette thèse et plusieurs de leurs particularités seront décrites dans d'autres sections.

Types d'entrées synaptiques

Récepteur glutamatergique

Le principal neurotransmetteur excitateur de la corne dorsale de la moelle épinière est le glutamate. Celui-ci se lie à deux grandes classes de récepteurs : les canaux ionotropiques et les récepteurs métabotropiques. Les canaux ionotropiques sensibles aux glutamates sont les récepteurs AMPA (α -amino-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique acid), NMDA (*N*-méthyl-D-aspartate) et kainate.

AMPA

Le récepteur AMPA est un canal ionique qui, une fois ouvert par la liaison avec un de ses agonistes, laisse passer les cations, principalement le calcium, le sodium et le potassium. Dans la corne dorsale de la moelle épinière, les sous-unités prédominantes du récepteur AMPA sont les GluR1 et GluR2 (Jakowec et al., 1995b;Jakowec et al., 1995a). Le récepteur AMPA a été particulièrement étudié au niveau de l'hippocampe et l'implication de la régulation de l'adressage « trafficking » de ce récepteur dans la potentialisation ou dépression à long terme « LTP » « LTD » a été clairement démontrée. Certaines études ont suggéré que ce même mécanisme soit celui impliqué dans la sensibilisation spinale nociceptive (Galan et al., 2004). Ils ont montré que, suite à une stimulation douloureuse viscérale, il y a une augmentation de l'adressage à la membrane de la sous-unité GluR1 (Galan et al., 2004; Ji et al., 2003). Ce mécanisme semble aussi être lié à la protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante II « CamKII », car l'inhibition de celle-ci bloque l'augmentation de la fraction plasmique à la membrane de la sous-unité GluR1 (Galan et al., 2004; Wang et al., 2010).

NMDA

Le récepteur NMDA est aussi un canal qui laisse passer les cations calcium, sodium et potassium ; par contre, celui-ci nécessite, en plus de la présence d'un agoniste, la dépolarisation du neurone pour enlever l'ion de magnésium. Cet ion agit comme une barrière empêchant le passage des ions sans la dépolarisation. La sous-unité NR1 est très

fortement exprimée dans la corne dorsale de la moelle épinière et pourrait même être exprimée dans toutes les cellules (Watanabe et al., 1994). Ce récepteur est encore plus souvent associé à la potentialisation à long terme que le récepteur AMPA dans les études sur l'hippocampe. Dans le domaine de la nociception, plusieurs groupes affirment, principalement le groupe du Dr. Sandkühler, que la potentialisation à long terme « LTP » observée est complètement médiée par le récepteur NMDA. Pour le démontrer, ils bloquent son apparition par l'application de faible dose de son antagoniste (Benrath et al., 2005; Drdla and Sandkuhler, 2008; Liu et al., 1998). Ces études et plusieurs autres semblent montrer un lien entre la sensibilisation nociceptive, la « LTP » et le canal NMDA.

Kainate

Les récepteurs Kainate sont beaucoup moins étudiés dans la moelle épinière, mais sont aussi des canaux ioniques perméables au sodium et potassium. Leur perméabilité au calcium est plus faible et une leur ouverture est moins longue que le récepteur AMPA (Huettner, 2003). Pour ce qui est des récepteurs métabotropiques glutamatergiques, ils sont aussi présents dans la moelle épinière et le mGlu5 est le plus abondant (Jia et al., 1999). Des données récentes semblent montrer une potentialisation des effets des opioïdes lorsque combinés avec une administration d'antagoniste mGlu5 indiquant une possible implication dans le système douloureux (Akgun et al., 2013).

Inhibition

Dans la moelle épinière, on retrouve principalement deux neurotransmetteurs médiant l'inhibition : l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et la glycine.

GABA_A

La majorité des récepteurs au GABA dans la moelle sont de type GABA_A. Il s'agit de récepteurs à cinq sous-unités perméables principalement aux ions chlorure et de manière moins importante à d'autres anions, comme les ions bicarbonates (HCO³⁻). Dans des conditions physiologiques, lorsque le GABA ouvre le canal GABA_A, l'entrée d'ions

chlorures génère une hyperpolarisation membranaire et une réduction de la fréquence de décharge neuronale. Les neurones GABAergique sont très présents dans la moelle épinière (24-33% des neurones dans les laminae I-III et 28-46% pour l'ensemble de la moelle (Todd and McKenzie, 1989; Todd and Sullivan, 1990). Dans la corne dorsale, le système GABAergique participe à la fois à l'inhibition présynaptique sur les terminaisons des fibres d'afférence primaire et post-synaptique sur les neurones de la moelle épinière. Cette double inhibition complexifie l'interprétation de plusieurs expériences pharmacologiques modulant le système GABAergique dans la moelle. On a découvert jusqu'à maintenant 20 sous-unités différentes et celles-ci ont pu être clonées (α 1-6, β 1-4, γ 1-3, ρ 1-3, δ , ϵ , π and θ). Une combinaison des sous-unités α 3, β 3, γ 2 est présente dans toute la corne dorsale de la moelle épinière et la sous-unité α 1 apparaît dans les couches profondes (Bohlhalter et al., 1996). Plusieurs études sont menées pour déterminer la participation de chacune des sous-unités aux différentes facettes d'une activation GABA_A. En connaissant les différents effets de chacune des sous-unités, il serait possible de cibler les effets recherchés et de diminuer les effets secondaires. Par exemple, la sous-unité α 1 semble être liée au côté sédation et amnésie des benzodiazépines, ce qui veut donc dire qu'un composé sélectif qui éviterait ou diminuerait l'interaction avec α 1 réduirait les effets de somnolence des benzodiazépines (Figure 21) (Zeilhofer et al., 2009).

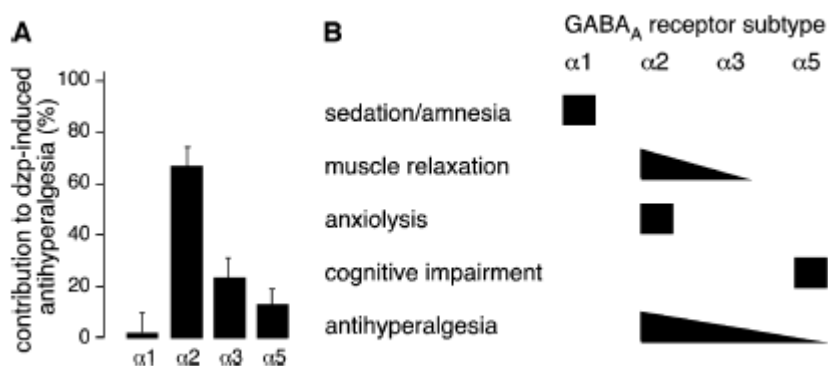


Figure 21 : Effet différentiel des différentes sous-unités GABA_A (Zeilhofer et al., 2009).

GABA_B

Le GABA_B est aussi un récepteur sensible au GABA présent dans la moelle épinière. Ce récepteur métabotrope est lié aux canaux potassiques (K⁺) via les protéines de type G (Chen et al., 2005). La fonction de ce récepteur est, comme pour le GABA_A, d'hyperpolariser la cellule en permettant l'ouverture des canaux potassiques. L'action est moins directe que pour l'ouverture du canal GABA_A. Des études ont démontré la présence de GABA_B, ou du moins pour les sous-unités GABA_BR1 et GABA_BR2, en haute concentration dans les couches superficielles de la corne dorsale (Margeta-Mitrovic et al., 1999).

Glycine

Contrairement aux aires supérieures, en excluant le cervelet, l'inhibition au niveau de la moelle épinière est gérée de manière importante par un autre canal perméable aux ions chlorures, le récepteur glycinergique. Comme pour le canal GABA_A, le récepteur glycinergique est une combinaison de 5 sous-unités formant un canal perméable aux ions chlorures. Chez le rat adulte, les récepteurs glycinergiques sont principalement composés d'une combinaison de $\alpha 1/\beta$ dans la majeure partie de la moelle épinière. Par contre, au niveau des couches superficielles, on retrouve en plus la sous-unité GlyR $\alpha 3$ dans le pentamère (Harvey et al., 2004). Je tiens à soulever deux points importants au sujet des récepteurs glycinergiques. Premièrement, contrairement au GABA_A, on ne retrouve pas de glycine présynaptique sur les neurones d'afférence primaire, mais seulement au niveau post-synaptique des neurones de la corne dorsale. Ceci implique que le système d'inhibition glycinergique n'affecte pas l'information provenant des afférences primaires avant que celle-ci ne soit entrée au niveau de la corne dorsale (Todd and Spike, 1993). Autre point important : dans la corne dorsale, il y a une forte colocalisation et donc, le co-relargage des deux neurotransmetteurs (Glycine et GABA) est présent au niveau présynaptique principalement dans les couches superficielles (environ 30-50 % des

neurones sont GABA⁺ et environ la moitié de ceux-ci sont aussi positifs pour la glycine (Spike et al., 1993; Todd and Spike, 1993; Todd et al., 1998). Par contre, plus on descend dans les couches profondes (lamina III et plus), plus la densité des vésicules contenant seulement de la glycine augmente (*Figure 22*) (Zeilhofer et al., 2012).

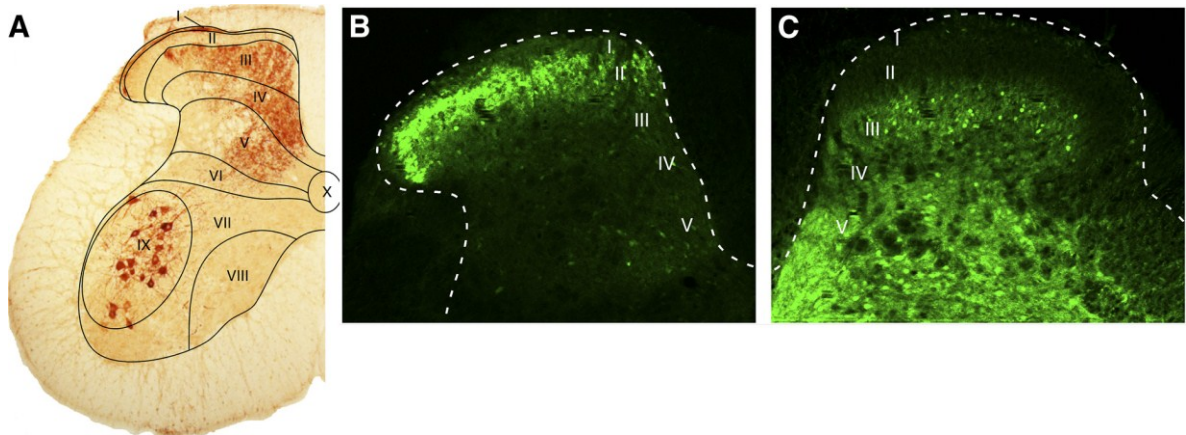


Figure 22 : Visualisation de la distribution des neurones GABAergique et glycinergique dans la corne dorsale de la moelle épinière.

A : Différentes lamina de la moelle. B : Distribution des neurones GABAergiques visualisés par expression de EGFP dirigé par le promoteur GAD67. C : Distribution des neurones glycinergiques visualisés par expression de EGFP dirigée par le promoteur Glyt2 (Zeilhofer et al., 2012).

Autre

Une très grande variété de modulateurs existe dans la moelle épinière et même si on se restreint à la nociception dans la corne dorsale de la moelle épinière, la liste est longue : acétylcholine, adénosine, ATP, cannabinoïdes, opioïdes, pour n'en nommer que certains. Les expériences pharmacologiques effectuées dans cette thèse se sont limitées aux drogues modulant l'activité des canaux GABA_A, glycinergique (sensible à la strychnine) et l'activité des cotransporteurs d'ions chlorures. Ces mécanismes seront décrits plus en profondeur ; pour les autres, ils sont bien décrits dans la revue de littérature suivante (Zeilhofer et al., 2012).

Co-transporteurs importants dans le traitement de l'information nociceptive

Un nombre important de recherches a démontré qu'une diminution de l'inhibition dans la moelle épinière par pharmacologie provoquait une allodynie ou hyperalgésie (Loomis et al., 2001; Sherman and Loomis, 1994; Sherman and Loomis, 1995; Sherman and Loomis, 1996; Sivilotti and Woolf, 1994; Sorkin and Puig, 1996; Sorkin et al., 1998). De la même manière, il a même été démontré qu'une augmentation de l'inhibition provoquait une diminution de ces deux problèmes de perception douloureuse (Hwang and Yaksh, 1997; Rode et al., 2005). Les deux canaux modulés dans ces études sont des canaux perméables aux ions chlorures, ce qui veut dire que ces deux canaux sont affectés par le gradient transmembranaire de Cl^- .

En plus, à cause de la très faible concentration intracellulaire de Cl^- , une très faible accumulation d'ions chlorures peut provoquer un changement important dans l'effet net de l'ouverture des canaux perméable aux ions chlorures (Doyon et al., 2011). Cette accumulation a clairement été démontrée dans un modèle animal de douleurs chroniques et serait causée par une déficience dans un cotransporteur d'ions chlorures (KCC2) qui a pour fonction de faire sortir les ions chlorures accumulés pour maintenir une concentration intracellulaire stable (Coull et al., 2003; Coull et al., 2005). À cause de leur importance dans l'ensemble du système inhibiteur de la moelle épinière et aussi à cause de leur implication dans les douleurs chroniques, le cotransporteur sodium-potassium-chlore (NKCC1) et le cotransporteur potassium chlore (KCC2) seront décrit plus en détail.

Cotransporteur Sodium–Potassium-Chlore NKCC1

Le NKCC1 permet d'accumuler les ions chlorures intracellulaires. Cette fonction a une importance particulière dans le traitement de l'information sensorielle au niveau de la moelle épinière. Une forte concentration de ce co-transporteur est présente au niveau des neurones d'afférences primaires chez les animaux matures (Alvarez-Leefmans et al., 2001; Price et al., 2006). Ceux-ci maintiennent une concentration de Cl^- intracellulaire élevée (*Figure 23*). Cette concentration provoque ainsi une faible dépolarisation au lieu

d'une inhibition lors de l'ouverture des canaux GABA_A. Ce mécanisme, souvent appelé dépolarisation des afférences primaires (PAD), peut être induit par deux types de connexion. Le PAD est généré soit directement par les entrées sensorielles, soit par des voies descendantes connectées à des interneurons GABAergiques qui, eux, font des connexions axo-axonique sur les terminaisons centrales des afférences primaires. Contrairement à ce qu'on pourrait croire, en condition normale, cette faible dépolarisation a un effet net inhibiteur à cause de la combinaison d'une inactivation des canaux sodiques induite par une dépolarisation et d'une « shunting inhibition » (Price et al., 2009).

Même si cette action a pour effet une modulation des entrées sensorielles et nociceptives, la participation du NKCC1 dans la pathologie des douleurs chroniques n'a pas encore été clairement élucidée. Une des hypothèses est qu'une petite dépolarisation pourrait s'amplifier, provoquer par une augmentation de l'activité de NKCC1, et devenir suffisante pour générer des potentiels d'action directement dans les fibres nociceptives, générant ainsi une fausse entrée nociceptive (Price et al., 2009). Cette hypothèse n'a par contre pas encore été clairement démontrée pour le développement des douleurs neuropathiques, mais semble bien acceptée pour l'inflammation.

Primary afferents

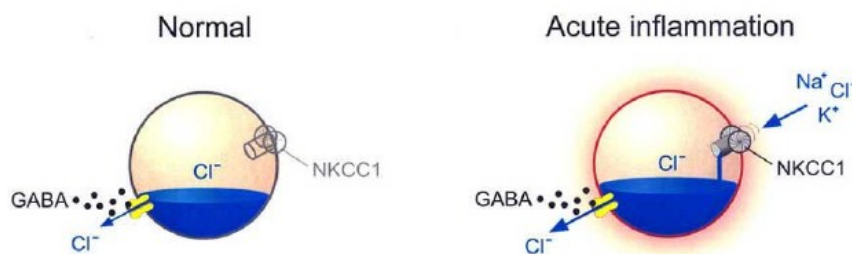


Figure 23 : Schématisation de l'effet d'une augmentation de l'activité du NKCC1 dans les neurones d'afférences primaires dans l'inflammation. (Price 2005)

Cotransporteur Potassium-Chlore KCC2

Le co-transporteur KCC2 a pris une importance particulière au cours des dernières années dans le domaine de la douleur neuropathique. Le KCC2 appartient à la famille des SLC12 des cotransporteurs cations chlorure (CCC). Il est présent chez l'animal adulte principalement au niveau des neurones sensoriels de la corne dorsale, mais pas au niveau des neurones d'afférences primaires comme le NKCC1. Alors que le NKCC1 a pour fonction de faire entrer du Cl⁻ dans la cellule, le KCC2 a pour fonction de l'expulser de la cellule et ainsi, de maintenir la faible concentration d'ions chlorures intracellulaires. Cette concentration est maintenue aux environs de 6 mM en condition normale. Ce rôle de contrôle d'homéostasie est primordial pour l'inhibition spinale, car les deux principaux systèmes inhibiteurs au sein de la moelle épinière, GABA_A et Glycine, sont des canaux avec une perméabilité aux ions chlorures. À cause de la très grande différence entre la concentration extracellulaire (≈ 120 mM) et intracellulaire (≈ 6 mM), une perte de l'homéostasie des ions chlorures dans la cellule peut avoir des effets drastiques, car une très faible variation aura un impact important le gradient transmembranaire. À l'inverse, une variation plus importante des ions chlorures extracellulaire, par exemple de plusieurs mM, aurait un effet moins radical (Doyon et al., 2011; Labrakakis et al., 2011).

Nous décrivons plus en détail les implications de ce co-transporteur dans les douleurs neuropathiques dans les chapitres 2 et 3.

Organisation des voies de projection

Faisceau spinothalamique (STT)

Au niveau de la perception douloureuse, on considère le faisceau spinothalamique comme l'un des plus importants faisceaux de projection aux aires supérieures. L'importance de cette voie a été appuyée par la pratique clinique lors d'opérations chirurgicales extrêmes qui consistaient à couper le faisceau spinothalamique pour aider les personnes souffrant de douleurs insupportables. Ces chirurgies ont eu des effets à court terme très impressionnants

sur la douleur, soit une disparition complète ou une diminution très importante de la perception douloureuse (Cetas et al., 2008; Meglio and Cioni, 1981). Les corps cellulaires des neurones de ce faisceau sont situés dans les couches I, IV, V, VI et VII de la moelle et, après décussation spinale, leurs projections vont directement au thalamus. Les deux régions principales de projection de l'information nociceptive au thalamus sont : le noyau thalamique ventromédian (VPM) et le noyau ventro postérieur latéral (VPL). Les neurones STT sont WDR, NS et même, certaines études chez le singe témoignent d'une faible population de NN. Les STT sont souvent associés aux fonctions de localisation, de perception de l'intensité et du type de douleur (Chung et al., 1986; Guirimand and LeBars, 1996; Willis and Westlund, 1997).

Faisceau spinomésencéphalique

Chez le primate, les corps cellulaires des neurones composants ce faisceau sont situés au niveau de la lamina I et IV-VI, mais certains ont aussi été trouvés au niveau de la corne ventrale. D'autres données démontrent aussi que certains neurones spinomésencéphaliques ont des connexions collatérales vers le thalamus (Zhang et al., 1990). Ce faisceau a été associé à plusieurs fonctions en relation avec la douleur : le caractère aversif de la douleur, l'activation du contrôle inhibiteur descendant. Certaines études ont montré que lorsque cette voie est stimulée, elle provoque une analgésie. À la lumière de ces données, certains spécialistes avancent que cette région pourrait servir à limiter la nociception (Rees and Roberts, 1993).

Faisceau spinoréticulaire

Ce faisceau est composé de neurones qui proviennent des couches profondes et très profondes et de la corne ventrale, mais il comprend aussi les neurones spinoparabrachiaux, qui ont été étudiés plus en profondeur ces dernières années pour leur participation dans la douleur (décrit plus en détail dans le paragraphe suivant). Les sites de projection du faisceau spinoréticulaire sont nombreux et un bon nombre de ses neurones sont sensibles préférentiellement aux stimulations douloureuses (Wolstencroft, 1964). On suspecte que la

fonction de ces neurones est de signaler les changements homéostatiques aux centres nerveux autonomes du tronc cérébral (Willis and Westlund, 1997).

Faisceau spinoparabrachial

Le spinoparabrachial est un autre faisceau qui a pris de plus en plus d'importance pour les études en douleur et qui est en fait un sous-groupe du faisceau spinoréticulaire. L'intérêt qu'on lui porte est dû au fait que les neurones qui le composent sont presque exclusivement des neurones de la lamina I, des neurones majoritairement nociceptifs spécifiques (Craig, 1995). Le faisceau spinoparabrachial est connecté au noyau ventromédian de l'hypothalamus et au noyau central de l'amygdale (Bester et al., 2000). Certains associent le spinoparabrachial au côté émotionnel de la douleur.

Faisceau des colonnes dorsales post-synaptiques

Ce faisceau est connu dans la littérature comme étant une voie de transfert de l'information nociceptive provenant des viscères (Cliffer and Giesler, 1989). Dans cette thèse, nous nous concentrons plutôt sur les douleurs somatiques.

Autres faisceaux

Plusieurs autres faisceaux existent, mais ils ont été très peu ou pas étudiés dans le domaine de la douleur et ils ne seront pas décrits dans cette thèse. Plus de détails sur ces autres faisceaux sont disponibles dans les revues de littérature suivantes (Guirimand and LeBars, 1996; Willis and Westlund, 1997).

Organisation au niveau du cerveau

Régions du cerveau

La perception consciente des stimuli externes nécessite plusieurs choses : l'encodage par un organe sensoriel, le traitement par le système sensoriel et l'activation des régions corticales appropriées. Par contre, il a longtemps été postulé que le système douloureux était différent et que la perception consciente de la douleur nécessitait essentiellement le thalamus, cette théorie étant principalement basée sur une série de cas cliniques de lésions du cerveau (Head and Holmes, 1911). Malgré une série de travaux contradictoires à cette théorie, pendant de nombreuses années, on a considéré la participation de la région corticale comme négligeable dans la perception douloureuse. L'importance accordée au cortex et aux régions autres que le thalamus a radicalement changé par la suite, principalement à cause de l'arrivée de nouvelles technologies d'imagerie. Ces techniques permettent d'examiner et de comparer des sujets sains avec des patients et grâce à elles, le rôle du cortex est maintenant bien accepté. On commence même à associer certaines régions corticales et sous-corticales à des rôles spécifiques dans la perception et la modulation douloureuses (Apkarian et al., 2005). On reconnaît qu'une stimulation douloureuse active un réseau complexe comprenant : le cortex somatosensoriel primaire et secondaire (SI, SII), l'insula, le cortex pariétal postérieur, antérieur, cingulaire médian et préfrontal. Ces régions participent à la perception de la douleur, mais aussi au contrôle descendant de la douleur (Treede, 2008).

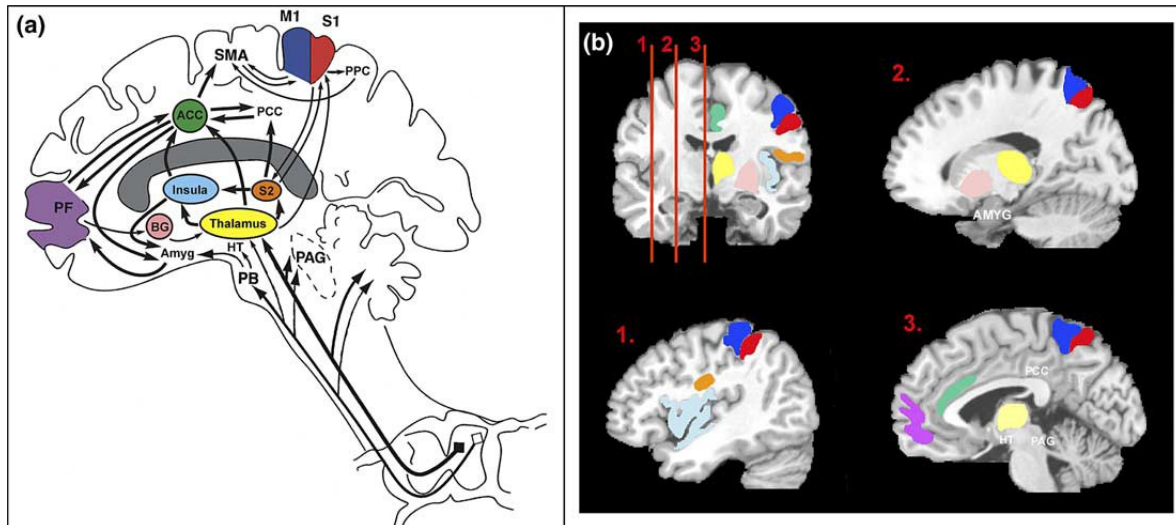


Figure 24 : Régions corticales impliquées dans la perception de la douleur (Apkarian et al., 2005).

Traditionnellement, le concept de perception de la douleur a été rationalisé en trois dimensions : la composante sensori-discriminative, la composante affectivo-motivationale et la composante cognitivo-évaluative (Melzack and EISENBER.H, 1968). La composante sensori-discriminative comprend une discrimination de l'intensité, du type de douleur, de la localisation du stimulus et la discrimination temporelle; cette dimension est traditionnellement associée avec le thalamus et cortex somatosensoriel. La composante affectivo-motivationale comprend la perception déplaisante et désagréable, le côté émotionnel et motivationnel de la douleur ; elle est associée au thalamus, au cortex limbique et à l'insula. La composante cognitivo-évaluative comprend la comparaison avec les expériences précédentes, l'influence cognitive sur la perception douloureuse et sur son importance dans la situation. Présentement, on tente d'associer les résultats d'imageries de certaines régions avec des fonctions dans la douleur plutôt que d'utiliser cette classification en dimensions. On discerne alors les fonctions de localisation et d'analyse du type de douleur, de séquences temporelles, d'attention et de distraction, d'anticipation et d'attente et celle d'empathie. Plusieurs régions ont été associées avec ces fonctions, mais on est

encore loin d'une cartographie précise de la fonction de chacune des régions. Plus d'information est disponible dans la revue de littérature suivante (Apkarian et al., 2005).

Participation des voies descendantes

Au niveau de la douleur, comme dans la majorité des fonctions qu'accomplit le cerveau, celui-ci ne se contente pas de passivement recevoir et interpréter l'information, il participe aussi à sa modulation. Dans le cas de la perception douloureuse, le cerveau accomplit cette fonction à l'aide d'un système que l'on nomme "contrôle descendant". Ce système est un ensemble de régions du cerveau ayant pour fonction, en autres, d'inhiber l'information nociceptive au niveau de la moelle épinière. Plusieurs régions sont impliquées dans ce système de contrôle, mais les plus étudiées (présumées les plus importantes) sont la substance grise périaqueducale (PAG) et le bulbe rostroventral médian (RMV) (*Figure 24*). Des études chez l'animal ont démontré qu'une stimulation électrique du PAG produit clairement un effet analgésique et cet effet est dissocié d'une composante motrice (Reynolds, 1969; Mayer and LIEBESKIJC, 1974). Les mêmes stimulations électriques sont aussi utilisées chez les humains pour le contrôle de la douleur. Une stimulation électrique du PAG administrée durant 10 à 15 minutes deux à trois fois par jour est efficace chez certains patients pour contrôler la douleur (Kumar et al., 1997). On parle souvent de blocage ou diminution de la douleur. Beaucoup d'expériences se sont orientées dans cette direction, mais les voies descendantes ont une fonction de contrôle, et elles ont aussi une fonction de facilitation ou d'amplification de la douleur. Les neurotransmetteurs participants au contrôle descendant sont très nombreux (*Figure 25*) (Millan, 2002), mais les plus connus et étudiés sont les opiacés endogènes, la noradrénaline et la sérotonine (5-HT).

Toutes les expérimentations décrites dans cette thèse ont été faites en préservant les voies descendantes, soit de manière inaltérée dans les tests comportementaux ou modulés par l'anesthésie dans les enregistrements *in vivo*. Cette particularité est importante lorsqu'on veut comparer certains des résultats de cette thèse avec d'autres études qui ont été accomplies chez des animaux spinalisés (Pitcher and Henry, 2000). Dans la majorité des

cas, la spinalisation a un effet excitateur facilement explicable par une perte de contrôle descendant inhibiteur (Pitcher and Henry, 2000).

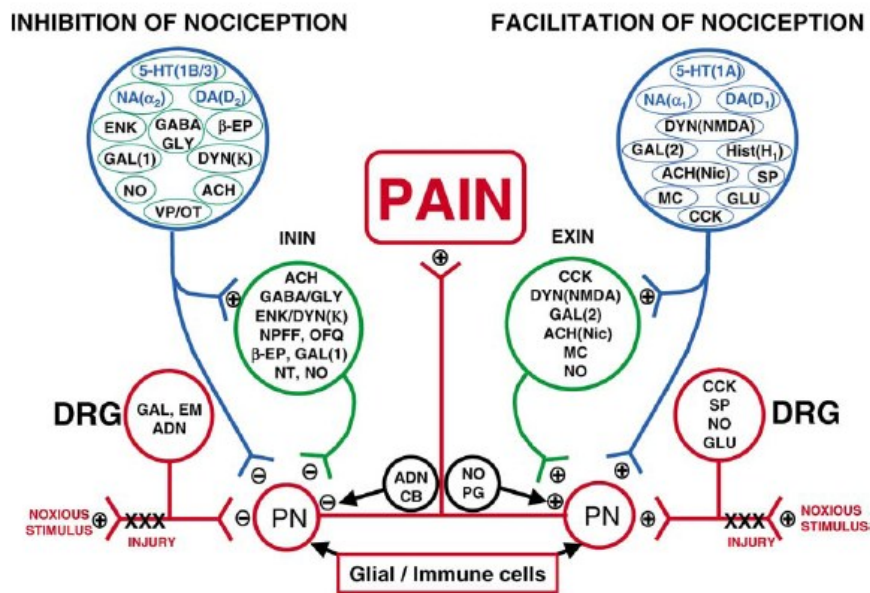


Figure 25 : Schéma représentant la complexité des différents éléments modulant la nociception, affectant ainsi la perception de la douleur (Millan, 2002).

Encodage spinal de la nociception

Théorie l'encodage spinal nociceptif

Théorie du portillon

En 1965, une publication a révolutionné le domaine de la douleur. Professeurs Melzack et Wall ont amené une nouvelle théorie sur la façon dont les neurones de la moelle épinière intègrent l'information nociceptive et non nociceptive (Melzack and Wall, 1965). Cette

théorie, qui fut nommée *théorie du portillon*, expliquait beaucoup des observations faites à l'époque et expliquait également le comportement instinctif universel d'appliquer une pression sur un site de douleur pour obtenir un soulagement. Cette théorie, schématisée dans la (Figure 26), montre que les fibres à large diamètre non nociceptives inhibent les entrées nociceptives provenant des fibres à faible diamètre, bloquant ainsi l'activité des neurones nociceptifs de projection. Étonnamment, malgré le fait que cette théorie a près de 50 ans, elle peut encore expliquer une bonne partie des résultats plus récents de la littérature avec un peu d'actualisation.

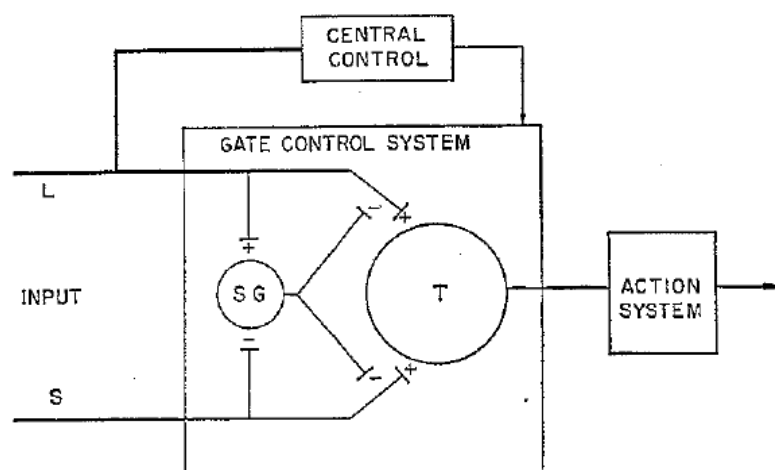


Fig. 4. Schematic diagram of the gate control theory of pain mechanisms: *L*, the large-diameter fibers; *S*, the small-diameter fibers. The fibers project to the substantia gelatinosa (*SG*) and first central transmission (*T*) cells. The inhibitory effect exerted by *SG* on the afferent fiber terminals is increased by activity in *L* fibers and decreased by activity in *S* fibers. The central control trigger is represented by a line running from the large-fiber system to the central control mechanisms; these mechanisms, in turn, project back to the gate control system. The *T* cells project to the entry cells of the action system. +, Excitation; -, inhibition (see text).

Figure 26 : Schéma de la théorie du portillon (Melzack and Wall, 1965).

Théorie des motifs de décharge

Dans les années qui ont suivi la découverte de la *théorie du portillon*, plusieurs études électrophysiologiques ont été effectuées et ont mené à la découverte de deux types de neurones que j'ai mentionnés plus tôt, les nociceptifs spécifiques (NS) et les wide dynamic range (WDR). Durant ces années, la tendance était à l'enregistrement dans les couches

profondes de la corne dorsale (lamina IV-VI), là où se trouve une forte concentration de WDR, ce qui, selon moi, a aussi influencé la multitude de recherches sur les WDR faites à cette époque. La capacité d'encoder l'intensité de stimulation à la fois dans la plage non nociceptive et dans la nociceptive faisait des WDR l'encodeur parfait pour quantifier à la fois le tactile et le douloureux.

Cette théorie tient pour acquis que l'ensemble des entrées provenant des fibres d'afférences primaire converge vers les WDR de projection au cerveau. Une fois au cerveau, ce serait celui-ci qui intégrerait et interpréterait la fréquence de décharge ou les modes de décharge des WDR pour déterminer si une stimulation est douloureuse ou seulement tactile. Selon cette théorie, l'implication de la moelle épinière dans les douleurs neuropathiques s'expliquerait par une augmentation de la fréquence de décharge des WDR de projection, « trompant » ainsi le cerveau qui ferait une interprétation exagérée de la stimulation réelle (Dubner et al., 1989; Wall, 1995).

Théorie des voies spécifiques

Plus récente que la théorie des motifs de décharge, la théorie des voies spécifiques décrit deux voies en parallèle : une nociceptive et une non nociceptive. Partant de la périphérie, l'information non nociceptive voyage par les fibres répondant aux stimulations tactiles sur un réseau spécialisé non nociceptif qui permettra au cerveau d'identifier et de quantifier les informations tactiles. De la même manière, les différentes fibres répondant aux stimulations nociceptives sont transmises à un réseau spécifique nociceptif et les informations seront intégrées et interprétées par le cerveau comme de la douleur (Craig et al., 1994; Han et al., 1998; Yu et al., 2005; Keller et al., 2007). Un des problèmes majeurs qu'ont rencontrés les partisans de cette théorie quand est venu le temps de convaincre la communauté scientifique de la douleur est : comment expliquer la condition pathologique avec cette théorie ? Plus précisément, si les voies nociceptives et tactiles sont séparées l'une de l'autre, cela veut donc dire que la voie nociceptive reçoit exclusivement des entrées provenant des fibres sensorielles réagissant uniquement aux stimulations

douloureuses. Dans ce cas, comment peut-on expliquer une diminution du seuil douloureux (allodynie) dans les douleurs neuropathiques sans une diminution du seuil des fibres elles-mêmes ? La réponse à cette question a principalement été amenée par deux études (Baba et al., 2003; Torsney and MacDermott, 2006) qui ont démontré que l'on pouvait avoir une réponse de fibres A β (non nociceptives) dans un neurone qui ne répondait qu'aux fibres nociceptives lorsqu'on bloque l'inhibition GABA_A et glycinergique par application pharmacologique locale. Ceci démontre l'existence d'une connexion entre les deux voies, une communication parallèle «cross-talk» qui est normalement réprimée par un système inhibiteur. Ce système inhibiteur, lorsqu'on applique les antagonistes des récepteurs GABA_A et glycinergiques, laisse (totalement ou partiellement) l'information provenant de la voie non nociceptive entrer dans la voie nociceptive. On suspecte que cette désinhibition est à l'origine de l'hypersensibilisation douloureuse qui survient dans les douleurs neuropathiques et qui est schématisée dans la *Figure 28*. Le chapitre 2 amène aussi de nouveaux éléments importants pour cette théorie.

Motifs de décharge vs spécificité

Bien sûr, ces deux théories sont difficiles à réconcilier l'une avec l'autre et dans le domaine, encore aujourd'hui, les spécialistes sont divisés à ce sujet (Perl, 1998; Craig et al., 1994; Craig, 2003b; Wall, 1995). Comment le système encode-t-il l'information nociceptive : est-ce par les neurones WDR des couches profondes (théorie des patrons de décharge) ou par les NS des couches superficielles et profondes (théorie des voies spécifiques)? Les partisans d'un encodage par les WDR utilisent l'argumentaire que la douleur est quantifiable en intensité tout comme la réponse des WDR, contrairement aux NS qui semblent avoir une réponse de type actif/inactif ou «on/off» et qu'avec une telle réponse encoder l'intensité est impossible. Leur argument est souvent appuyé par une étude chez le singe qui corrèle l'activité des neurones WDR avec le temps de détection de la douleur par le singe. Cette étude est très intéressante et expérimentalement très complexe, mais je ne suis pas d'accord avec la portée des conclusions qui sont avancées dans cette étude, qui est décrite comme la preuve que les WDR encodent la nociception (Dubner et al., 1989). La corrélation qui est montrée dans cet article, en plus d'être faite dans un sous-

groupe de WDR sélectionné par les auteurs, ne prouve pas la participation des WDR dans la douleur.

Pour les partisans d'un encodage nociceptif par les NS de la moelle épinière, un des arguments majeurs utilisés est basé sur une analyse du reste du système nociceptif. En analysant les neurones d'afférences primaires, on observe la présence de fibres qui réagissent spécifiquement à différents types de stimulation et les récepteurs sur ces différentes fibres sont eux aussi très sélectifs à certains types de stimuli nociceptifs et non nociceptifs. Pourquoi le réseau serait-il créé d'une manière aussi sélective en amont pour ensuite converger toute cette information vers un neurone WDR indiscriminé où cette sélectivité serait perdue ? Notre laboratoire a aussi montré qualitativement dans un modèle de douleur neuropathique que l'on retrouvait une plus grande concentration de neurones WDR versus NS comparativement aux animaux contrôles. Ces données suggèrent un changement dans une voie spécifique, celle des NS (Keller et al., 2007). Mon projet a aussi apporté beaucoup des précisions sur ce débat (voir chapitre 2).

Interneurones ou neurones de projection ?

Pour être capable de bien interpréter la littérature pour ce qui est de l'encodage sensoriel fait par le réseau nociceptif de la moelle épinière, il faut bien faire attention aux conclusions des études faites sur des neurones non identifiés, qui n'apportent pas d'informations sur la façon dont l'information sortante de la moelle est encodée.

Comme la douleur n'est perçue qu'une fois intégrée par le cerveau, toute pathologie modulant la perception douloureuse liée à la moelle épinière doit se refléter dans l'encodage de l'information chez les neurones de projection. Ce qui veut donc dire que, d'une manière conceptualisée, deux avenues s'offrent à nous pour la découverte d'un traitement pour la maladie complexe que sont les douleurs neuropathiques. La plus utilisée consiste à décortiquer l'ensemble des perturbations dans le réseau de la moelle épinière pour découvrir la cause précise qui entraîne la cascade de changements observée en condition pathologique et cibler cette cause comme avenue thérapeutique. La deuxième

60

avenue est l'étude des voies de projection de la moelle vers le cerveau et l'analyse des modifications dans le message envoyé par ces voies aux aires supérieures; avec ces informations, on peut cibler les voies ascendantes qui sont altérées par la pathologie et tenter de les normaliser par pharmacologie.

Les deux directions de recherche sont aussi bonnes l'une que l'autre. Par contre, il est important d'utiliser la bonne littérature sur le sujet. Dépendamment de laquelle de ces deux directions est envisagée, il est essentiel de travailler sur des neurones bien identifiés, de projection ou locaux, pour se baser sur des conclusions robustes.

Théories sur les causes des douleurs neuropathiques

Renforcement de l'excitation

Lorsqu'on pense à l'allodynie et à l'hyperalgésie, c'est-à-dire une perception douloureuse hypersensible et amplifiée, une des explications les plus intuitives qui vient à l'esprit est un excès d'excitation du système nociceptif. Pour expliquer l'apparition des douleurs neuropathiques, plusieurs groupes, particulièrement celui du Pr Sandkuller, amènent des arguments quant au développement d'une potentialisation à long terme (LTP) provenant des fibres nociceptives (Ikeda et al., 2006) (*Figure 27*). Cette potentialisation provoquerait une augmentation de la transmission aux aires supérieures de toute entrée nociceptive (Sandkuhler, 2009).

Personnellement, je considère que cette théorie a ses failles, comme le fait que les nocicepteurs sur les fibres ont sensiblement le même seuil d'activation en pression que les neurones de projection nociceptifs en condition normale et pathologique (Voir chapitre 2 et références (Delmas et al., 2011;Devor, 2009a)). Pour générer cette LTP grâce aux fibres nociceptives, il faut que le seuil d'activation soit atteint pour que la potentialisation puisse survenir. Ce qui veut donc dire que l'allodynie, une baisse du seuil de douleur, ne peut être expliquée par cette LTP, car le seuil des fibres nociceptives reste inchangé en condition de douleur neuropathique. Par contre, cette LTP pourrait facilement expliquer l'hyperalgésie,

une perception douloureuse amplifiée, car une fois le seuil d'activation des fibres nociceptive atteint, la LTP pourrait potentialiser la réponse du neurone post-synaptique.

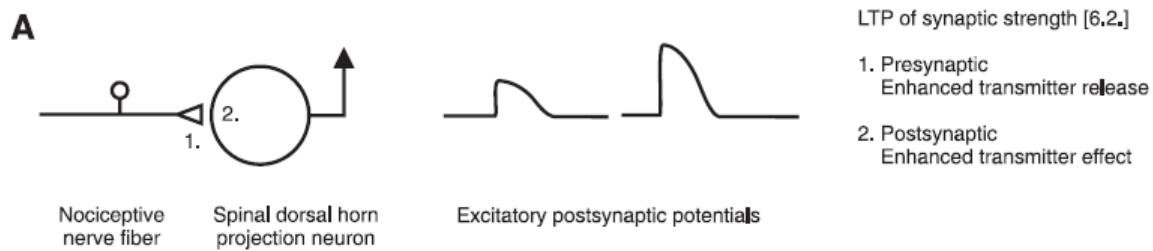


Figure 27 : Schématisation de la potentialisation à long terme (LTP) comme hypothèse expliquant l'allodynie et l'hyperalgésie (Sandkuhler, 2009).

Désinhibition spinale

Tel qu'expliqué dans la section *Théorie des voies spécifiques*, la désinhibition est une des hypothèses quant aux causes des douleurs neuropathiques qui rallie le plus de partisans dans la communauté scientifique. Par contre, les causes supposées de cette désinhibition sont multiples et encore sujettes à débat.

Une des causes possibles lorsqu'on pense à une désinhibition est une perte du nombre de neurones inhibiteurs dans la moelle. Plusieurs groupes ont démontré une mort ou une dégénérescence des neurones inhibiteurs au niveau de la moelle dans certains modèles animaux de douleurs neuropathiques (Castrolopes et al., 1993; Ibuki et al., 1997; Moore et al., 2002; Scholz et al., 2005). Par contre, d'autres études ont démontré que chez d'autres modèles animaux, la perte de neurones inhibiteurs n'est pas nécessaire au développement de l'hyperalgésie associée aux douleurs neuropathiques (Polgar et al., 2004; Polgar et al., 2005). Ces différents résultats laissent donc ouverte la question : doit-il y avoir une perte de neurones inhibiteurs pour que survienne le développement des douleurs neuropathiques ?

Dans un même ordre d'idée, même si le nombre de neurones inhibiteurs demeure semblable, leur fonction inhibitrice pourrait être altérée. Encore une fois, plusieurs possibilités peuvent expliquer un effet présynaptique diminuant l'efficacité d'inhibition : une perte de synthèse de GABA (Eaton et al., 1998; Somers and Clemente, 2002) et une régulation du relargage de GABA/glycine par plusieurs agonistes ou mécanismes différents (Chery and De Koninck, 2000; Baba et al., 1998; Pernia-Andrade et al., 2009) en sont deux exemples.

Une troisième cause possible est une diminution de l'efficacité d'inhibition, mais cette fois, provoquée par un changement post-synaptique. Un de ces changements qui a pu être observé est l'antagonisme des canaux glycinergique par les prostaglandines E2 (PGE2) dans l'inflammation (Guhring et al., 2000; Samad et al., 2001). Par contre, ce mécanisme ne semble pas impliqué dans les modèles de lésion de nerf (Hosl et al., 2006). Une autre modification post-synaptique possible est une accélération dans la cinétique des courants inhibiteurs provoqués par l'ouverture des canaux GABA_A (Chery and De Koninck, 1999). Cette accélération dans la cinétique diminue la charge nette qui entre à chacune des ouvertures, engendrant une perte d'inhibition comme effet final. Une autre hypothèse affectant le côté postsynaptique qui expliquerait la désinhibition est un changement dans l'homéostasie des ions chlorures suite au développement des douleurs neuropathiques. Celle-ci sera expliquée plus en détail dans la prochaine section.

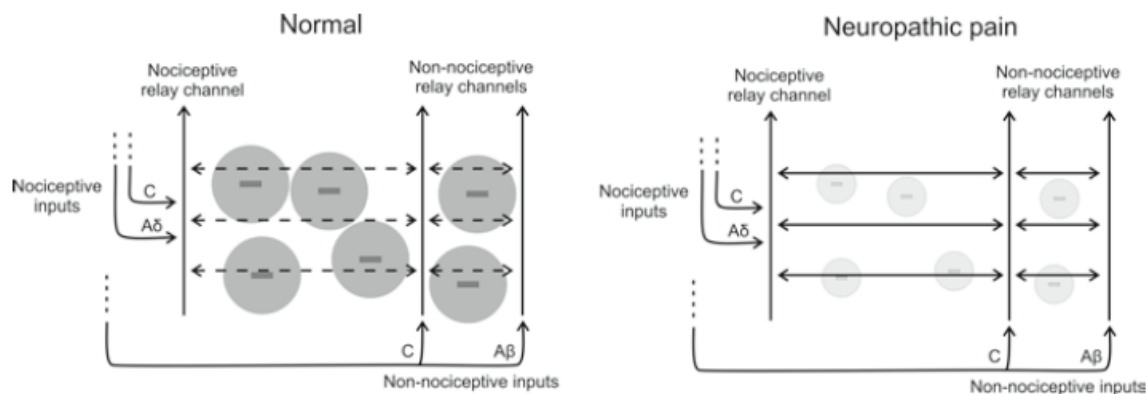


Figure 28 : Schématisation sur la désinhibition comme hypothèse expliquant l'allodynie et l'hyperalgésie (Labrakakis et al., 2011).

Homéostasie du Cl⁻

Il y a plusieurs années, notre laboratoire a démontré une association entre le développement des douleurs neuropathiques et une baisse du KCC2 dans les neurones des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière (Coull et al., 2003). Cette diminution a aussi été démontrée dans plusieurs modèles animaux de douleurs neuropathiques (Lu et al., 2008; Jolivald et al., 2008; Shih et al., 2008; Cramer et al., 2008). Cette baisse du système d'extrusion des ions chlorures provoque une accumulation intracellulaire. Cette accumulation, selon son intensité, induit une diminution de l'amplitude d'hyperpolarisation provoquée par l'ouverture des canaux GABA_A, pouvant même aller jusqu'à provoquer une dépolarisation dans les cas extrêmes (*Figure 29*). L'effet similaire sur les canaux glycinergiques n'a pas encore (voir le chapitre 2) été démontré, mais à cause de la même perméabilité aux ions chlorures, il est logique de penser que le même phénomène surviendrait aussi pour l'inhibition glycinergique.

Par la suite, notre laboratoire a aussi confirmé que la baisse de KCC2 était provoquée par l'action du système immunitaire. Suite à la lésion du nerf périphérique dans le modèle de douleurs neuropathiques, par un lien encore inconnu, la microglie devient activée par l'ATP via le récepteur purinergique 4 (P2X₄) (Tsuda et al., 2003). Une fois activée, la microglie libère un facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) au niveau de la moelle épinière, qui se lie au récepteur tyrosine kinase B (TrkB) (Coull et al., 2005). Cette diminution des niveaux de KCC2 impliquerait des cascades intracellulaires modulées par deux messagers secondaires, soit par la voie Shc/FRS-2 et la voie PLC γ /CREB (Rivera et al., 2004a).

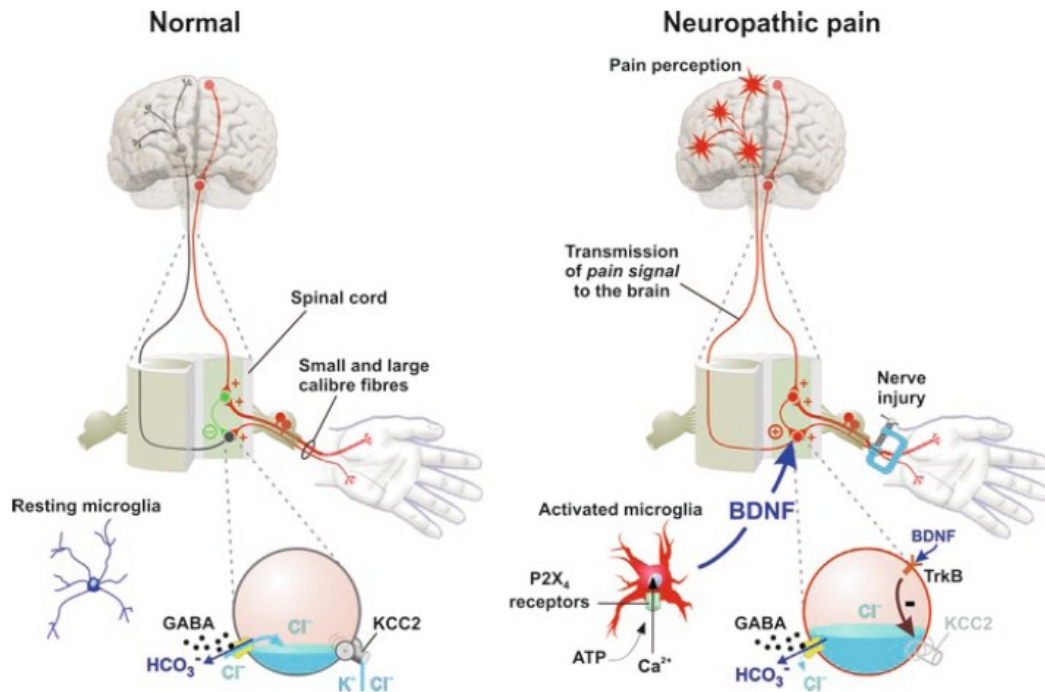


Figure 29 : Vulgarisation des différentes avancées sur le KCC2 et son implication dans les douleurs neuropathiques (Labrakakis et al., 2011).

Nouvelles connexions avec des fibres à faible seuil d'activation

Cette hypothèse quant à la cause des douleurs neuropathiques a été avancée en 1992 (Woolf et al., 1992) par plusieurs chercheurs importants de l'époque. Leurs résultats décrivent un effet semblable à la théorie de la désinhibition, c'est-à-dire la communication d'une voie non nociceptive avec une voie nociceptive (Figure 29), mais par un mécanisme différent. Cette communication serait liée à la génération de nouvelles connexions de fibres myélinisées non nociceptives sur des neurones nociceptifs des couches superficielles (Woolf et al., 1992). Par contre, il est important de noter que cette théorie a été abondamment critiquée et n'est plus très souvent avancée comme hypothèse valide de nos jours.

Autres

Plusieurs autres hypothèses quant aux causes de l'hypersensibilité caractéristique des douleurs chroniques sont présentes dans la littérature. Elles ne sont pas toutes décrites dans cette thèse, mais la majorité est présente en détail dans la revue « Models and Mechanisms of Hyperalgesia and Allodynia » (Sandkuhler, 2009).

Objectifs de la thèse

Objectif général

Contrairement à certains systèmes sensoriels comme la vision, on en connaît très peu sur la manière dont l'information nociceptive est encodée par le système. Pour cibler précisément une dérégulation dans une pathologie complexe comme les douleurs chroniques, on se doit premièrement de comprendre l'encodage que fait le réseau de l'information nociceptive. Dans cette thèse, je me suis concentré sur l'encodage de l'information nociceptive par les neurones spinothalamiques et sur les changements que subit cet encodage dans le développement des douleurs chroniques.

L'orientation des questionnements

Pourquoi la moelle épinière ?

Je me suis concentré sur l'encodage de la nociception, principalement au niveau des neurones de projection vers les aires supérieures. Pourquoi ce choix ? Premièrement, il est important de comprendre que l'intérêt premier était de déterminer les changements qui surviennent suite au développement des douleurs neuropathiques. Une majorité d'études sur cette pathologie parlent d'un changement au niveau spinal qui provoquerait les différents symptômes à long terme de la maladie (Coull et al., 2003; Coull et al., 2005), 2005; (Torsney and MacDermott, 2006; Echeverry et al., 2008). Enregistrer les neurones de

la moelle est donc une cible valable pour l'étude des changements d'encodage nociceptif suite au développement des douleurs neuropathiques.

Pourquoi pas les neurones d'afférences primaires?

Dans la majorité des modèles de douleurs neuropathiques, la lésion est périphérique et affecte donc en premier lieu les neurones d'afférences primaires. Il serait donc logique de croire que les changements qui provoquent l'hypersensibilité et la chronicité de la douleur sont uniquement d'ordre périphérique. Par contre, même si certains groupes sont d'avis opposés (Shim et al., 2005), bon nombre de chercheurs dans le domaine s'entendent pour dire que les modifications au niveau des afférences primaires sont celles qui initient et ou maintiennent les changements spinaux responsables des douleurs neuropathiques. En d'autres mots, si on pouvait affecter seulement les neurones d'afférences primaires en gardant les neurones de la moelle dorsale inaltérés, il n'y aurait pas de développement de douleurs neuropathiques sur le long terme, mais seulement la présence d'une hypersensibilité passagère, comme lors de l'inflammation périphérique (Devor, 2009b; Grace et al., 2011).

Pourquoi les couches profondes ?

Une des grandes questions qui perdure encore à ce jour dans le domaine de la douleur est : quels sont les neurones qui encodent la nociception dans la moelle épinière, les WDR ou les NS ? Nous avons déjà discuté de ce dilemme ailleurs dans cette thèse, mais j'y reviens ici puisque cette question est à la base de la sélection des couches profondes comme lieu d'enregistrement. Dans la dernière décennie, une très forte proportion des études sur la douleur s'est concentrée sur la lamina I (Andrew and Craig, 2002; Coull et al., 2003; Craig, 2003a), une couche composée presque uniquement de NS ; on n'a donc pas tenu compte des WDR, même si leur participation dans la nociception n'avait pas été éliminée. Dans le cadre de ma thèse, je me suis donc concentré sur une couche où il y a une population mixte de neurones de projection des deux types, me permettant ainsi d'étudier les deux classes et leur implication dans la nociception.

Pourquoi les neurones de projection?

Au niveau de la moelle épinière, une importante intégration de l'information provenant des afférences primaires est faite par un vaste réseau neuronal et est encodée avant d'être envoyée aux aires supérieures. Si on accepte la vision d'une bonne partie de la communauté scientifique quant au fait que la chronicité des douleurs neuropathiques est probablement causée par des changements au niveau de la moelle épinière, cela veut dire que l'information encodée envoyée aux aires supérieures doit être altérée d'une manière ou d'une autre durant le développement de cette pathologie. Les causes provoquant cette altération d'encodage de l'information peuvent être nombreuses et se situer à plusieurs niveaux ; elles peuvent aussi varier dans certains sous-types de pathologie. Si on est capable d'identifier quel(s) type(s) de neurones de projection et par quelle(s) voie(s) ce message altéré est transmis au cerveau, peut-être pouvons-nous trouver un caractère commun à plusieurs types de pathologie affectant les perceptions douloureuses ? En plus d'identifier les neurones altérés, si on parvient à quantifier les changements qui surviennent chez ces neurones, il serait possible de les normaliser et d'ainsi rétablir une perception douloureuse normale. En choisissant les neurones de projection comme cible, j'attaque le problème des douleurs chroniques d'un autre angle : plutôt que de tenter d'en découvrir la source, je cherche à déterminer par où passe l'information nociceptive altérée et quels en sont les changements.

Objectifs spécifiques des différents chapitres

Chapitre 2 — L'amplification du cotransport du K^+Cl^- régularise l'encodage normal du faisceau spinothalamique dans un modèle de douleurs neuropathiques.

Ce chapitre est centré sur l'article qui est à la base de l'ensemble de ma thèse. Les objectifs de cet article sont multiples, mais le principal, duquel découlent tous les autres, est de comprendre comment l'information nociceptive sortant de la moelle épinière est encodée. Comme décrit plus haut, les connaissances dans le domaine sont souvent soit qualitatives

(Chung et al., 1986), soit sur des neurones non identifiés (Leem et al., 1995;Hains et al., 2002). (Hains et al., 2003;Sorkin and Puig, 1996;Sorkin et al., 1998) soit, plus récemment, basées uniquement sur les couches supérieures. À la lumière de ces différentes lacunes dans la littérature, nous avons enregistré les neurones des couches profondes spinothalamiques et nous avons caractérisé leur réponse à l'ensemble de la gamme sensorielle en utilisant un stimulateur mécanique quantitatif.

Une fois cette base bien établie, l'objectif suivant était d'identifier et de quantifier les changements dans l'encodage nociceptif suite au développement de douleurs neuropathiques. Avec la quantification de ces changements, il nous est possible de faire deux choses. Premièrement, nous avons tenté de mieux comprendre le développement des douleurs neuropathiques en vérifiant si certaines des théories les plus populaires reproduisaient les mêmes changements d'encodage nociceptif que ceux que nous avons identifiés. Deuxièmement, nous avons essayé de renverser ces changements par pharmacologie chez des animaux ayant déjà développé une hypersensibilité. En dernier lieu, nous avons tenté de voir s'il y avait un lien entre les réponses neuronales de la moelle et les réactions comportementales des animaux.

Chapitre 3 — Découverte d'un nouvel agent thérapeutique activant le co-transporteur (KCC2) pour le traitement des douleurs neuropathiques.

L'article associé à ce chapitre est lié aux différentes découvertes sur le KCC2 faites au cours des dernières années (Ferrini et al., 2013;Coull et al., 2005). L'implication de ce co-transporteur dans les douleurs chroniques (voir la section sur le KCC2 et l'homéostasie des ions chlorure) en fait une cible très intéressante pour le développement pharmacologique. Cet article est le papier princeps décrivant un activateur de l'action d'extrusion des ions chlorures par le co-transporteur KCC2 et qui a pour but d'en démontrer le fonctionnement et l'efficacité. Cet article décrivant cet activateur (le CLP 257) a été soumis de manière conjointe avec l'article du chapitre 2, car les deux se supportent l'un l'autre. Dans l'article du chapitre 3, on amène une nouvelle molécule qui a un fort potentiel comme nouveau

traitement pour les douleurs neuropathiques et dans celui du chapitre 2, on démontre la cible neuronale et son action sur des neurones hypersensibilisés.

Chapitre 4 — Microsonde permettant l'enregistrement électrique et optique en parallèle de neurones individuels *in vivo*.

Dans le domaine de la neuroscience, le pont entre les études électrophysiologiques et immunohistochimiques est souvent difficile à faire, même s'il est vital à une bonne compréhension. L'électrophysiologie ne permet souvent pas d'identifier les identifiants moléculaires des neurones enregistrés et l'immunohistochimie ne donne aucune information sur l'activité des neurones. Avec l'arrivée des nouvelles technologies de marquage cellulaire (les souris génétiquement modifiées, les virus encodant des protéines fluorescentes et les multiples protéines fluorescentes), on peut maintenant facilement enregistrer soit *ex vivo* ou *in vivo* des cellules identifiées. Par contre, l'imagerie *in vivo* par microscopie demeure limitée aux structures superficielles (Ikeda et al., 2003b; Labrakakis and MacDermott, 2003; Yuste, 2005).

Cet article montre le développement d'une nouvelle technologie de microsonde utilisant une fibre optique permettant l'enregistrement de neurones unitaires *in vivo* marqués par fluorescence dans des structures profondes. En plus de l'innovation technique que représente cette microsonde, dans le cadre de ma thèse, le développement de cet outil était vital pour la suite de mon projet. Dans le chapitre 2, j'ai identifié les propriétés d'encodages des différentes classes de neurones de projection au thalamus et j'ai identifié celle qui change suite au développement des douleurs neuropathiques. Par contre, je n'avais encore aucune information sur la morphologie de ces cellules, ni même de moyen de les identifier autrement qu'en les enregistrant en électrophysiologie. Pour pousser plus loin mon investigation sur les classes de neurones de projection, je me devais de trouver un moyen de caractériser ces neurones à l'aide d'une classification morphologique. En utilisant la microsonde que nous avons développée, combinée avec une technique que j'ai validée et publiée dans l'article du chapitre 5, il est possible d'accomplir cela.

Chapitre 5 — Une microsonde multimodale permettant l'enregistrement combiné électrophysiologique unitaire et de champs, la détection multispectrale et le marquage optique.

Le but de cet article était de pousser plus loin les possibilités de la microsonde décrite au chapitre 4 et ainsi, d'ajouter des possibilités d'utilisation (ex. : enregistrement du champ électrique, analyse de différents spectres de fluorescence). Encore une fois, en plus de l'intérêt de développer un outil de recherche encore plus puissant, ma participation à cet article avait aussi un intérêt pour le projet principal de ma thèse. Avec la microsonde décrite au chapitre 3, nous avons un outil pour enregistrer sélectivement un neurone marqué par fluorescence, mais nous sommes dans l'impossibilité de le retrouver par la suite, parmi tous les neurones fluorescents d'une région. Pour y parvenir, j'ai démontré que l'on pouvait utiliser la microsonde combinée avec des marqueurs photoconvertibles qui, lorsqu'on les illumine avec une certaine longueur d'onde, modifient de manière permanente leur spectre de fluorescence. Grâce à la microsonde, on peut illuminer uniquement le neurone enregistré, permettant ainsi de le retrouver par la suite dans l'animal. Cet outil est extrêmement pertinent pour la suite de mon projet, car il m'a fourni un moyen de caractériser la morphologie des neurones et de l'associer aux différents types de réponse neuronale.

Chapitre 6— Synthèse et orientation du projet

Le dernier chapitre de cette thèse est une synthèse de tous les chapitres et une mise en contexte de l'implication de tous les résultats compilés ensemble. Dans ce chapitre, il y aura aussi une énumération des différentes avenues et orientations de recherche que cette thèse révèle.

Chapitre 2

Enhancing K^+ - Cl^- -cotransport restores normal encoding within the spinothalamic tract in a model of neuropathic pain

Guillaume Lavertu¹, Sylvain L. Côté¹, Yves De Koninck¹.

¹ *Unité de neurosciences cellulaires et moléculaires, Institut universitaire en santé mentale de Québec, Québec, QC, Canada, G1J 2G3.*

En révision chez *Brain*

Résumé

La douleur neuropathique est une maladie extrêmement handicapante caractérisée par une perception douloureuse provoquée par des stimuli tactiles inoffensifs (allodynie). Malgré ces conséquences graves et la prévalence dans la population, les mécanismes cellulaires qui sous-tendent cette pathologie demeurent inconnus. Dans cet article, nous démontrons que chez les rats contrôle et chez ceux qui ont une hypersensibilité à la douleur induite par une lésion de nerf, le seuil nociceptif de retrait de patte correspond au seuil de réponse des neurones spinaux nociceptifs spécifiques du faisceau spinothalamique (STT) des couches profondes. En revanche, les neurones multimodaux STT n'ont montré aucun changement suite à la lésion de nerf. Perturber l'homéostasie des ions chlorures en bloquant les cotransporteurs K^+-Cl^- (KCC2) reproduit la diminution du seuil des neurones nociceptif spécifique STT. En lien avec ces résultats, seulement l'action combinée des antagonistes $GABA_A$ et glycine, qui sont des canaux perméables au Cl^- , réplique entièrement l'effet de la lésion de nerf ou de l'inhibition du KCC2. À l'inverse, réactiver l'activité du KCC2 restaure le seuil à des valeurs normales. Ainsi, nous dévoilons une association étroite entre l'allodynie et l'encodage sensoriel anormal des neurones nociceptifs spécifiques STT. Nos résultats identifient un des mécanismes des douleurs pathologiques ainsi que de nouvelles cibles pour leur traitement.

Abstract

Neuropathic pain is a debilitating syndrome characterized by pain hypersensitivity to innocuous tactile stimuli (allodynia). Yet cellular mechanisms underlying this pathology have remained elusive. Here we show that, in both control rats and those with pain hypersensitivity induced by nerve injury, the nociceptive paw withdrawal threshold matches the response threshold of nociceptive specific deep spinothalamic tract (STT) neurons. In contrast, multimodal STT neurons showed no change following nerve injury. Disrupting Cl⁻ homeostasis by blocking the K⁺-Cl⁻ co-transporter KCC2 replicated the decrease in threshold of nociceptive specific STT neurons. Accordingly, only combined blockade of both GABA_A- and glycine-gated Cl⁻ channels fully replicated nerve injury or KCC2 blockade effects. Conversely, rescuing KCC2 function restored the threshold to normal values. Thus we unveil a tight association between allodynia and abnormal sensory coding within the normally nociceptive specific SST. Our findings identify a mechanistic substrate and novel targets for the treatment of pathological pain.

Introduction

How nociceptive signals are encoded and relayed to the brain, and how they are modulated remain key unresolved questions to understand normal pain and to treat its pathological manifestations. Neuropathic pain, in particular, is a pathological condition resulting from injury to the nervous system; it remains poorly understood and vastly undertreated. A major manifestation of this disease is tactile allodynia: paradoxical pain induced by innocuous mechanical stimulation of the skin (Zeilhofer et al., 2012; Sandkuhler, 2009).

Several lines of evidence point to plastic changes at the spinal level as a substrate of pain hypersensitivity resulting from injury to sensory nerves (Zeilhofer et al., 2012; Sandkuhler, 2009). Which spinal neurons are responsible for the abnormal relay of the pain signal remains an unresolved issue. In the lamina I relay pathway, where neurons are predominantly nociceptive and thermoceptive specific (Craig et al., 1994), a switch in phenotype from nociceptive specific (NS) to multimodal has been proposed as the

substrate for tactile allodynia (Keller et al., 2007). However, one cannot exclude that allodynia-related signals are also relayed by multimodal (wide dynamic range; WDR) neurons located in the deep laminae of the spinal cord (Chung et al., 1986; Zeilhofer et al., 2012). This question has remained unanswered because conventional qualitative approaches do not allow one to distinguish a NS neuron that becomes responsive to innocuous input from a WDR neuron. To overcome this limitation, we devised an approach that allowed us to establish a quantitative description of the input-output properties of each cell. With this approach we could determine which selective properties correlated with behavioural responses to pain as well as which ones were altered after injury.

Results

Objective separation of functional cell types in normal rats

To determine whether a specific class of spinal projection neurons mediates tactile allodynia, we first quantified the input/output firing responses of identified STT neurons in normal rats. Mechanical stimuli were delivered using a force feedback stimulator based on the original design by Chubbuck (Chubbuck JG, 1966) (Fig. 1). We analysed response profiles to a sequence of controlled pressure stimuli ranging from 8 to 140 g/mm² (Fig. 2a). Our analysis took into account multiple parameters of the input-output curve for each cell. Different combinations of 2 to 4 dimensions cluster analyses consistently revealed two distinct classes of STT projection neurons: WDR neurons responding to pressure intensity $>33\pm9$ g/mm² (encoding dynamic range: 33±9 to 97±14 g/mm²) and NS neurons that only responded to high pressure $>70\pm8$ g/mm² (encoding dynamic range: 70±8 g/mm² to 108±11). (Fig. 2a-b); n=52; Wilk's Lambda = 0.17; F = 117.9; P <0.0001). This classification allowed us to evaluate the proportion of the different classes of STT neurons in the deep dorsal horn of normal rats (Fig. 2c). Furthermore, it provided an objective means to track changes in properties of each cell class under pathological conditions.

Input/output response properties of NS-STT, not WDR-STT, change after nerve injury

Using the above quantitative classification we examined whether these two classes of STT cells display altered input-output relationships following allodynia induced by nerve injury (Pitcher et al., 1999; Coull et al., 2003). In nerve injured rats, cluster analysis of the input-output response profiles revealed three different classes of STT neurons: the first two classes of neurons display properties similar to those found in control animals (NS-STT and WDR-STT), and a new third one (Fig. 2d-j; $n=26$; Wilk's Lambda = 0.04; $F = 42.7$; $P < 0.0001$). The third class of neuron, which we termed NEW-STT, had input/output characteristics similar to that of NS-STT neurons in slope but with a lower response threshold (Fig. 2g-j), raising the possibility that they represent an altered subgroup of NS-STT cells. In support to this hypothesis, we found that while the overall proportion of WDR-STT cells was unaltered by nerve injury ($\chi^2 = 0.006$ d.f. = 2; $P > 0.05$; Fig. 2c,f), the proportion of the NS-STT neurons significantly decreased (37%; $\chi^2 = 36.3$, d.f. = 2; $P < 0.05$), concurrently with the appearance of a comparable proportion of NEW-STT neurons (36%) (Fig. 2c vs 2f). Conduction velocities of NS-STT and NEW-STT neurons were similar, yet significantly different from that of WDR-STT cells (Fig. 2k). Taken together these results indicate that NEW-STT neurons represent a subgroup of NS-STT neurons whose response threshold was lowered by nerve injury.

Altered response dynamics of STT neurons after nerve injury

We also identified three different classes of response dynamics on the basis of a cluster analysis: cells that adapts during the stimulus (Adapting), cells with sustained discharges throughout the stimulus (Tonic), and cells with delayed discharges after stimulus onset (Delay; Fig. 3a-d; $n=52$ Wilk's Lambda = 0.02; $F = 146.9$; $P < 0.0001$). No significant difference in axonal conduction velocity was found between these different classes of neurons (Fig. 3e). However, the number of cells with adapting, sustained and delayed responses distributed differentially among NS-STT and WDR STT neurons (19, 5, 3 vs 9, 15, 0, respectively; $\chi^2 = 11.43$; $P < 0.01$), providing an additional set of parameters for classification of the cells.. A similar analysis after nerve injury revealed only sustained and

delayed responses (Fig. 3f-g; $n=26$; Wilk's Lambda = 0.14; $F = 65.9$; $P < 0.0001$), the adapting subtype being absent. The absence of adapting neurons was associated with a statistically significant increase in the proportion of cells with Tonic responses (39% to 80%; $\chi^2 = 11.9$; d.f. = 2; $P < 0.001$), suggesting that adapting cells switch to a sustained firing mode after nerve injury (Fig. 3h). These findings, combined with alterations in input/output response, established a pattern of changes in properties of STT neurons following nerve injury.

Disinhibition is sufficient to explain the changes in STT neurons after nerve injury

Prior studies indicate that spinal disinhibition may be a substrate of pain hypersensitivity after nerve injury (Sandkuhler, 2009; Coull et al., 2005; Coull et al., 2003; Zeilhofer et al., 2011). We thus tested whether pharmacological blockade of spinal inhibition in normal rats replicate changes observed after nerve injury. Blockade of GABA_A or glycine receptors in normal rats produced a decrease in response threshold of NS-STT neurons without affecting the slope of the input-output curve or the maximum firing rates (Fig. 4a-h). These differences are similar to the difference between NEW-STT and NS-STT neurons (Fig. 2g,j). Based on this observation and the evidence reported above, we can conclude that NEW-STT found after nerve injury are a subgroup of NS-STT with lowered response threshold. In the case of the WDR-STT neurons, none of these parameters (response threshold, slope and maximum firing) were changed (Fig. 4i-n), consistent with findings after nerve injury (Fig. 2g-j). Local blockade of glycine-, but not GABA_A-receptor-mediated inhibition, also reduced adaptation in Adapting neurons in control animals, effectively switching their response towards that of Tonic cells (Fig. 4o-q), consistent, again, with the observations that Adapting neurons were absent after nerve injury (Fig 3d vs. 3h). Thus, the effects of blocking local spinal inhibition mirrored the pattern of changes in STT classes of neurons, indicating that spinal disinhibition replicates all the alterations observed after nerve injury.

Blocking K^+ , Cl^- cotransporter KCC2 replicates the full sensitization of NS-STT neurons by nerve injury

A shared feature of GABA_A- and glycine-mediated inhibition is that they involve Cl^- channels, suggesting that a common mechanism affecting Cl^- currents may underlie the pathology. The most likely candidate for this impaired Cl^- homeostasis is a decreased in K^+ , Cl^- cotransporter KCC2 function as previously described (Coull et al., 2003; Coull et al., 2005). The local specific inhibitor of KCC2 function, VU 0240551 (Delpire et al., 2009) reproduced the pattern of changes observed after nerve injury or pharmacological blockade of Cl^- mediated inhibition (Fig. 5 a-d): **1**): a decrease in response threshold without change in the maximum firing of NS-STT (Fig. 2g,h,j; Fig. 4a-h) and **2**) no change in either response threshold or maximum response of WDR-STT (Fig. 2 g,i,j; Fig 4i-n).

Restoring KCC2 activity rescues normal response threshold in NS-STT sensitized by nerve injury

The above results suggest that impaired Cl^- transport may underlie the shift in response threshold of NS-STT neurons following nerve injury. To test this directly, we used a newly developed, selective KCC2 activator, CLP 257 (Gagnon et al., 2012). Local administration of CLP257 restored the threshold of activation of NS-STT neurons to that of NS-STT without affecting the input-output parameters of WDR-STT cells (Fig. 5e-h), indicating that **1**) the loss of KCC2 function is sufficient to explain the change in response threshold of NS-STT neurons following injury and that **2**) the endpoint of disinhibition is mediated by impaired Cl^- transport and underlies a selective switch in response threshold of the NS pathway.

Our pharmacological experiments showed that blockade of either GABA_A or glycine receptors, causes a significant shift in response threshold of NS-STT neurons (Fig.5i,j), although weaker than that observed after nerve injury (Fig. 2e,g). Blocking both classes of receptors concurrently was necessary to cause a decrease in threshold comparable to that observed in animals with nerve injury (Fig.5i,j). Importantly, the decrease in response threshold induced by blocking KCC2 function was comparable to that induced by

combined blockade of both Cl⁻-mediated inhibition or by nerve injury. Conversely, restoring Cl⁻ homeostasis with local administration of the KCC2 activator CLP257 in nerve injured animal, even after hypersensitivity was established, restored the response threshold of NS-STT neurons to values comparable to that of uninjured animals (Fig. 5 i,j). Altogether these results are consistent with impaired intracellular Cl⁻ homeostasis as the mechanism underlying nerve injury induced allodynia.

Differential plasticity in STT vs. non STT cells

Previous studies have reported changes in response properties of WDR neurons after nerve injury (Leem et al., 1995;Hains et al., 2002;Hains et al., 2003). However, in contrast to ours, these studies did not focus on STT neurons. The discrepancy between our results and that from previous reports thus suggests differential plasticity among projection and non-projection neurons. We thus quantified response properties of deep dorsal horn neurons that did not respond to antidromic stimulation from the thalamus. Cluster analysis from this sample revealed three types of neurons based on their response properties to mechanical stimulation of the receptive field: NS and WDR neurons with response profiles comparable to those of NS-STT and WDR-STT neurons and a third class of neurons with very low response threshold, steep input-output curve, reaching a plateau at $< 40 \text{ g/mm}^2$ stimulus intensity; features consistent with non-nociceptive neurons (NN) (Supplementary Fig. 1a; $n=53$; Wilk's Lambda = 0.05; $F = 60.1$; $P < 0.0001$). After nerve injury, cluster analysis revealed a fourth class of neuron with response characteristics similar to the NEW-STT neurons (Supplementary Fig. 1b,c; $n=20$; Wilk's Lambda = 0.006; $F = 21.28$; $P < 0.0001$). In contrast to STT neurons, the WDR subgroup of non-STT neurons showed a significant increase in maximum firing after nerve injury (Supplementary Fig. 1d-f; $P < 0.01$), consistent with previous reports on unidentified deep dorsal horn neurons (Leem et al., 1995;Hains et al., 2003). We also found that all non-STT classes of neurons have a significantly higher (approx. twice) maximum firing rate response than their STT counterparts confirming that they represent distinct populations of cells (compare Fig. 2h-j to Supplementary Fig. 1d-f). Analysis of the response dynamics during the stimulus

revealed three types: Adapting, Tonic and Delayed (Supplementary Fig. 1g,h; n=53; Wilk's Lambda =0.004; F =232; $P < 0.0001$). Similarly to STT neurons, almost all the Adapting subtype were lost after nerve injury (Supplementary Fig. 1h; n=20; Wilk's Lambda =0.0007; F = 272; $P < 0.0001$). Thus, the signature of changes in properties of non-STT neurons was similar from that of STT neurons after nerve injury with the exception of WDR-nonSTT, reconciling our results with that of previous studies (Leem et al., 1995; Hains et al., 2003; Hains et al., 2002) and confirming a lack of sensitization of WDR-STT neurons. Tactile allodynia can therefore not be explained by plasticity of the WDR-STT.

Alteration of Cl⁻-mediated inhibition also replicates changes induced by nerve injury in nonSTT neurons

As observed for their STT counterpart, blocking GABA_A or glycine receptors caused a decrease in response threshold of NS-nonSTT neurons without affecting the slope of their input-output curves or their maximum response (Supplementary Fig. 2a- f). The major difference observed between STT and nonSTT neurons is an increased in maximal response after nerve injury for the WDR-nonSTT subtype (Fig 2i,j vs. Supplementary Fig. 1e,f). The same pattern of changes was reproduced by pharmacological blockade of GABA_A or glycine receptors (Supplementary Fig. 2i-l). The increase in maximum response of WDR-nonSTT neurons is thus consistent with results of previous studies on unidentified WDR neurons (Sorkin et al., 1998; Sorkin and Puig, 1996). These results indicate that disinhibition is sufficient to explain the overall changes in input-output properties of the dorsal horn network after nerve injury.

Paw withdrawal threshold coincides with NS-STT neuron response threshold

Our findings seem to show that the change in NS-STT response properties after nerve injury can account for the tactile allodynia resulting from nerve injury. To further test this, we had to establish a common measuring unit to compare the stimulus intensity causing paw withdrawal with those used to study the electrophysiological response *in vivo*.

A common means of measuring pain threshold in clinical and experimental settings is to use a set of calibrated monofilaments to determine the threshold force required to produce the sensation of touch or pain, following on the original design of an esthesiometer by von Frey (Von Frey M, 1896) (Fig. 6a). Von Frey and successors showed that, for pain, threshold was constant when measured as force per unit area of skin stimulated (i.e., pressure)(Bishop, 1949). This observation is widely overlooked in modern animal studies which use absolute force measurement (Chaplan et al., 1994; Coull et al., 2005; Pitcher et al., 1999). This may preclude proper comparison of results obtained using different stimulation probe sizes. Thus, given the non-linear relationship between pressure and force for the different filaments typically used (Fig. 6b), we converted force into pressure to obtain a common comparison scale.

We compared the response threshold of the different classes of STT neurons to the behavioural nociceptive withdrawal response of control and nerve injured animals. We found that, when converting the stimulus force into pressure, there was a relationship between the response threshold of NS-STT and the paw withdrawal threshold in control animals (78 ± 6 vs 70 ± 8 g/mm²) (mean \pm SD) (Fig. 6c,d). The response threshold of the NEW-STT neurons was also comparable to that for paw withdrawal after nerve injury (28 ± 9 vs 37 ± 7 g/mm²) (mean \pm SD) (Fig. 6c,d). In contrast, the response threshold of WDR neurons remained virtually unchanged after nerve injury. To validate this possible comparison, we verified that the sensory response threshold of NS-STT neurons was also independent to the probe size (Fig. 6e) or the level of anaesthesia (Fig. 6f), consistent with earlier findings that isoflurane does not inhibit dorsal horn neuron responses at low anaesthetic doses (Jinks et al., 2003; Kim et al., 2007). These results indicated that it is possible to relate paw withdrawal threshold to single cell electrophysiological response threshold of specific subclasses of dorsal horn neurons *in vivo*.

Discussion

Recent evidence of distinct classes of ascending pathways for nociception and thermoception in lamina I support the concept of labelled lines in that portion of the dorsal horn (Craig et al., 1994; Han et al., 1998; Yu et al., 2005; Keller et al., 2007). Yet, determining whether such organization applies for the deep STT has been a challenge because of the lack of a quantitative description of the responses properties of these cells. To overcome this limitation, our neurometric approach provided an objective means to distinguish NS from WDR neurons in the deep STT based on several observations: distinct functional parametric features, distinct axonal conduction velocities and distinct patterns of responses to nerve injury and pharmacological disinhibition. NS cells did alter their responses properties after nerve injury or pharmacological manipulation that produce tactile allodynia (Yaksh, 1989; Sherman and Loomis, 1994; Coull et al., 2003), indicating that they contribute to this symptom of neuropathic pain. Conversely, neither the response threshold nor the maximum firing properties of WDR-STT neurons changed after nerve injury. Moreover, the firing rate of WDR-STT neurons at paw withdrawal threshold was close to saturation ($77\pm 8\%$), leaving little encoding range in the painful regime of sensation. These results indicate that WDR-STT neurons do not, or little, contribute to allodynia or hyperalgesia. Yet, the deep laminae of the spinal cord also contain WDR neurons that do not project to thalamus. These cells may contribute to hyperalgesia as they display change in maximum firing rate after nerve injury or disinhibition. However the change in properties of nonSTT WDR neurons did not match well the change in behavioral threshold, in contrast to that of NS-STT neurons (Supplementary Fig. 3).

Unexpectedly, our results ruled out a role for WDR-STT neurons in tactile allodynia (noxious response to a normally innocuous input) or hyperalgesia (increase in gain of response to a noxious input) because neither their response threshold nor their maximum firing properties changed after nerve injury. The combine findings presented in this paper resolve the controversy as to the respective role of NS vs. WDR STT neurons in encoding pain hypersensitivity (Mendell, 2011; Perl, 1998; Craig et al., 1994; Craig, 2003b; Wall, 1995; Craig et al., 1995).

A possible explanation for the decrease in response threshold of dorsal horn NS neurons is that it is secondary to a reduction of nociceptor threshold in the skin. While the latter may occur in certain conditions of peripheral inflammation, sensitization of c-fiber mechanonociceptors does not appear to explain tactile allodynia, which is generally thought to involve activation of low threshold afferents (Delmas et al., 2011;Devor, 2009a). Consistent with this, in humans with neuropathic pain syndromes, selective blocking of high threshold afferents with local anaesthetics does not prevent allodynia, indicating that it is mediated by myelinated afferents (Campbell et al., 1988;Torebjork et al., 1992). Ablation of nonpertidergic small diameter sensory fibers (typically associated with mechanical pain) in rats also failed to attenuate tactile allodynia (Taylor et al., 2012). Taken together these human and animal experiment, our results and earlier findings that nerve injury unmask low response threshold input in lamina I NS cells (Keller et al., 2007) argue that NS projection neurons mediate tactile allodynia.

How nerve injury induces tactile allodynia remains controversial (Kontinen et al., 2001;Moore et al., 2002;Somers and Clemente, 2002;Polgar et al., 2004;Polgar et al., 2005;Scholz et al., 2005). Our finding that pharmacological removal of Chloride-mediated inhibition replicates the decrease in response threshold of NS-STT neurons indicates that a central change is sufficient to explain the modality switch. Indeed, antagonizing both spinal GABA- and glycine-gated Cl⁻ channels was necessary to fully replicate the effects of NI. However altering GABA_A or glycine receptor-mediated inhibitions separately, are not sufficient to explain the change in response threshold of NS-STT neurons. In line with this, blocking Cl⁻ extrusion via KCC2 inhibition was sufficient to reproduce the shift in response threshold observed after NI. In turn, rescuing spinal KCC2 activity restores the response threshold of NS-STT neurons to normal levels in animals with nerve injury indicates that intracellular Cl⁻ homeostasis deregulation may support the modality switch. As KCC2 is selectively expressed in dorsal horn neurons, but in not primary afferents (Coull et al., 2003) alteration of chloride homeostasis within the network of spinal neurons are likely to underlie the switch in modality of NS-STT neurons. Taken together our results suggest that disrupted Cl⁻ transport is a common substrate for both superficial and deep

84

dorsal horn NI-induced spinal disinhibition underlying tactile allodynia. These changes are also mediated through a selective component of deep dorsal horn spinal-to-the-brain pathway.

The concept that pain is processed by dedicated pain pathways as opposed to a common one conveying different sensory modalities has been the subject of intense debate over the years (Perl, 1998; Craig et al., 1994; Craig, 2003b). The existence of separate pathways does not exclude cross-talk and the relay of mixed sensory modalities via each one. This is evidenced by the functional switch we unveiled in deep NS-STT neurons after nerve injury, akin to that seen in Lamina I NS spinoparabrachial neurons (Keller et al., 2007). A switch in modality within dedicated nociceptive pathways thus appears to be a rule across ascending tracts to explain allodynia rather than a mere change in gain in multimodal relay cells.

The impressive short term efficacy of neurosurgical ablation of selected spinal ascending tracts to alleviate pain supports the concept of separate relay channels (Cetas et al., 2008; Meglio and Cioni, 1981). Although the efficacy of the lasting analgesia remains partial with this procedure (Cetas et al., 2008; Meglio and Cioni, 1981) it does not contradict the existence of dedicated channels because reorganization beyond the ablation site may occur over the long term. For example, the same way that, at spinal level, a functional switch in normally nociceptive specific pathways can be explained by cross-talk between parallel sensory lines (the present study and (Torsney and MacDermott, 2006; Baba et al., 2003; Sherman et al., 1997; Keller et al., 2007)), a similar cross-talk can occur but at supraspinal levels. The notorious ability of the CNS to remodel following loss of connections may indeed explain that selective ablation of specific tract is not a long-term viable strategy for chronic pain therapy. In contrast, the identification of the specific subclass of spinal ascending neurons responsible for abnormal relay of pain signals to the brain opens avenues for targeted approaches to normalize transmission in pathological condition while avoiding detrimental neuronal reorganisation.

Methods

Peripheral nerve injury and behavioural testing

Under isoflurane anesthesia (initial concentration of 4%, subsequent concentration 2%) a polyethylene cuff was implanted around the left sciatic nerve of 190-200g male Sprague Dawley rats (Pitcher et al., 1999). Mechanical allodynia was quantified by assessing the paw withdrawal threshold using von Frey filaments (Stoelting, USA) following the up and down method (Chaplan et al., 1994). Animal who showed a paw withdrawal threshold below 2g (equivalent to a pressure of 27 g/mm²) for at least two consecutive days after a constant decrease for 10 days post-surgery were considered to exhibit allodynia.

Animal preparation

Laminectomy were performed on control and nerve injury adult rats (350-450 g) to expose L4-S1 segments of the spinal cord under isoflurane anaesthesia (initial concentration of 4%, subsequent concentration 2%; in some experiments, to measure the effect of anaesthetic dose, concentration was varied between 1.2% and 3%). The animals were paralyzed with pancuronium bromide (Sigma-Aldrich, USA) and ventilated artificially (SAR-830, CWE inc, USA) via a tracheotomy to reduce breathing artefacts. End-tidal CO² was monitored using a CAPSTAR-100 (CWE inc, USA) gas analyzer. Rectal temperature was maintained at 37°C using a heat pad (TR-200, Fine Science Tools, USA). The rat was placed in a stereotaxic and spinal frame with two clamps fixed on its vertebra to immobilize the spinal cord. All protocols were performed in accordance with the guidelines from the Canadian Council on Animal Care.

Drug application

A spinal perfusion chamber was created by cutting a window in a solidified 4% agar bloc surrounding the spinal cord. The chamber was continuously perfused with sterile buffered saline (10mM HEPES, Sigma-Aldrich, USA) maintained at 35°C. For drug applications, strychnine (5µM, Sigma-Aldrich, USA) and bicuculline (100 µM, Sigma-Aldrich, USA)

were dissolved in the buffered saline. VU 0240551 and CLP 257 were diluted in a stock solution of DMSO and then diluted in buffered saline for a final concentration of 40 μM (0.08 % DMSO) for VU 0240551 (Tocris Bioscience, USA) and 100 μM (0.1% DMSO) for CLP 257 (Chlorion Pharma, Canada) and perfused for 30 min before subsequent measurements were performed to ensure that stable concentrations were reached within the tissue.

Mechanical stimulation

A locally designed, automatically controlled, force-feedback mechanical stimulator was used to apply graded and stable mechanical stimulations on the glabrous skin of the paw. The force-feedback function of this stimulator allows stable and precise pressure stimulation. Eight or nine graded step pressures covering a large range from non noxious to noxious stimulation (5-140 g/mm^2) were used. For the mechanical stimulation a 2 mm^2 tip (unless specified otherwise) was positioned approximately at the center of the receptive field of the dorsal horn neuron being studied. A 2-4 min recovery period was allowed between stimuli to minimize sensitization (Andrew and Craig, 2002). For each condition two series of stimulations were conducted using increasing or randomized sequences of intensities. Using the protocol described above, no significant differences were observed when using incremental vs. randomized stimulus sequences (not shown).

Recording and antidromic stimulation

In vivo extracellular single unit recordings were obtained from deep dorsal horn neurons (mean depth \pm s.d. of $864 \pm 220 \mu\text{m}$) that receive input from the glabrous skin of the hind paw. Because of the length of the protocol and the pharmacological application only one STT neuron by animal was recorded. The electrode (10 $\text{M}\Omega$ stainless steel; FHC, USA) was mounted on a motorized micromanipulator (Burleigh 6000 controller, USA). The signal was amplified (ER-1 Cygnus technology, USA), filtered at 0.1-3 KHz, digitized at 20KHz with a power1401mkII (CED, UK) and stored on disk. Offline, the data were analysed with the Spike2 software (CED, UK). Neurons which responded to limb displacement, indicating proprioceptive input, were rejected. To identify STT projection neurons, we

performed a craniotomy so to allow the insertion of stimulation electrodes used for antidromic collision tests. To minimise the number of false negative STT neurons, we surveyed a wide area of the thalamus using a matrix which was constituted of 6 electrodes that extended 0.8 mm medio-laterally and 1mm dorso-ventrally (Rhodes Medical Instruments Inc, USA). Only neurons that we recorded from for more than 40 minutes (time necessary to complete a full sequence of mechanical stimulations) were kept for further analysis. For the STT neurons, bias toward a particular functional class was avoided by using antidromic stimulation as the search stimulus. Every neuron confirmed to be STT using the collision test were retained for testing. The conduction velocities were calculated using the latencies between the stimulation in the thalamus and the spinal recording of the antidromic spike. We divided these latencies by the distance from brain to lumbar recording spinal section.

Location of the thalamic stimulation site

At the end of each experiment a lesion was performed using current injection (5 mA for 30 s) through the stimulating electrode of the matrix from which the confirmation of antidromic collision was obtained. The brain was extracted and fixed overnight with 4% paraformaldehyde (Fisher, USA) and then cryoprotected in 30% sucrose. The lesion site was localized blind using 80 μm thick microtome (Leica, Germany) histological sections. Only the sites which were clearly localized in the thalamus were consider to be projection site of STT neurons for further analysis.

Data analysis

Response to mechanical stimulation: To produce the input/output response curves, for each pressure tested (two trials), we calculated the mean frequency of discharge during the stimulus, minus the spontaneous discharge (mean frequency of a 5s epoch preceding each stimulation) and then averaged the result of both trials. All input/output plots were fitted into a sigmoid curve showing the response from 8 to 140 g/mm^2 . We selected 140 g/mm^2 as the maximal stimulation because virtually all neurons had reached a plateau response at

this intensity without any sign of damage to the skin. The response threshold of each neuron to mechanical stimulation was defined as 10% of the maximal firing response and the stimulus intensity to reach plateau was defined as 90% of maximum. To analyse the response dynamic of the neurons to a painful stimulus (100 g/mm²), cumulative plots of the events recorded across time within each stimulus were used.

Statistical analysis. All data are presented as mean \pm standard error of the mean (s.e.m.) except when specified otherwise. Normalities of distributions were assessed and the corresponding parametric or non parametric analyses were used. We used an ANOVA analysis with Fisher post-hoc test to evaluate the effect of probe size, anaesthesia and response threshold as well as for the axonal conduction velocities. Two-Sample T-tests were used to compare the frequency of discharge of the different populations. Pair-Sample T- tests were used to analyse the effects of blockers of GABA_A and glycine receptor-mediated inhibition and for the effect of VU 0240551 and CLP 257. Contingency tables were analysed with a Pearson two-tailed χ^2 and the contribution of the different groups was evaluated by partitioning analysis (Agresti, 2002).

Cluster analysis. To determine if response profiles were generated by different classes of neurons, we extracted two parameters from each curve to be used in cluster analyses. From input/output curves, we extracted mechanical response threshold, slope of the curve from 30% to 70% of the maximal response, and stimulus intensity at 50% of maximum and at plateau. For response dynamics, we used the times to reach 10%, 30%, 50%, 70% and 90% of the total number of spikes during the stimulus. Using different parameter sets we produced 2 to 4D plots for cluster analysis. We used a combination of R², variance ratio and cubic clustering criterion to determine the proper number of clusters (Chung et al., 1986). Then, we used the Ward's minimal variance as clustering method to distribute each data point within the appropriate cluster (Ward, 1963). Finally, a multivariate analysis of variance (MANOVA) based on a Wilk's lambda statistic was used to test for significant differences between clusters. Parameter sets were reduced to use the smallest number of

dimensions that yielded the same cluster separation as that obtained with additional dimensions.

ACKNOWLEDGEMENTS.

This work was supported by Canadian Institutes for Health Research (CIHR) grant MOP 12942 to YDK. GL is the recipient of a CIHR Studentship. YDK is a *Chercheur National* of the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). We thank Karine Bachand for expert technical assistance, Cyril Bories and Drs. Martin Deschênes and Michael W. Salter for helpful comments on the manuscript.

Figures

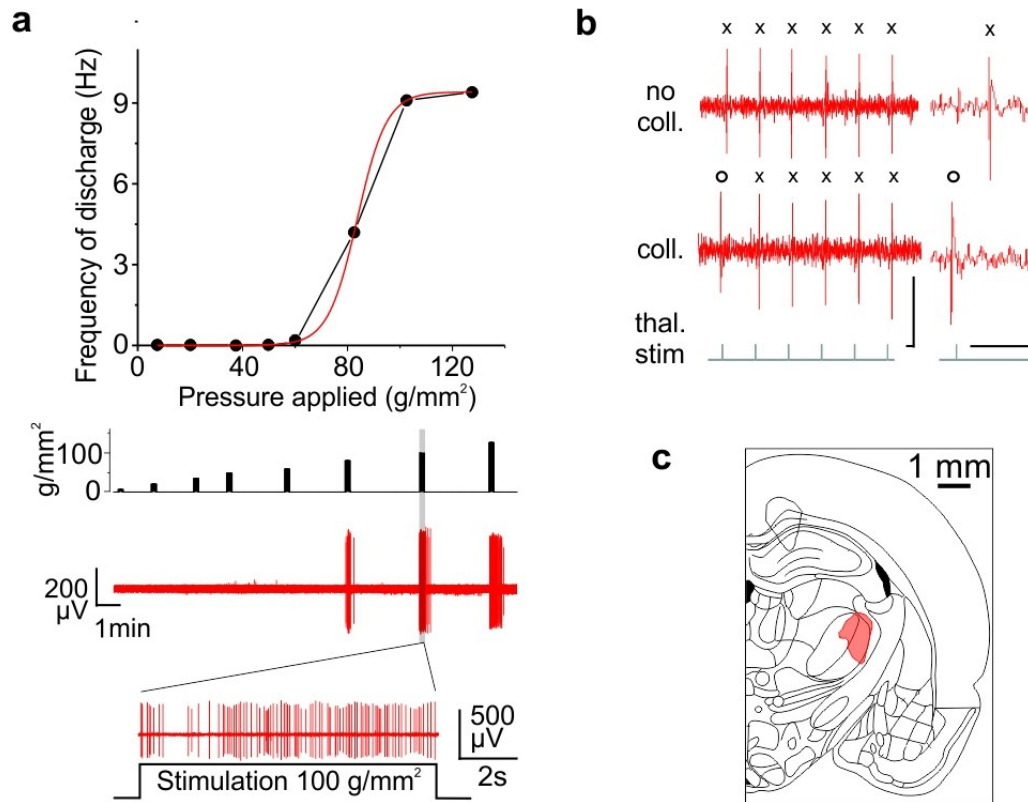


Figure 1. Scheme depicting the methodological approaches used in this study.

a, Example of the firing response of a nociceptive specific (NS) neuron to graded mechanical stimulation of its receptive field using a force-feedback mechanical stimulator (Supplementary Fig. 3). Insets below the graph illustrate the stimulus and spiking responses of the cell. **b**, Example of collision test to confirm antidromic activation of the cell from the thalamus. Scale bars x=10 ms., y= 150 μ V ;(x = antidromic spike, o = orthodromic spike). **c**, Diagram representing the thalamic area stimulated.

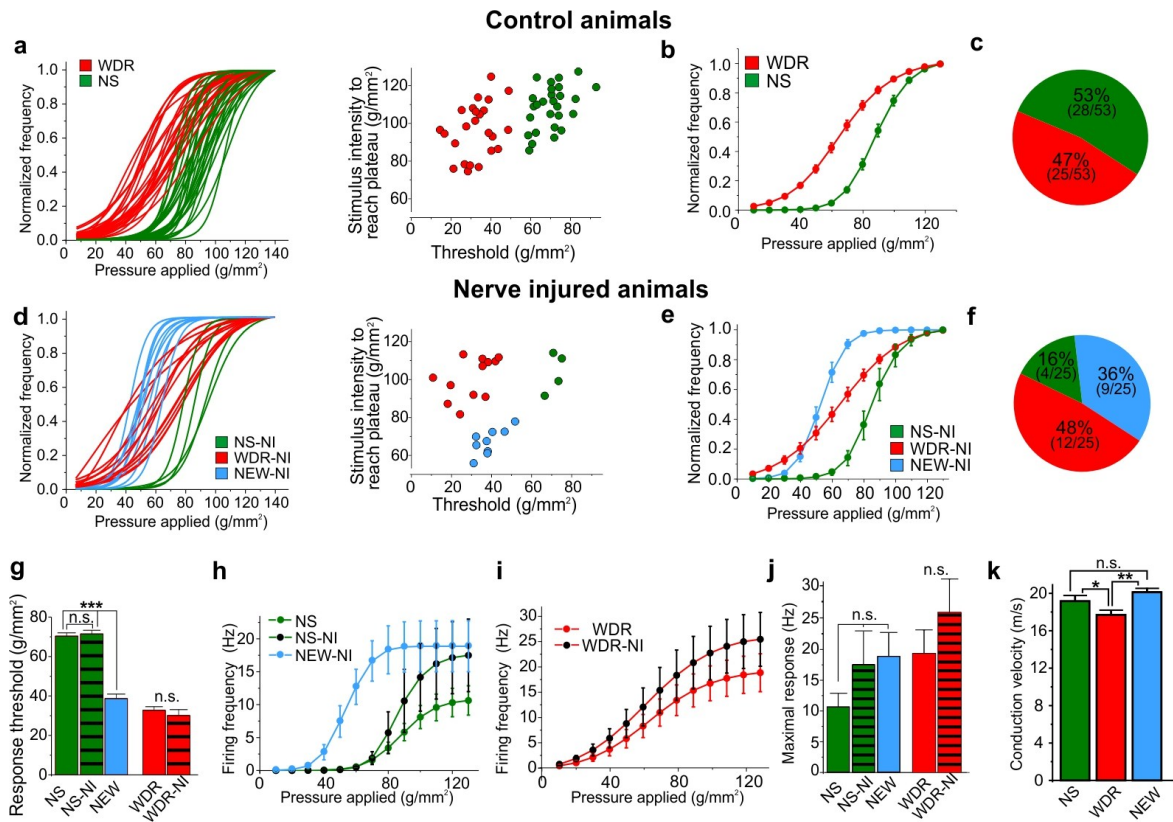


Figure 2. Quantitative multivariate analysis reveals that nerve injury alters input/output response properties of NS-STT, but not WDR-STT neurons.

a, Input/output profiles of STT neurons in control animals. The scatter plot on the right shows the parameter distribution used for cluster analysis of response properties. **b**, Average input/output profiles for each class of STT-neurons in control animals. **c**, Relative distribution of the different types of STT neurons classified on the basis of their Input/output profile in control animals **d**, Input/output profiles of STT neurons in animals with nerve injury. The scatter plot on the right shows the parameter distribution used for cluster analysis of response properties. **e**, Average input/output profiles for each class of STT-neurons in animals with nerve injury. **c**, Relative distribution of the different types of STT neurons classified on the basis of their Input/output profile in animals with nerve injury. **g**, Mean response threshold for the different functional classes of STT neurons before and after nerve injury. **h,i**, Firing frequency of NS and NEW (**h**) as well as WDR (**i**)

STT-neurons as a function of mechanical stimulation intensity (pressure) before and after nerve injury. **j**, Mean maximal response of the different classes of STT-neurons before and after nerve injury. **k**, Box plot of the conduction velocities of the different classes of STT-neurons. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. *** $P < 0.001$. n.s. indicates not statistically significant. –NI indicates data from animals with nerve injury.

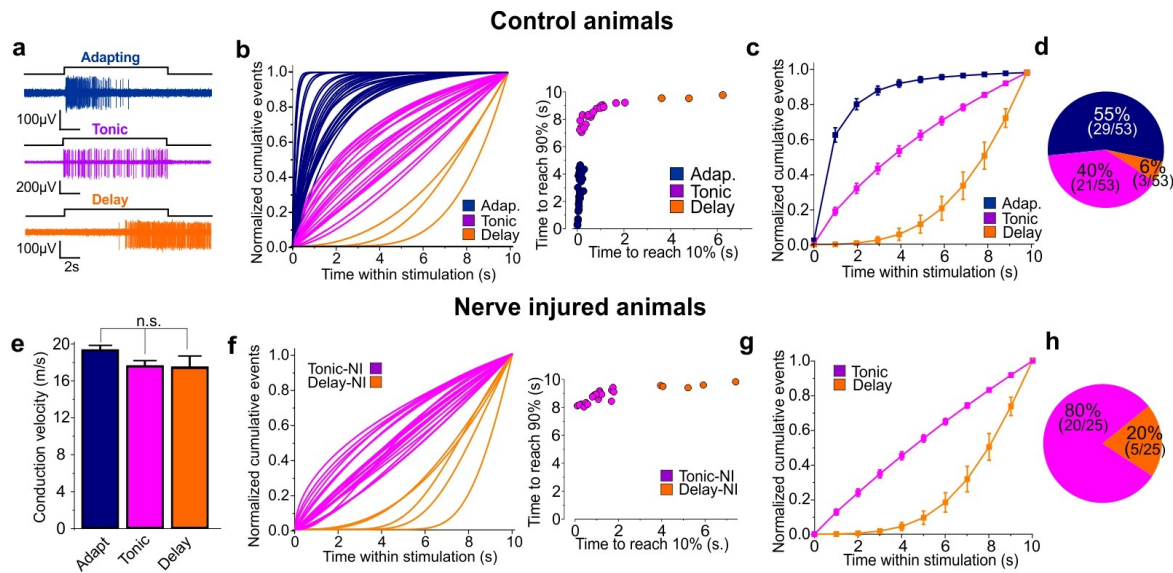


Figure 3. Loss of adaptation after nerve injury.

a, Representative examples of the dynamics of the firing responses during a fixed intensity and duration stimulus (10s; 100g/mm²). **b**, Response dynamics of STT neurons in control animals using the stimulus in (**a**). The scatter plot on the right shows the parameter distribution used for cluster analysis of response dynamics. **c**, Average response dynamics for each class of STT-neuron in control animals. **d**, Relative distribution of the different types of STT neurons classified on the basis of their response dynamic in control animals. **e**, Box plot of the conduction velocities of the different classes of STT-neurons. **f**, Response dynamics of STT neurons in nerve injured animals using the stimulus in **a**. The scatter plot on the right shows the parameter distribution used for cluster analysis of response dynamics. **g**, Average response dynamics for each class of STT-neuron in nerve injured animals. **h**, Relative distribution of the different types of STT neurons classified on the basis of their response dynamic in nerve injured animals. n.s. indicates not statistically significant. –NI indicates data from nerve injured animal model.

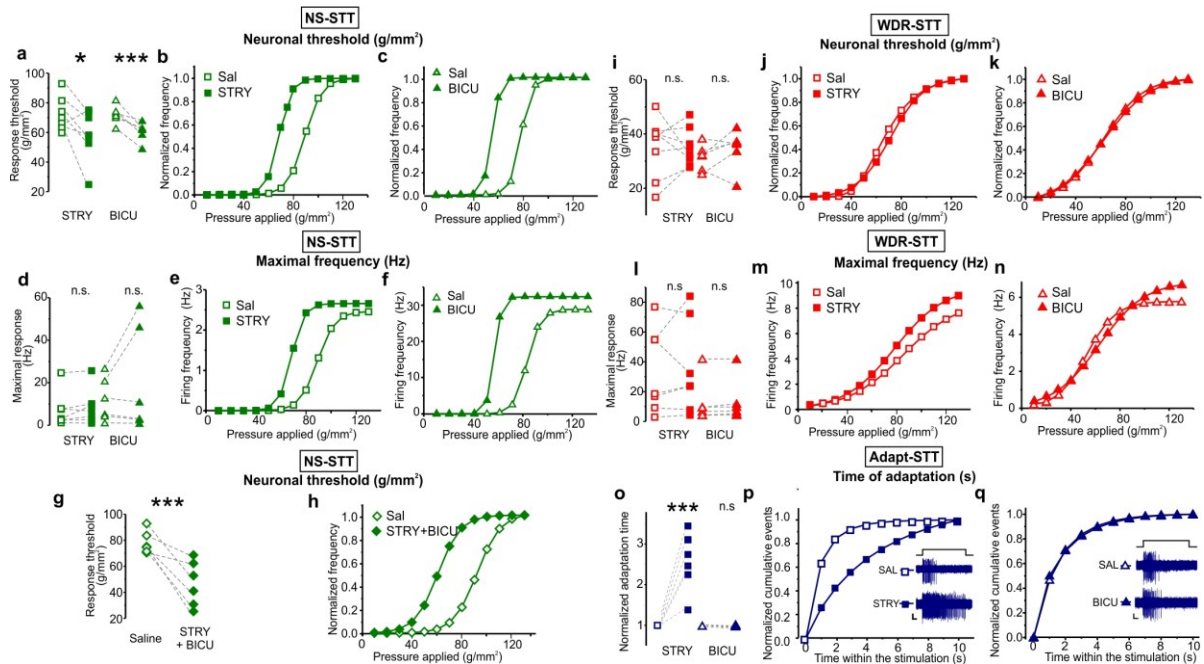


Figure 4. Pharmacological disinhibition replicates the signature of changes produced by nerve injury in STT neurons.

a-c, Effect of strychnine and bicuculline on the response threshold of NS-STT neurons: **(a)** paired comparisons before and after drug administration with representative examples in **(b)** and **(c)**. **d-f**, Effect of strychnine and bicuculline on the maximal firing rate of NS-STT neurons: **(d)** paired comparisons before and after drug administration with representative examples in **(e)** and **(f)**. **g**, Effect of combine strychnine and bicuculline on the response threshold of NS-STT neurons with a representative example in **(h)**. **i-k**, Effect of strychnine and bicuculline on the response threshold of WDR-STT neurons: **(i)** paired comparisons before and after drug administration with representative examples in **(j)** and **(k)**. **l-n**, Effect of strychnine and bicuculline on the maximal firing rate of WDR-STT neurons: **(l)** paired comparisons before and after drug administration with representative examples in **(m)** and **(n)**. **o-q**, Effect of strychnine and bicuculline on response dynamics of STT-Adapting neurons: **(o)** paired comparisons of the adaptation time before and after drug administration with the mean response dynamics in saline versus strychnine **(p)** or bicuculline **(q)**; *inset* representative recordings of single responses (scale bar: x= 1 s. , y=

30 μ V). Sal = saline; STRY = strychnine; BICU = bicuculline. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$;
*** $P < 0.001$. n.s. indicates not statistically significant.

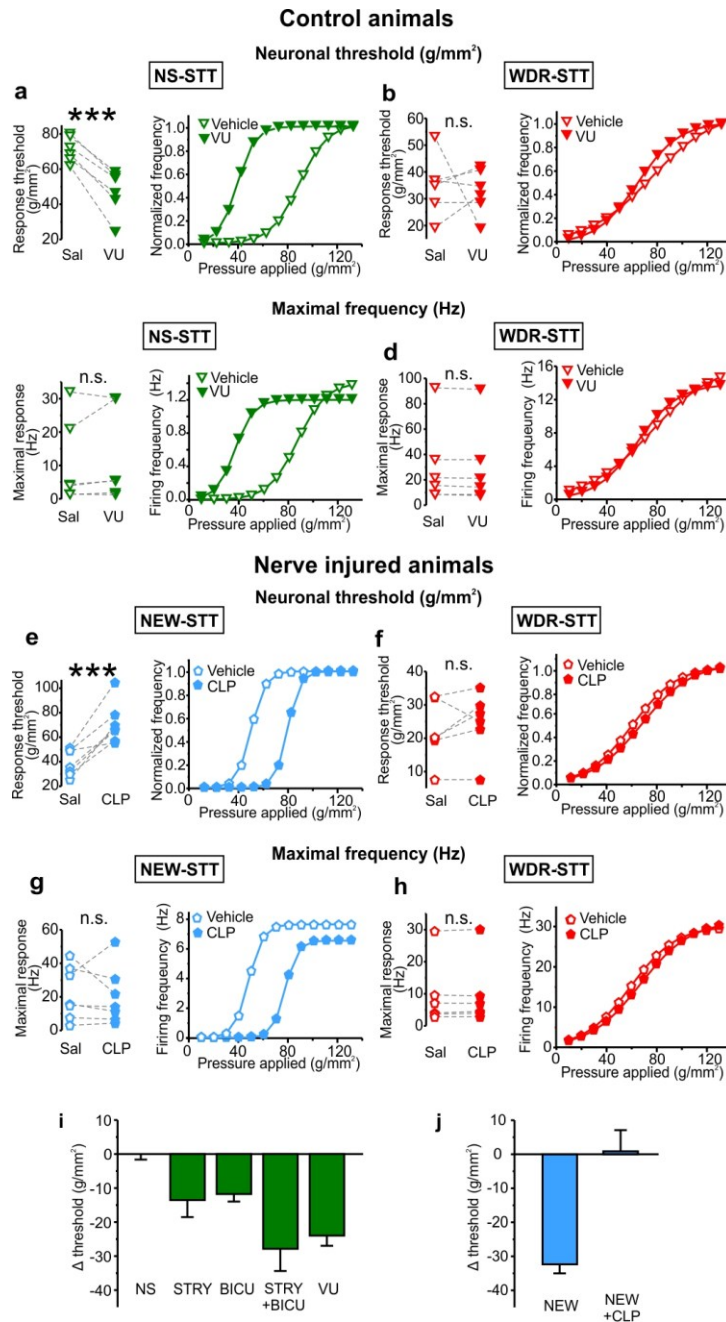


Figure 5. Negative and positive modulation of Cl⁻ transport respectively replicates and rescues change in NS-STT response threshold.

a, Effect of the selective KCC2 blocker VU 024551 on NS-STT response threshold in control animals with a representative example in **(b)**. **c**, Effect of VU 024551 on maximum

discharge response of NS-STT neurons in control animals with a representative example in **(d)**. **e**, Effect of VU 024551 on WDR-STT response threshold in control animals with a representative example in **(f)**. **g**, Effect of VU 024551 on maximum discharge response of WDR-STT neurons in control animals with a representative example in **(h)**. **i**, Effect of the selective KCC2 activator CLP 257 on NS-STT response threshold in nerve injured animals with a representative example in **(j)**. **k**, Effect of CLP 257 on maximum discharge response of NS-STT neurons in nerve injured animals with a representative example in **(l)**. **m**, Effect of CLP 257 on WDR-STT response threshold in nerve injured animals with a representative example in **(n)**. **o**, Effect of CLP 257 on maximum discharge response of WDR-STT neurons in nerve injured animals with a representative example in **(p)**. **q**, Comparison of the effect of the Glycine and GABA_A receptor blockers strychnine and bicuculline vs. the selective KCC2 blocker VU 024551 on the response threshold of NS-STT neurons. **r**, Normalization of the response threshold of NEW-STT neurons by administration of the KCC2 activator CLP 257 in nerved injured animals. Δ Threshold = change in threshold from mean value of NS-STT in control animals. Vehicle = 0.1% DMSO in saline. *** $P < 0.001$. n.s. indicates not statistically significant.

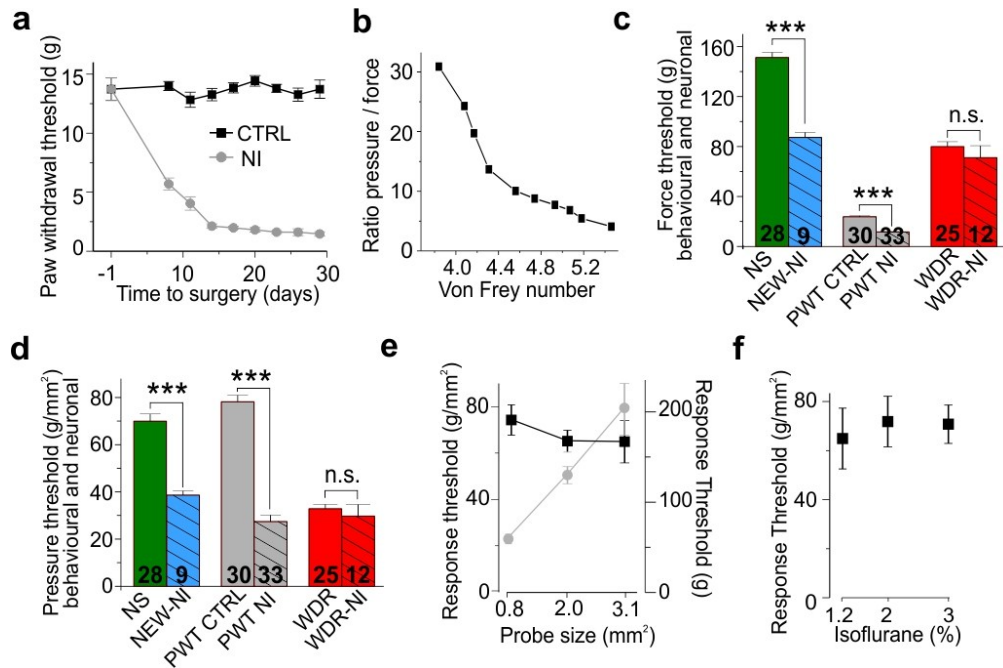
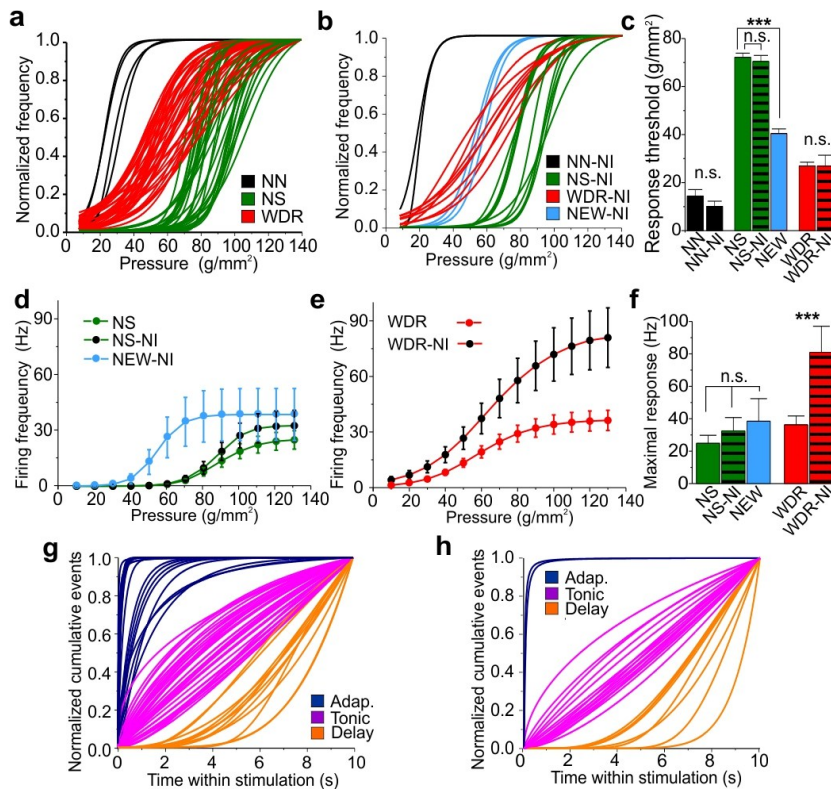


Figure 6. Correlation between the behavioural paw withdrawal threshold and NS-STT response thresholds.

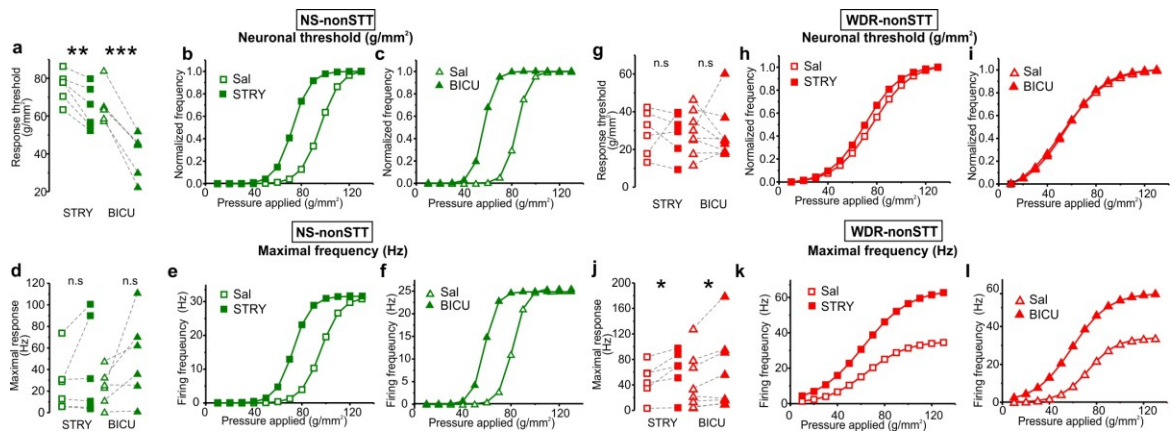
a, Mean behavioural paw withdrawal threshold in control (n=53) and nerve injured (n=33) rats. **b**, Relationship between force and pressure for different von Frey filaments. **c**, Mean response threshold of NS neurons measured in pressure (*left scale* black line; $P > 0.05$) and force (*right scale* gray line; $P < 0.001$; n=7 rats) values for three different probe sizes. **d**, Response threshold of NS neurons under different isoflurane concentration ($P > 0.05$; n=7 rats). **e,f**, Mean neuronal and behavioural threshold in force (**e**) or pressure (**f**) values for control and nerve injured animals. *** $P < 0.001$. n.s. indicates not statistically significant. -NI indicates data from nerve injured animal model.

Supplementary Data



Supplementary Fig 1. Contrary to their STT counterpart, nerve injury alters the properties of both the NS and WDR non projection neurons.

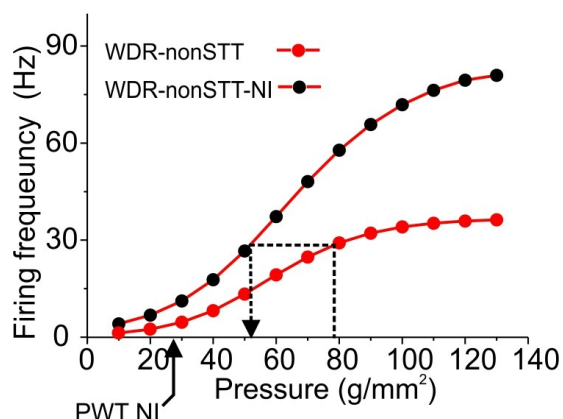
a,b, Input/output profiles of non-STT neurons in control animal (**a**) and nerve injured animals (**b**). **c**, Mean response threshold of the different classes of non-STT neurons before and after nerve injury. **d,e**, Firing frequency of NS / NEW (**d**) and (**e**) WDR nonSTT neurons before and after nerve injury. **f**, Mean maximal frequency of the different classes of non-STT neurons before and after nerve injury. **g,h**, Response dynamics of non-STT neurons in control (**g**) and nerve injured (**h**) animals (fixed noxious stimulus: 100g/mm² for 10s). *** $P < 0.001$. n.s. indicates not statistically significant. -NI indicates data from nerve injured animal model.



Supplementary Fig 2. Pharmacological disinhibition also replicates the signature of changes produced by nerve injury on nonSTT neurons.

a-c, Effect of strychnine and bicuculline on the response threshold of NS-nonSTT neurons: **(a)** paired comparisons before and after drug administration with representative examples in **(b)** and **(c)**. **d-f**, Effect of strychnine and bicuculline on the maximal firing rate of NS-nonSTT neurons: **(d)** paired comparisons before and after drug administration with representative examples in **(e)** and **(f)**. **g-i**, Effect of strychnine and bicuculline on the response threshold of WDR-nonSTT neurons: **(g)** paired comparisons before and after drug administration with representative examples in **(h)** and **(i)**. **k-m**, Effect of strychnine and bicuculline on the maximal firing rate of WDR-nonSTT neurons: **(k)** paired comparisons before and after drug administration with representative examples in **(l)** and **(m)**. Sal = saline; STRY = strychnine; BICU = bicuculline. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$. ; n.s. indicates not statistically significant.

Frequency encoding



Supplementary Fig 3. Changes in firing rate of WDR-nonSTT neurons cannot account for tactile allodynia after nerve injury.

We used the control paw withdrawal threshold value to determine a theoretical WDR-nonSTT frequency of discharge associate with this behavioural threshold in normal condition. We reported this frequency on the WDR-nonSTT curve of nerve injured animals and noted the corresponding pressure. We thus revealed a major discrepancy between the behavioural and neuronal allodynic threshold precluding a role of WDR-nonSTT in allodynia. -NI indicates data from nerve injured animal model. PWT indicate paw withdrawal threshold.

Chapitre 3

Chloride extrusion enhancers as novel therapeutics

Authors: Martin Gagnon^{1,2,3}, Annie Castonguay^{1,2}, Guillaume Lavertu^{1,2}, Marc Bergeron^{1,2}, Karine Bachand^{1,2}, Christian Tardif^{1,4}, Mariève Jacob-Wagner⁵, Jeffrey Coull³, Paul Isenring⁵, Giorgio Attardo³, Yves De Koninck^{1,2,4}

1. Institut universitaire en santé mentale de Québec, Qc.

2. Department of Psychiatry & Neuroscience, Université Laval, Québec, Qc.

3. Chlorion Pharma, Inc. Laval, Qc.

4. Graduate program in biophotonics, Université Laval, Québec, Qc.

5. Centre de recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Qc.

En révision *Nature Medicine*

Résumé

Le cotransporteur K^+-Cl^- KCC2 est responsable du maintien d'une faible concentration d'ions chlorures dans les neurones du système nerveux central (SNC), cette faible concentration étant indispensable à l'inhibition post-synaptique des canaux $GABA_A$ et glycine. Une perte d'activité du KCC2 a nouvellement été avancée comme l'un des mécanismes-clés responsables de plusieurs troubles neurologiques et psychiatriques comme l'épilepsie, la spasticité motrice, le stress, l'anxiété, la schizophrénie et les douleurs chroniques (Arion, 2011; Boulenguez et al., 2010; Coull et al., 2003; Hewitt et al., 2009; Huberfeld et al., 2007; Hyde et al., 2011; Price et al., 2005; Tornberg et al., 2005). De récentes études ont démontré qu'une amélioration de l'activité du KCC2 peut être une stratégie thérapeutique à privilégier pour rétablir l'inhibition et une fonction normale dans les pathologies impliquant une perturbation dans le transport des ions chlorures (Doyon et al., 2011; De Koninck, 2007; Kahle et al., 2008). Nous avons conçu un test pour le criblage à haut débit qui a conduit à l'identification d'activateurs du KCC2 permettant de réduire la concentration d'ions chlorures intracellulaire. L'optimisation d'une famille de composés arylmethylidine a conduit à la découverte d'un analogue sélectif au KCC2 (CLP257) qui abaisse la concentration d'ions chlorures intracellulaire. Le CLP257 restaure un transport d'ions chlorures normal chez les neurones ayant une activité KCC2 diminuée. Il normalise les réponses électrophysiologiques de champ évoquées par des stimuli sensoriels douloureux au niveau des voies nociceptives sensibilisées suite à une lésion de nerf et soulage l'hypersensibilité dans un modèle murin de douleur neuropathique. Une efficacité orale équivalente à celle de la prégabaline a pu être atteinte grâce au promédicament CLP257. À doses analgésiques équivalentes, le CLP 257 n'a causé aucun trouble moteur, contrairement à la prégabaline et aux autres médicaments couramment utilisés dans les douleurs neuropathiques. Ces résultats valident le KCC2 comme une cible pharmacologique potentiellement très intéressante pour le traitement des maladies du SNC.

Abstract

The K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 is responsible for maintaining low Cl⁻ concentration in neurons of the central nervous system (CNS), essential for postsynaptic inhibition through GABA_A and glycine receptors. Loss of activity of KCC2 has emerged as a key mechanism underlying several neurological and psychiatric disorders including epilepsy, motor spasticity, stress, anxiety, schizophrenia and chronic pain (Arion, 2011; Boulenguez et al., 2010; Coull et al., 2003; Hewitt et al., 2009; Huberfeld et al., 2007; Hyde et al., 2011; Price et al., 2005; Tornberg et al., 2005). Recent studies have shown that enhancing KCC2 activity may be the favoured therapeutic strategy to restore inhibition and normal function in pathological condition involving impaired Cl⁻ transport (Doyon et al., 2011; De Koninck, 2007; Kahle et al., 2008). We designed an assay for high throughput screening which led to the identification of KCC2 activators that reduce [Cl⁻]_i. Optimization of a first-in-class arylmethylidene family of compounds resulted in a KCC2-selective analog (CLP257) that lowers [Cl⁻]_i. CLP257 restores impaired Cl⁻ transport in neurons with diminished KCC2 activity, renormalises evoked field electrophysiological responses to sensory stimuli in spinal nociceptive pathways sensitized after nerve injury and alleviates hypersensitivity in a rat model of neuropathic pain. Oral efficacy equivalent to that of Pregabalin was achievable with a CLP257 prodrug. At equipotent doses for analgesia the prodrug caused no motor impairment unlike Pregabalin and other common neuropathic pain drugs. These results validate KCC2 as a druggable target for CNS diseases.

Results

To identify compounds that increase Cl⁻ efflux, a simple fluorometric assay was developed to measure [Cl⁻]_i in real-time. As a model, we chose a cell line which expresses low levels of KCC2 protein and in which the Cl⁻-sensitive indicator clomeleon (Kuner and Augustine, 2000) has been stably transfected. Low KCC2 expression was demonstrated by Western blot experiments on total NG108-clomeleon (NG108-cl) cell lysate alongside negative (human epithelial kidney cells line HEK293) and positive (hippocampal neurons) controls

(**Fig. 1a**). KCC2 is expressed in the CNS in mammals, and therefore shows strong expression (~140 kDa band) in hippocampal neurons whereas it is not in HEK293 cells as expected, even after concentrating KCC2 protein by immunoprecipitation (IP) (**Fig. 1a**). No KCC2 signal was seen in total NG108-cl cell lysate (**Fig. 1a**). A faint immunoreactive KCC2 band (~150 kDa) was observed in NG108-cl cells after IP of KCC2 protein (**Fig. 1a**), indicating that KCC2 is expressed in these cells but at very low levels, thus providing a system with low KCC2 ion transport activity that resembles the pathophysiological situation encountered in neuropathic pain. As a control, the expression of the ubiquitous NKCC1 transporter was confirmed in hippocampal neurons, HEK293 and NG108 cells.

The fluorometric assay was calibrated and validated by placing the NG108-cl cells in isosmolar extracellular media containing increasing $[Cl^-]$ and 0.15% Triton X-100, to permeabilize the cell membrane and clamp $[Cl^-]_i$ at different levels. We found a linear relationship between the fluorescence ratio and the $[Cl^-]_i$ (**Fig. 1b**). In the range of the natural $[Cl^-]_i$ for these cells, the fluorescence ratio was minimally affected by changes in pH. High-throughput screening of a 92,500 drug-like (Lipinski et al., 2001) compound library was then carried out to identify small molecules able to reduce $[Cl^-]_i$. A total of 78 were confirmed as positive hits. Of these, compound CL-058 was selected for further characterization and optimization (**Fig. 1d**).

More than 300 unique analogues of CL-058 were designed and synthesized in order to improve potency and drug-like properties (Lipinski et al., 2001). This lead optimization campaign enabled to define a clear structure-activity relationship (**Supplementary Fig. 1; Supplementary Table 1**), and to improve on the potency of CL-058 ($EC_{50} = 31.5\mu M$) by almost 3 logs with compounds such as CLP355 ($EC_{50} = 50nM$; **Fig. 1c**). CLP257 ($EC_{50} = 616nM$) was chosen for further characterization due to its better chemical stability and overall properties.

A variant of the clomeleon assay was used to show selectivity. Similarly to the NG108 cells, HEK293 cells, which do not express KCC2, but do express NKCC1 (**Fig. 1a**), were stably transfected with the Cl⁻-sensitive indicator clomeleon. HEK293 cells are also known to express the KCC1 and KCC4 cotransporters (Simard et al., 2007). We found no reduction in [Cl⁻]_i in HEK293-cl cells when incubated with CLP257 (**Fig. 1e**), indicating that CLP257 is inactive on NKCC1, KCC1 or KCC4.

An additional assay of CLP257 selectivity was performed in *Xenopus laevis* oocytes microinjected with cRNA coding for the various transporters of the CCC family. Ion transport activity was assessed through influx assays using Rb⁺ (a surrogate of K⁺) as a reporter, quantified by atomic absorption spectroscopy (**Fig. 1f**). Experimental conditions were such that each transporter would uptake Rb⁺ ions (as well as K⁺ and Cl⁻). Pre-incubation of oocytes with CLP257 (200 nM) prior to Rb⁺ flux caused a significant increase of KCC2 transport activity (61% over vehicle-treated oocytes; *P* < 0.01), while causing no significant changes in any of the other transporters (**Fig. 1f**). Functional, dose-dependent antagonism was also observed between CLP257 and the recently characterized KCC2 antagonist VU0240551 (Delpire et al., 2009) (**Fig. 1g**). The affinity of CLP257 for classical pharmacological targets was also assessed using radioligand competition binding assays. Of the 55 radioligand-receptor interactions tested, none were inhibited by more than 30% by 10 μM CLP257 (**Supplementary Table 2**). Taken together these data show that CLP257 reduces [Cl⁻]_i through selective modulation of KCC2.

We then tested whether CLP257 could reverse KCC2 hypofunction in neurons. To achieve this, we measured the effect of CLP257 on Cl⁻ transport in adult spinal cord slices pre-treated with brain derived neurotrophic factor (BDNF), which causes downregulation of KCC2 activity (Rivera et al., 2002; Rivera et al., 2004b) similar to that observed in models of pain hypersensitivity (Coull et al., 2003; Coull et al., 2005; Zhang et al., 2008; Lu et al., 2008; Cramer et al., 2008; Jolivald et al., 2008; Ferrini et al., 2013). KCC2 function was assessed by measuring reverse transport using K⁺- driven Cl⁻ influx (**Fig. 2a**). Fluorescence lifetimes of the Cl⁻ probe MQAE were measured to obtain quantitative estimates of [Cl⁻]_i

independent of $[MQAE]_i$ (Doyon et al., 2011) (**Fig. 2b,c**). Using elevated $[K^+]_e$ to force KCC2-dependant Cl^- influx, we found that the rate of Cl^- accumulation was significantly faster in slices treated with CLP257 (**Fig. 2c,d**; $P < 0.001$), indicating that the compound effectively enhanced Cl^- transport in CNS neurons with reduced KCC2.

The antinociceptive efficacy of CLP257 was tested in nerve injury models of neuropathic pain (Coull et al., 2003; Pitcher et al., 1999; Mosconi and Kruger, 1996; Bennett and Xie, 1988b) (**Fig. 3a,b**). We measured evoked field electrophysiological responses in the superficial dorsal horn to controlled graded mechanical stimuli of the hind foot. We found that, in naïve animals, CLP257 had no effect on the stimulus-response relationship over the entire range of stimulus intensity (2.5 to 135 g/mm²; **Fig. 3a**). In contrast, in animals with nerve injury, CLP257 significantly decreased by $> 35\%$ ($P < 0.01$) the evoked field response in the noxious range of stimulation (> 80 g/mm²) while it had no significant effect in the non-noxious range of stimulation ($P > 0.1$; **Fig 3b**).

These results translated into analgesic efficacy as measured by 50% paw withdrawal threshold to innocuous mechanical stimulation in animals with nerve injury. We found that intraperitoneal (IP) administration of CLP257 significantly reduced tactile allodynia, peaking at 100mg/kg, 2 h post-injection (**Fig. 3c**). While significant ($P < 0.05$), the maximal analgesic effect of CLP257 was much weaker than that of Gabapentin (**Fig. 3c**). We hypothesized that a poor pharmacokinetic profile could limit the efficacy of CLP257 by preventing adequate amounts of the compound to reach its site of action in the spinal cord. Pharmacokinetic analysis revealed that plasma concentration of CLP257 fades rapidly, with a terminal half-life ($t_{1/2}$) of < 15 min (**Fig. 3d**). Metabolite analyses revealed that the hydroxyl moiety of CLP257 rapidly undergoes glucuronidation (not shown). Consistent with the fact that this particular functional group is essential for $[Cl^-]_i$ reduction (**Fig. 1c,d**), the glucuronide metabolite was found inactive (**Supplementary Table 1**).

To improve the pharmacokinetics of CLP257, a carbamate prodrug (CLP290) was designed, in which a cleavable pyrrolidine-1-carboxylate group protects the hydroxyl group from glucuronidation. Release of CLP257 from CLP290 likely occurs via the action of esterases. The pharmacokinetic profile of CLP257 released from CLP290 was much improved over that of native CLP257 (**Fig. 3d**), with an apparent $t_{1/2}$ of 5 hours. Maximal plasma concentration (C_{max}) and exposure (AUC) were also enhanced (**Fig. 3d**). Consistent with this, we found greater analgesic efficacy after oral administration of CLP290 (**Fig. 3e**). Maximal efficacy for CLP290 was equivalent to that of Pregabalin, albeit at a higher dose (100mg/kg vs 30mg/kg; (**Fig. 3e**).

Although higher doses of CLP290 are necessary to attain efficacy comparable to that of Pregabalin, the latter is known for causing sedation and dizziness, greatly affecting motor performance (Gilron and Coderre, 2007). The impact of a single dose of CLP290 on the motor function was evaluated using an accelerating rotorod. Naïve animals were treated orally with equipotent doses of CLP290 and Pregabalin (100mg/kg vs. 30mg/kg, respectively) or vehicle and motor performance was measured 2 h post-dosage. CLP290 caused no impairment in motor function when compared to vehicle (**Fig. 3f**), at a dose where it achieved analgesic efficacy. In contrast, a significant loss in motor performance (44%, $P < 0.01$) was seen in animals treated with Pregabalin. These results show that modulating $[Cl^-]_i$ produces analgesia without concomitant motor side effects often seen with other neuropathic pain drugs. This finding is consistent with the observation that KCC2 already operates near equilibrium in normal cells (Buzsaki et al., 2007). Hence it was predicted that enhanced KCC2 activity will minimally enhance inhibition in normal conditions (Doyon et al., 2011).

Discussion

This work validates KCC2 as a druggable target and Cl^- modulation as a novel mechanism of action for the development of therapeutics. KCC2 itself represents an interesting target. Its expression is limited to the central nervous system, unlike other ion transporters of the same family (KCC1, KCC3, KCC4, NKCC1, NKCC2) that are expressed in several

tissues(Mercado et al., 2004), including the kidneys and blood vessels where ionic homeostasis is important. The constrained expression of KCC2 makes it a prime target for the control of $[Cl^-]_i$ in neurons and should limit adverse side effects in other organs.

Our results show that the identification of a mechanism underlying neuropathic pain has allowed the development of a new class of compounds directly aimed at hypersensitivity. Up to now, the poor understanding of the pathophysiology of neuropathic pain has limited drug development (Nightingale, 2012) and, as such, the currently approved drugs come mostly from different therapeutics classes such as anticonvulsants (Vargas-Espinosa et al., 2012), antidepressants (Dharmshaktu et al., 2012) and opioid narcotics (Smith, 2012). As evidence is mounting that KCC2 dysfunction and Cl^- homeostasis are central to many CNS disorders(Arion, 2011;Boulenguez et al., 2010;Coull et al., 2003;Hewitt et al., 2009;Huberfeld et al., 2007;Hyde et al., 2011;Price et al., 2005;Tornberg et al., 2005), we believe that Cl^- extrusion enhancers such as CLP257 and CLP290 represent a novel and important new method of treatment for a wide range of neurological indications.

Methods

Cell culture, transfection, and lysis

Human embryonic kidney 293 (HEK293) and neuroblastoma/glioma-derivative NG108-15 (NG108) cells were grown on non-coated 10 cm plates, and maintained in DMEM/High Glucose medium (Thermo Scientific) supplemented with 10% fetal bovine serum and 50 U/ml penicillin/streptomycin mixtures (Invitrogen). Both cell lines were stably transfected with pcDNA3.1-Clomeleon using Escort IV reagent (Sigma) and kept under selection with G418 (Sigma, 200 μ g/ml for HEK293-cl and 400 μ g/ml for NG108-cl). Cells were propagated at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ and lysed at ~80-90% cell confluence.

The preparation of rat hippocampal cultures has already been described in detail (Hudmon et al., 2005). Briefly, rat hippocampi were dissected out of post-natal day 0 (P0) rats and cells were dissociated both enzymatically using 12 U/ml papain (Worthington Biochemical Corporation) and mechanically by trituration with a Pasteur pipette. After dissociation, cells were washed, centrifuged, plated on three poly-d-lysine coated 3,5cm plates (1×10^6 cells/plate), and maintained in Neurobasal medium supplemented with B27 (50:1), 50 U/ml penicillin/ streptomycin mixtures, and 0.5mM L-glutamax. To reduce the number of glial cells, 5 μ M of cytosine arabinofuranoside (ARA-C; Sigma) was added 5 days after plating and cells were kept in culture for 5 additional days in presence of ARA-C. The day after and twice a week thereon, half of the growth medium was replaced with medium without ARA-C. Neurons were propagated at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ and lysed at 20 DIV.

Cells were lysed in 1 ml RIPA buffer (50mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% Na-deoxycholate, and 0.1% SDS) supplemented with Complete[®] protease inhibitor cocktail (Roche). After incubation on a rotator (overnight; 4°C) and centrifugation at 18,000g (15 min; 4°C), supernatants were transferred into new tubes and labelled total cell lysates. Total protein concentration was determined using the Bio-Rad DC[™] Protein Assay.

Immunoprecipitation studies

After incubation of ~ 1 mg total proteins with 5 μ l of monoclonal mouse α -KCC2 (clone N1/12) antibodies (Neuromab) on a rotator (overnight; 4°C), KCC2 protein was purified by addition of 50 μ l RIPA-solubilised Protein A Sepharose[™] CL-4B (GE Healthcare), followed by overnight incubation at 4 °C and recovery of the beads by centrifugation at 9,000g (1 min; 4°C). Finally, immunoprecipitated KCC2 protein was released from the beads by boiling in 50 μ l 2x protein sample buffer, and subjected to SDS-PAGE and Western analyses.

SDS-PAGE and Western blot analyses

Total proteins (5 μ g) and immunoprecipitated KCC2 (15 μ l) were run on 8% Tris-Tricine SDS/polyacrylamide gels. Gels were transferred onto Immun-Blot® PVDF membranes (BioRad) for Western blot analysis. Blots were sequentially incubated with primary and secondary antibodies. The primary antibodies, polyclonal rabbit anti-KCC2 (Upstate), mouse monoclonal anti-NKCC1 or anti- β -actin (Sigma) were used at a dilution of 1/1,000, 1/500 and 1/40,000, respectively. The secondary antibodies, goat anti-rabbit IgG-HRP-conjugated (Promega) and anti-mouse IgG (H+L)-HRP conjugate (Bio-Rad), were used at a dilution of 1/10,000 and 1/4,000 respectively.

Clomeleon assay

NG108-cl cells or HEK293-cl cells were seeded in 96-well plates in low chloride assay medium (30mM HEPES, 2mM CaCl₂, 2mM MgSO₄, 10mM K gluconate, 2mM NaH₂PO₄, adjusted to pH 7.4 and 310 mOsm with Na gluconate). Validation of assay was performed by adding an equal volume of assay media at pH 7.4 containing varying [Cl⁻] or assay media containing 100mM NaCl and varying pH, with or without 0.15% Triton X-100. Test articles (CLP257 and other compounds at various concentrations or DMSO vehicle, 4 replicates per condition) were prepared in high chloride assay media (30mM HEPES, 2mM CaCl₂, 2mM MgSO₄, 10mM K gluconate, 2mM NaH₂PO₄, 100mM NaCl, adjusted to 310 mOsm with Na gluconate) and added to the cells in an equal volume, resulting in a final [Cl⁻]_e of 50mM. A positive control consisting of low chloride assay media containing 0.15% Triton X-100 was used. [Cl⁻]_i was measured every hour up to 5 hours following treatment using a fluorescence microplate reader (PerkinElmer Fusion, Ex 415nm, Em 485nm and 535nm). Results are expressed as percent [Cl⁻]_i reduction after standardizing untreated cells to 0% [Cl⁻]_i reduction and cells treated with low chloride / 0.15% Triton X-100 assay media to 100% chloride reduction. Non-linear regression analyses were performed using GraphPad Prism. High-throughput screening was done by scaling down the assay to 384-well plates and testing a 92,500 compound library (Chemdiv, Panlabs) at 112

10 μ M in single replicates using conditions as above. Compounds showing [Cl⁻]_i reduction greater than 3 standard deviations from negative control were retested in triplicate to confirm activity.

Rb⁺ flux assays

Defolliculated stage V-VI *Xenopus laevis* oocytes were microinjected with 10ng of cRNA coding for the various CCCs, and maintained for 3 days at 18°C in Barth's medium plus 125 μ M furosemide. For KCC1, KCC3 and KCC4: oocytes were pre-incubated for 1h in a hypotonic solution (~55mM Cl⁻ and 125mOsm) containing CLP257 or DMSO vehicle control. For NKCC1 and NKCC2, oocytes were pre-incubated for 1h in a low Cl⁻/hypertonic solution (~5mM Cl⁻ and 285mOsm) containing CLP257 or DMSO vehicle control. For KCC2, oocytes were pre-incubated for 1h in physiological solution (86mM Cl⁻ and ~200mOsm) containing CLP257 or DMSO vehicle control. Oocytes were then incubated for another 45 min in a physiological solution (86mM Cl⁻ and ~200mOsm) supplemented with 5mM Rb⁺, 10 mM ouabain and compound or vehicle control. Oocytes were then bathed several times in a wash solution supplemented with 10mM ouabain, 250mM bumetanide and 250mM furosemide. Oocytes were then lysed in pure nitric acid and their Rb⁺ content was measured by atomic absorption spectrometry using a Varian AA240. All steps were carried out at room temperature. Results are expressed as percent change of Rb⁺ influx in compound-treated oocytes versus Rb⁺ influx in vehicle-treated oocytes. Statistical differences between vehicle and CLP257 conditions were determined by Student's T test.

Imaging of reverse Cl⁻ transport in rat lamina I neurons

Parasagittal slices of rat spinal cord were labelled in ACSF containing 5mM of the Cl⁻ indicator MQAE (N-6-methoxyquinolinium acetoethylester, Molecular Probes) for 30-40 min at 34°C. Slices were then transferred to a perfusion chamber (2 ml min⁻¹) and extracellular MQAE was washed out for 10min in the presence of 1 μ M tetrodotoxin, 10 μ M

CNQX, 40 μ M AP5, 1 μ M strychnine and 10 μ M gabazine to minimize KCC2-independent Cl⁻ transport.

MQAE fluorescence was excited using a Zeiss LSM510 laser-scanning microscope coupled to a femtosecond-pulsed Ti-Sapphire laser (Chameleon Ultra, Coherent) tuned at 750nm. Fluorescence of MQAE was acquired through a 40x water-immersion objective (Zeiss, 0.8 NA) and a band-pass filter (390–465nm). Fluorescence lifetime was recorded with a Becker & Hickl SPC-830 module through the nondescanned port of the Zeiss LSM510 using a band-pass filter (469/35nm, Semrock) coupled to a laser block (short-pass 750nm, Semrock). Photons were detected using a PMC-100-1 photosensor (Hamamatsu).

Instrument response function of the detection path was acquired using an 80-nm gold nanoparticle suspension to generate second-harmonic signal. Absolute [Cl⁻]_i was calculated from a calibration of the Cl⁻ dependence of MQAE lifetime as described before⁹.

Recorded cells were visually identified as lamina II cells merging transmitted light and MQAE fluorescence. Lifetime images were acquired every 10s for a period of 7min. After a control period of 50s, perfusion solution was switched to ACSF containing 15mM KCl (osmolarity adjusted using mannitol) to reverse KCC2-mediated Cl⁻ transport(Chorin et al., 2011).

Lifetime in each cell was averaged over the whole cell body area and extracted for each time point using custom-made Matlab software. Lifetime changes for each slice were then expressed as the mean of changes occurring in each cell. Briefly, based on the work of Digman et al.(Digman et al., 2008), we converted the photon timing histograms of each acquired lifetime image to phasor plots. Then, for every time-point, regions of interest (ROIs) corresponding to cell bodies were selected and added to a new phasor. Lifetime of

all the cells was averaged for each slice at each time-point to generate the lifetime time-course.

Neuropathic pain models and behavioural testing

Under isoflurane anesthesia (initial concentration of 4%, subsequent concentration 2%) a polyethylene cuff (PNI) (Pitcher et al., 1999; Mosconi and Kruger, 1996) or loose chromic gut ligatures (CCI) (Bennett and Xie, 1988a) were implanted around the left sciatic nerve of 190-200g male Sprague-Dawley rats. Mechanical allodynia was quantified by assessing the paw withdrawal threshold using von Frey filaments (Stoelting, USA) using the up and down method (Chaplan et al., 1994). Animals were classified as allodynic when their paw withdrawal thresholds were below 2g (PNI) or 5g (CCI) for at least two consecutive days after a constant decrease for >10 days post-surgery.

Evoked field electrophysiological recordings in the superficial dorsal horn

Laminectomy were performed on control and nerve injury adult rats (350-450 g) to expose L4-S1 segments of the spinal cord under isoflurane anaesthesia (initial concentration of 4%, subsequent concentration 2%). The animals were paralyzed with pancuronium bromide (Sigma, USA) and ventilated artificially (SAR-830, CWE, USA) via tracheotomy to reduce breathing artefacts. End-tidal CO₂ was monitored using a CAPSTAR-100 (CWE, USA) gas analyzer. Rectal temperature was maintained at 37°C using a heat pad (TR-200, Fine Science Tools, USA). The rat was placed in a stereotaxic and spinal frame with two clamps fixed on its vertebra to immobilize the spinal cord.

A spinal perfusion chamber was created by cutting a window in a solidified 4% agar bloc surrounding the spinal cord. The chamber was continuously perfused with sterile buffered saline (10mM HEPES, Sigma-Aldrich, USA) maintained at 35°C. For drug applications CLP257 was diluted in buffered saline from a DMSO stock solution for a final concentration of 100µM (0.1% DMSO) and perfused for 30min before subsequent

measurements were performed to ensure that stable concentrations were reached within the tissue. 4 μ M TTX (Sigma/RBI) was used as a control to abolish field responses.

A locally designed, automatically controlled, force-feedback mechanical stimulator was used to apply graded and stable mechanical stimulations on the glabrous skin of the paw. Eight or nine graded step pressures covering a large range from non-noxious to noxious stimulation (5-140g/mm²) were used with a 2mm² tip. A 2-4 min recovery period was allowed between stimuli to minimize sensitization. Using the protocol described above, no significant differences were observed when using incremental *vs.* randomized stimulus sequences (not shown).

In vivo field recording were obtained from superficial section of the dorsal horn (300 μ m) that receive input from the glabrous skin of the hind paw. The glass electrode (1-3M Ω) was mounted on a motorized micromanipulator (Burleigh 6000, USA). The signal was amplified (ER-1 Cygnus Technology, USA), filtered at 0.002-2KHz, digitized at 20KHz with a Power1401mkII (CED, UK) and stored on disk. Data were analysed with Spike2 software (CED, UK). To evaluate the effect of the mechanical stimulations, we analysed the area under the curve of the field response generated by the different pressures. We normalized all field area on the maximal response of control condition for each cell and then average the normalized values together. Paired sample T tests were used to compare saline versus CLP257 condition for each intensity of stimulation.

Pharmacokinetic analysis

CLP257 and CLP290 (formulated as a solution in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in water) were administered intravenously, intraperitoneally or orally to male Sprague-Dawley rats. Blood samples were collected from the saphenous vein pre-dose, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, and 7 hours post-dose. Each blood sample (approximately 0.5 mL) was collected into a tube containing an anticoagulant (Na₂-EDTA). Following collection, the samples were

placed on wet ice and then centrifuged. The plasma obtained from each sample was recovered and stored frozen (at -80°C) pending analysis by LC/MS.

Rotorod assay

Baseline motor performance of male Sprague-Dawley rats was measured on the day of the test, prior to administration of test compounds, using an accelerating rotorod (IITC). Time on rod was assayed twice for each animal. CLP290 (formulated as a solution in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in water), Pregabalin (formulated in 0.9% NaCl in water) or vehicle (2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in water) were then administered orally. Rotorod performance was measured again 2 hours post-dose. Results are expressed as percent of pre-dose time on rod for each group of animals.

Competitive binding assays

The competitive binding inhibition of 10 μM CLP257 for a number of receptor systems was assessed using validated radioligand competition binding assays under conditions defined by the contractor. Additional information on the assay conditions can be obtained from the contractor's website (www.cerep.fr).

Figures

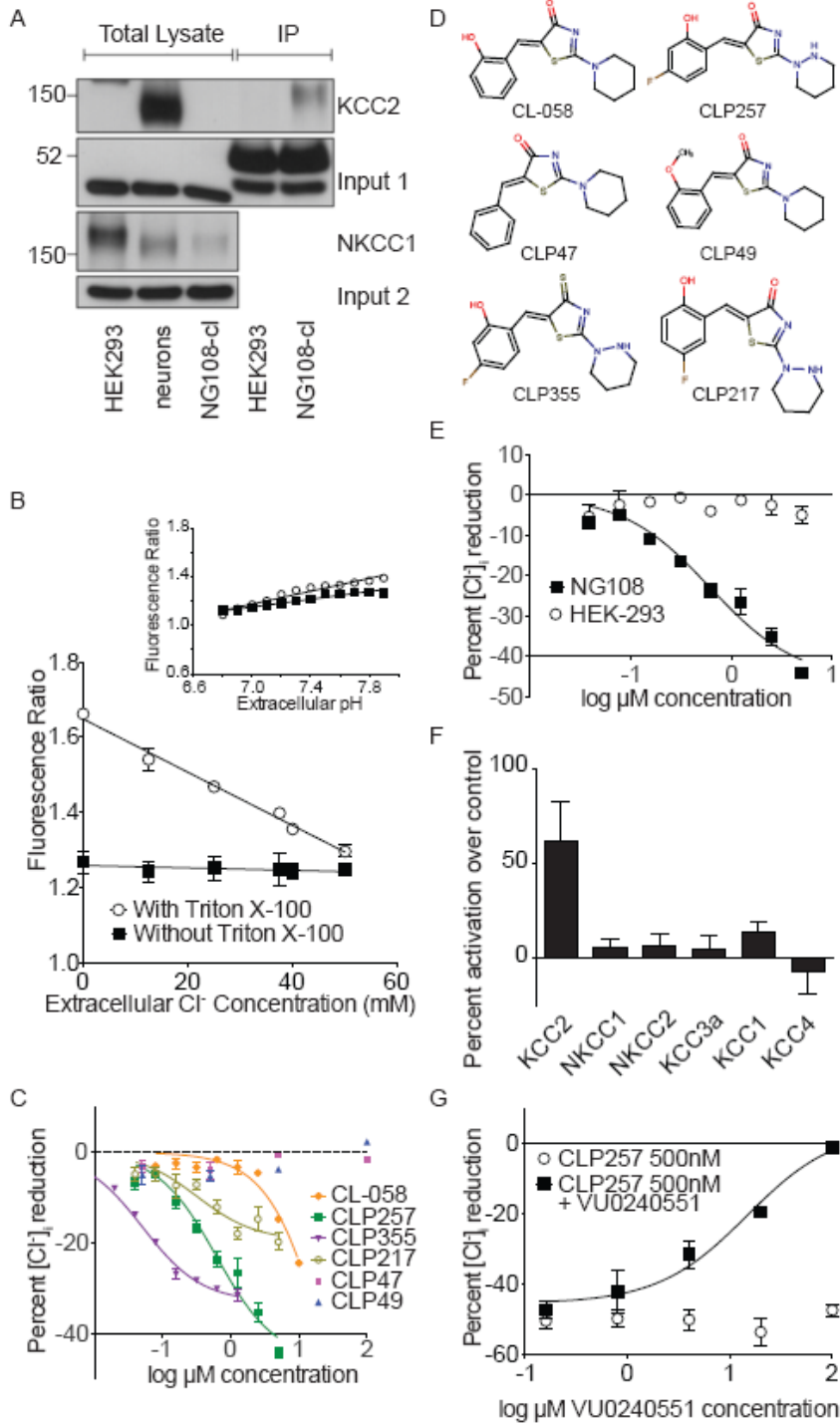


Figure 1:

a) Expression of KCC2 in clomeleon-stably-transfected NG108-cl cells. Western blots showing KCC2 immunoreactive band (~140-150kDa) in the total lysate of hippocampal neurons (positive control) and in NG108-cl after immunoprecipitation (IP) of KCC2 protein. KCC2 is not expressed in HEK293 cells (negative control). NKCC1 immunoreactive band (~150-160 kDa) is present in all total cell lysates. The protein β -actin is used as loading control. A β -actin immunoreactive band (~42 kDa) is observed in all lanes of Input 1 and 2. An IgG immunoreactive band (~50 kDa) is also detected in IP lanes of Input 1 as control for the amount of antibodies used in IP experiments. **b)** Correlation between chloride concentration and YFP/CFP clomeleon fluorescence ratio. NG108-cl $[Cl^-]_i$ concentration was clamped to isosmolar extracellular media containing 0.15% Triton X-100 and varying concentration of chloride. A linear relationship between the fluorescence ratio and the $[Cl^-]$ is demonstrated. Shown are means \pm SEM of n=8. Inset shows the minimal contribution of pH variations over a physiological range to fluorescence ratio changes (means \pm SEM of n=4). **c)** Concentration-response curves of CL-058 hit compound and selected analogs. $[Cl^-]_i$ in NG108-cl cells was measured using the clomeleon assay after a 5 hour exposure to various concentrations of compound. Potency can be affected by chemical modification, with EC_{50} values as low as 50nM (CLP355) to compounds being inactive at concentrations of 100 μ M (CLP47 and CLP49). Shown are means \pm SEM of n=4 assays. **d)** Chemical structures of CL-058 analogues tested in c). **e)** Concentration-response curves of CLP257 in NG108-cl and HEK293-cl. $[Cl^-]_i$ was measured using the clomeleon assay after a 5 hour exposure to various concentrations of compound. CLP257 caused a concentration-dependent reduction in $[Cl^-]_i$ only in KCC2-positive NG108-cl cells. KCC2-negative HEK293-cl cells were unaffected by CLP257. Shown are means \pm SEM of n=4 assays. **f)** Effect of CLP257 on ion transport activity of cation chloride cotransporters expressed in *Xenopus laevis* oocytes, measured by influx assays using Rb^+ as a reporter and quantified by atomic absorption spectroscopy. Oocytes were preincubated with CLP257 for 1 hr prior to addition of Rb^+ , and analysed after 45 minutes of flux. Shown are means \pm SEM of $10 \leq n \leq 20$. * $P < 0.01$. **g)** Functional antagonism observed between CLP257 and the KCC2 antagonist VU0240551. Shown are intracellular

chloride reduction after 5h exposure of CLP257 500nM + DMSO vehicle or CLP257 500nM + VU0240551 at various concentrations, as measured by the clomeleon assay in NG108-cl cells, means \pm SEM of n=4

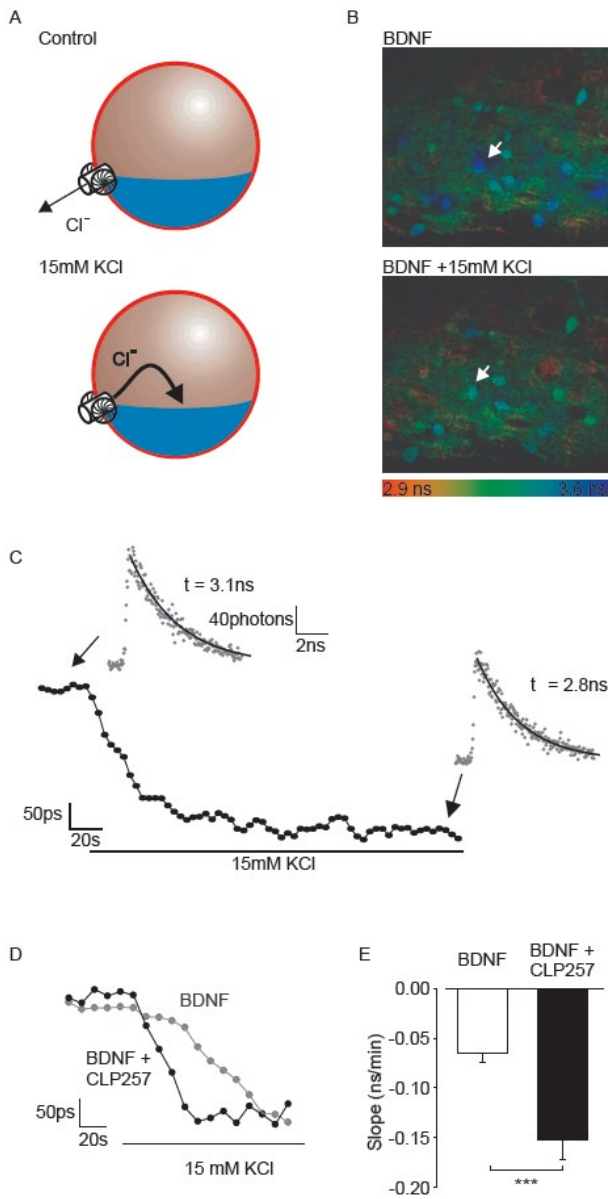


Figure 2: CLP257 restores Cl⁻ transport in BDNF-treated slices.

a) In control conditions KCC2 extrudes Cl⁻ along with K⁺. When the extracellular K⁺ concentration is raised to 15mM, inversion of the transporter occurs and Cl⁻ accumulation inside cells can therefore be measured. **b)** Color-coded lifetime image of lamina II cells loaded with the Cl⁻ indicator MQAE, where lower lifetime values correspond to high Cl⁻

concentration. Upon reversal of the Cl⁻ transport induced by perfusion of the 15mM KCl extracellular solution, lifetime values decrease as the intracellular Cl⁻ concentration increases. **c)** Time-lapse of Cl⁻ accumulation in the cell bodies of the neurons shown in **b**, upon application of the 15mM KCl extracellular solution. One fluorescence lifetime image was taken every 10s to follow Cl⁻ changes through time. *SB: v: 50ps; h: 20s*. Insets show the photon distribution histograms that were fitted to extract the lifetime of one of the cells shown in **b** (arrow), during the control period (top) and after Cl⁻ equilibration in 15mM KCl (bottom). *S.B.: v: 40 photons, h: 2ns*. **d)** Effects of CLP257 on the efficacy of Cl⁻ transport in lamina II cells. It was previously described that incubation of spinal cord slices in BDNF impairs Cl⁻ transport through an effector of the TrkB receptor. However after incubation in BDNF for 2h, addition of CLP257 to the extracellular solution for 2h resulted in an improvement of the Cl⁻ transport rate measured. *SB: v: 50ps, h: 20s*. (left panel). Comparison of the slope of Cl⁻ changes measured in lamina II cells in BDNF and in BDNF + CLP257 (right panel). The capacity of Cl⁻ extrusion was doubled after 2h incubation with 100μM CLP257 compared to the BDNF condition.

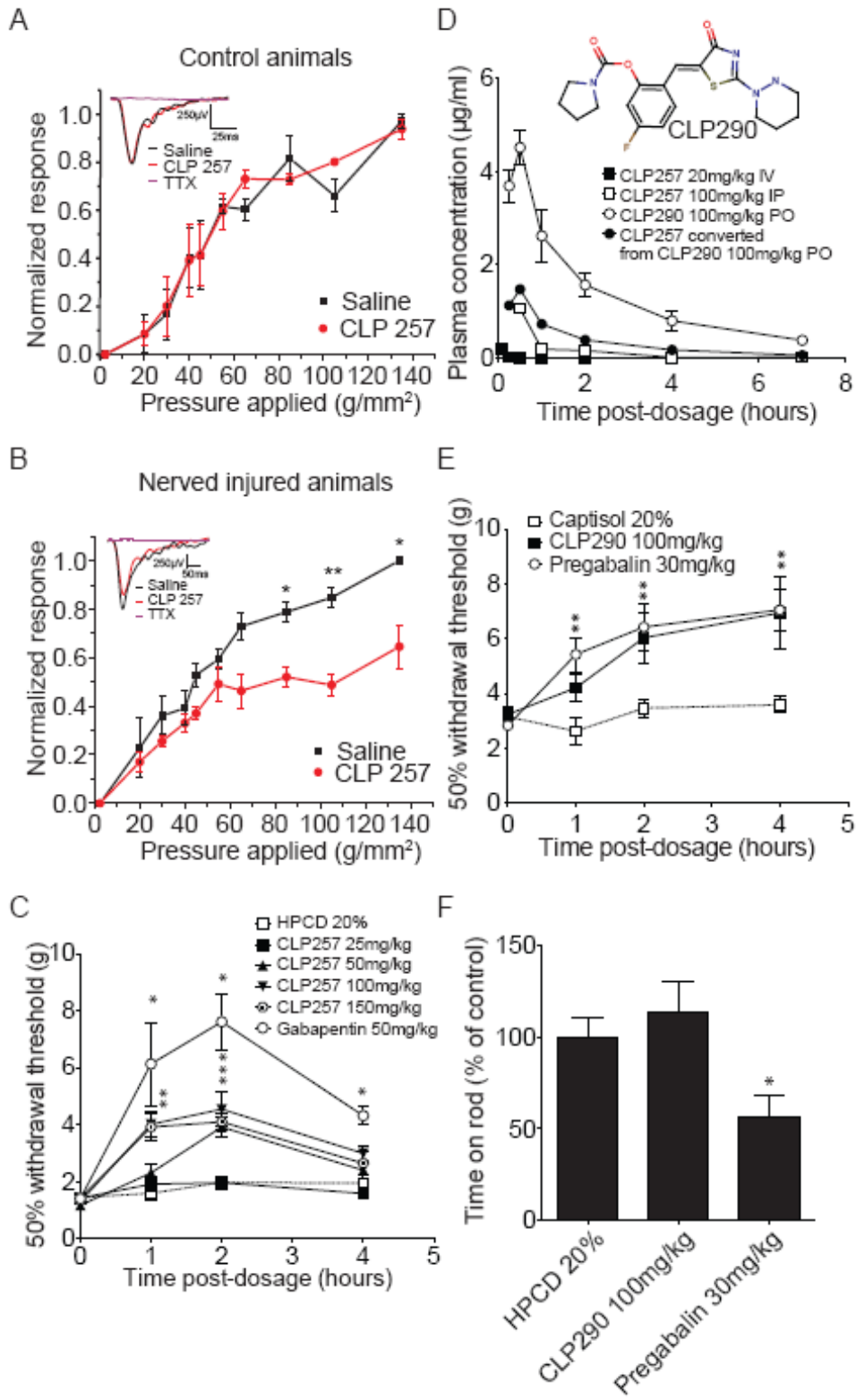
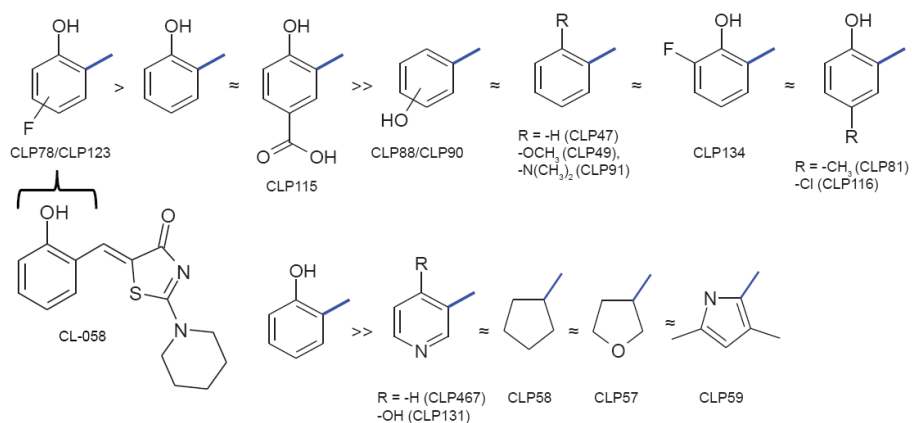


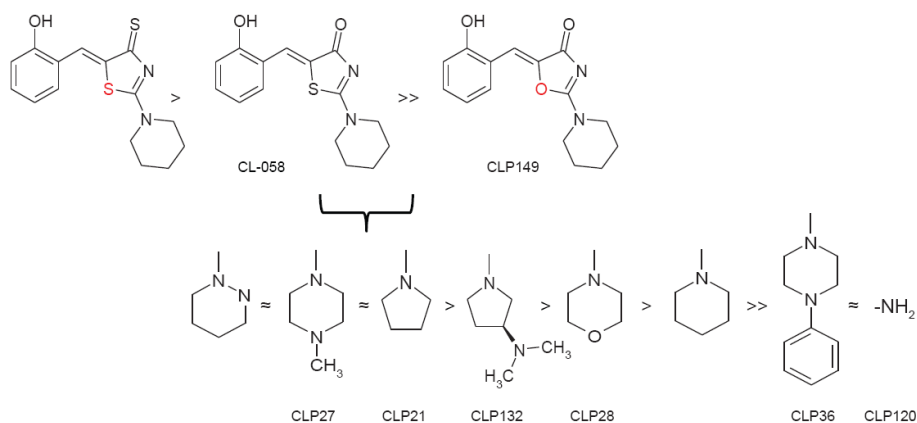
Figure 3:

a) Input/output field response of the superficial layers neurons to multiple natural mechanical stimuli and the effect of CLP257 on this response in control animals. Inset: Representative example of a field response after saline, CLP257 and TTX application in control animal. **b)** Input/output field response of the superficial layers neurons to multiple natural mechanical stimuli and the effect of CLP257 on this response in nerve injured animals. Inset: Representative example of a field response after saline, CLP257 and TTX in nerve injured animals. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. **c)** Analgesic effect of CLP257 in rat peripheral nerve injury model. CLP257 in 20% 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin administered IP shows dose-dependent reversal of mechanical allodynia assessed by von Frey hairs, peaking at 100mg/kg and 2 hrs. Shown are means \pm SEM of $8 \leq n \leq 10$. * $P < 0.05$. **d)** Pharmacokinetic profile of CLP257 and the carbamate prodrug CLP290 in Sprague-Dawley rats after IV, IP or PO administration. Apparent absorption and plasma half-life of CLP257 released from parent CLP290 improved over that of CLP257 administered directly. Shown are means \pm SEM of $n=3$ animals per time point. Inset: structure of CLP290. **e)** Analgesic effect of CLP290 in rat chronic constriction injury model. CLP290 in 20% 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin administered PO (100mg/kg) shows reversal of mechanical allodynia, on par with the gold-standard Pregabalin (30mg/kg). Shown are means \pm SEM of $7 \leq n \leq 32$. * $P < 0.05$. **f)** Effect of CLP290 on motor performance in Sprague-Dawley rats, as measured by time spent on accelerating rotorod. CLP290 in 20% 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin administered PO (100mg/kg) caused no significant change in motor performance, while Pregabalin (30mg/kg) produced a significant reduction. Shown are means \pm SEM of $4 \leq n \leq 12$. * $P < 0.05$.

Supplementary Data



B



Supplementary Figure 1: Structure-activity relationship (SAR) of the CL-058 family of compounds.

a) Impact of modification of the phenol ring. Presence of a hydroxyl group in the ortho position is essential for activity. b) Substitution of the thiazol central ring to oxazol leads to complete loss of activity, while changing its ketone to a thione increased potency. SAR

established the cyclic amine and thiazolidine rings as pharmacophores. The SAR validated the CL058 chemical series for drug optimization.

Supplementary Table 1: Activity of key CL-058 analogs as assessed in NG108-cl cells using the clomeleon assay. ED₅₀ values offer a relative measure of potency.

Compound code	Name	ED ₅₀ (μM)
CL-058	(5Z)-5-[(2-hydroxyphenyl)methylidene]-2-(piperidin-1-yl)-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-one	31.54
CLP78	(5Z)-5-[(5-fluoro-2-hydroxyphenyl)methylidene]-2-(piperidin-1-yl)-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-one	4.304
CLP123	(5Z)-5-[(4-fluoro-2-hydroxyphenyl)methylidene]-2-(piperidin-1-yl)-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-one	2.987
CLP134	(5E)-5-[(3-fluoro-2-hydroxyphenyl)methylidene]-2-(piperidin-1-yl)-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-one	inactive
CLP88	(5Z)-5-[(3-hydroxyphenyl)methylidene]-2-(piperidin-1-yl)-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-one	inactive
CLP90	(5Z)-5-[(4-hydroxyphenyl)methylidene]-2-(piperidin-1-yl)-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-one	inactive
CLP115	4-hydroxy-3-(((5Z)-4-oxo-2-(piperidin-1-yl)-4,5-dihydro-1,3-thiazol-5-ylidene)methyl)benzoic acid	10.06
CLP47	(5Z)-5-(phenylmethylidene)-2-(piperidin-1-yl)-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-one	inactive
CLP49	(5Z)-5-[(2-methoxyphenyl)methylidene]-2-(piperidin-1-yl)-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-one	inactive
CLP91	(5Z)-5-[(2-(dimethylamino)phenyl)methylidene]-2-(piperidin-1-yl)-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-one	inactive
CLP81	(5Z)-5-[(2-hydroxy-5-methylphenyl)methylidene]-2-(piperidin-1-yl)-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-one	inactive
CLP116	(5Z)-5-[(5-chloro-2-hydroxyphenyl)methylidene]-2-(piperidin-1-yl)-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-one	inactive
CLP131	(5E)-5-[(4-hydroxypyridin-3-yl)methylidene]-2-(piperidin-1-yl)-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-one	inactive
CLP467	(5Z)-2-(piperidin-1-yl)-5-(pyridin-3-ylmethylidene)-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-one	inactive
CLP58	(5Z)-5-(cyclopentylmethylidene)-2-(piperidin-1-yl)-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-one	inactive
CLP57	(5Z)-5-[(2,5-dimethyl-1,3-thiazol-4-yl)methylidene]-2-(piperidin-1-yl)-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-one	inactive
CLP59	(5Z)-5-[(3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-yl)methylidene]-2-(piperidin-1-yl)-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-one	inactive
CLP149	(5Z)-5-[(2-hydroxyphenyl)methylidene]-2-(piperidin-1-yl)-4,5-dihydro-1,3-oxazol-4-one	inactive
CLP27	(5Z)-5-[(2-hydroxyphenyl)methylidene]-2-(4-methylpiperazin-1-yl)-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-one	1.57
CLP21	(5Z)-5-[(2-hydroxyphenyl)methylidene]-2-(pyrrolidin-1-yl)-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-one	2.796
CLP132	(5E)-2-[(3R)-3-(dimethylamino)pyrrolidin-1-yl]-5-[(2-hydroxyphenyl)methylidene]-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-one	1.128
CLP28	(5Z)-5-[(2-hydroxyphenyl)methylidene]-2-(morpholin-4-yl)-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-one	3.605
CLP36	(5Z)-5-[(2-hydroxyphenyl)methylidene]-2-(4-phenylpiperazin-1-yl)-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-one	inactive
CLP120	(5Z)-2-amino-5-[(2-hydroxyphenyl)methylidene]-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-one	inactive
CLP217	(5Z)-2-(1,2-diazinan-1-yl)-5-[(5-fluoro-2-hydroxyphenyl)methylidene]-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-one	0.318
CLP257	(5Z)-2-(1,2-diazinan-1-yl)-5-[(4-fluoro-2-hydroxyphenyl)methylidene]-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-one	0.616
CLP290	2-(((5Z)-2-(1,2-diazinan-1-yl)-4-oxo-4,5-dihydro-1,3-thiazol-5-ylidene)methyl)-5-fluorophenyl pyrrolidine-1-carboxylate	inactive
CLP355	(5Z)-2-(1,2-diazinan-1-yl)-5-[(4-fluoro-2-hydroxyphenyl)methylidene]-4,5-dihydro-1,3-thiazole-4-thione	0.050
CLP386	6-(2-(((5Z)-2-(1,2-diazinan-1-yl)-4-oxo-4,5-dihydro-1,3-thiazol-5-ylidene)methyl)-5-fluorophenoxy)-3,4,5-trihydroxyoxane-2-carboxylic acid	Inactive

Supplementary Table 2: CLP257 interactions with classical pharmacological targets:

radioligand-receptor binding screen. The receptors tested, their sources, the radioligands used to define the binding sites, and the binding inhibitions induced by 10 μ M CLP257 are shown.

Transporter/Receptor/Ion Channel	Source	Assay Conditions (Radioligand, [nM]/ specific binding ligand [μ M])	% non-Binding Inhibition at 10 μ M
A ₁ Adenosine	human recombinant (CHO cells)	[³ H]DPCPX, 1/DPCPX, 1	<10
A _{2A} Adenosine	human recombinant (HEK-293 cells)	[³ H]CGS 21680, 6/NECA, 10	10
A ₃ Adenosine	human recombinant (HEK-293 cells)	[¹²⁵ I]AB-MECA, 0.15/IB-MECA, 1	27
α ₁ adrenergic	rat cerebral cortex	[³ H]prazosin, 0.25/prazosin, 0.5	<10
α ₂ adrenergic	rat cerebral cortex	[³ H]RX 821002, 0.5/(-)epinephrine, 100	<10
β ₁ adrenergic	human recombinant (HEK-293 cells)	[³ H](-)CGP 12177, 0.15/alprenolol, 50	<10
β ₂ adrenergic	human recombinant (CHO cells)	[³ H](-)CGP 12177, 0.3/alprenolol, 50	<10
Angiotensin ₁	human recombinant (HEK-293 cells)	[¹²⁵ I][Sar1,Ile8]-AT-II, 0.05/angiotensin-II, 10	<10
Benzodiazepine	rat cerebral cortex	[³ H]flunitrazepam, 0.4/diazepam, 3	<10
Bradykinin ₂	human recombinant (CHO cells)	[³ H]bradykinin, 0.3/bradykinin, 1	<10

Cannabinoid ₁	human recombinant (CHO cells)	[³ H]CP 55940, 0.5/WIN 55212-2, 10	<10
Cholecystokinin _A	human recombinant (CHO cells)	[¹²⁵ I]CCK-8s, 0.08/CCK-8s, 1	10
D ₁ dopamine	human recombinant (CHO cells)	[³ H]SCH 23390, 0.3/SCH 23390, 1	<10
D _{2S} dopamine	human recombinant (HEK-293 cells)	[³ H]methyl-spiperone, 0.3/(+)butaclamol, 10	<10
Endothelin _A	human recombinant (CHO cells)	[¹²⁵ I]endothelin-1, 0.03/endothelin-1, 0.1	<10
GABA (non-selective)	rat cerebral cortex	[³ H]GABA, 10/GABA, 100	<10
Galanin ₂	human recombinant (CHO cells)	[¹²⁵ I]galanin, 0.5/galanin, 1	<10
Interleukin 8 receptor beta	human recombinant (HEK-293 cells)	[¹²⁵ I]IL-8, 0.025/IL-8, 0.03	<10
Corticotropin releasing factor ₁	human recombinant (HEK-293 cells)	[¹²⁵ I]MIP-1a, 0.01/MIP-1a, 0.1	<10
H ₁ histamine	human recombinant (HEK-293 cells)	[³ H]pyrilamine, 1/pyrilamine, 1	<10
H ₂ histamine	human recombinant (CHO cells)	[¹²⁵ I]APT, 0.075/tiotidine, 100	<10
melanocortin ₄	human recombinant (CHO cells)	[¹²⁵ I]NDP-a-MSH, 0.05/NDP-a-MSH, 1	<10
Melatonin _{1A}	human recombinant (CHO cells)	[¹²⁵ I]2-iodomelatonin, 0.01/melatonin, 1	<10
M ₁ muscarinic	human recombinant (CHO cells)	[³ H]pirenzepine, 2/atropine, 1	<10
M ₂ muscarinic	human recombinant (CHO cells)	[³ H]AF-DX 384, 2/atropine, 1	<10
M ₃ muscarinic	human recombinant (CHO cells)	[³ H]4-DAMP, 0.2/atropine, 1	<10

Neurkinin ₂	human recombinant (CHO cells)	[¹²⁵ I]NKA, 0.1/[Nleu10]-NKA (4-10), 0.3	<10
Neurkinin ₃	human recombinant (CHO cells)	[³ H]SR 14280, 0.4/SB 222200, 10	<10
Neuropeptide Y ₁	SK-N-MC cells (endogenous)	[¹²⁵ I]peptide YY, 0.025/NPY, 1	<10
Neuropeptide Y ₂	KAN-TS cells	[¹²⁵ I]peptide YY, 0.015/NPY, 1	<10
Neurotensin ₁	human recombinant (CHO cells)	[¹²⁵ I]Tyr3-neurotensin, 0.05/neurotensin, 1	<10
δ ₂ opioid	human recombinant (CHO cells)	[³ H]DADLE, 0.5/naltrexone, 10	13
κ opioid	rat recombinant (CHO cells)	[³ H]U 69593, 1/naloxone, 10	11
μ opioid	human recombinant (HEK-293 cells)	[³ H]DAMGO, 0.5/naloxone, 10	<10
Nociceptin	human recombinant (HEK-293 cells)	[³ H]nociceptin, 0.2/nociceptin, 1	<10
Thromboxane _{A2}	human recombinant (HEK-293 cells)	[³ H]SQ 29548, 5/U 44069, 10	11
5-HT _{1A} Serotonin	human recombinant (HEK-293 cells)	[³ H]8-OH-DPAT, 0.3/8-OH-DPAT, 10	20
5-HT _{1B} Serotonin	rat cerebral cortex	[¹²⁵ I]CYP, 0.1/Serotonin, 10	<10
5-HT _{2A} Serotonin	human recombinant (HEK-293 cells)	[³ H]ketanserin, 0.5/ketanserin, 1	17
5-HT _{2B} Serotonin	human recombinant (CHO cells)	[¹²⁵ I](±)DOI, 0.2/(±)DOI, 1	<10
5-HT ₃ Serotonin	human recombinant (CHO cells)	[³ H]BRL 43694, 0.5/MDL 72222, 10	17

5-HT _{5a} Serotonin	human recombinant (HEK-293 cells)	[³ H]LSD, 1.5/Serotonin, 100	<10
5-HT ₆ Serotonin	human recombinant (CHO cells)	[³ H]LSD, 2/Serotonin, 100	<10
5-HT ₇ Serotonin	human recombinant (CHO cells)	[³ H]LSD, 2.3/Serotonin, 10	<10
Somatostatin (non-selective)	AtT-20 cells	[¹²⁵ I]Tyr11-somatostatin-14, 0.05/somatostatin-14, 0.3	<10
Vasoactive intestinal peptide receptor ₁	human recombinant (CHO cells)	[¹²⁵ I]VIP, 0.04/VIP, 1	11
Vasopressin _{1A}	human recombinant (CHO cells)	[³ H]AVP, 0.3/AVP, 1	<10
Ca ²⁺ channel (L, verapamil site)	rat cerebral cortex	[³ H]D888, 3/D 600, 10	<10
KV channel	rat cerebral cortex	[¹²⁵ I]a-dendrotoxin, 0.01/a-dendrotoxin, 0.05	<10
SKCa channel	rat cerebral cortex	[¹²⁵ I]apamin, 0.007/apamin, 0.1	<10
Na ⁺ channel (site 2)	rat cerebral cortex	[³ H]batrachotoxinin, 10/veratridine, 300	14
Cl ⁻ channel (GABA-gated)	rat cerebral cortex	[³⁵ S]TBPS, 3/picrotoxinin, 20	17
norepinephrine transporter	human recombinant (CHO cells)	[³ H]nisoxetine, 1/desipramine, 1	<10
dopamine transporter	human recombinant (CHO cells)	[³ H]BTCP, 4/BTCP, 10	<10
5-HT transporter	human recombinant (CHO cells)	[³ H]imipramine, 2/imipramine, 10	<10

Chapitre 4

Monostructure microprobe for parallel optical and electrical recordings from single neurons *in vivo*.

Yoan LeChasseur^{1,3}, Guillaume Lavertu^{1,*}, Suzie Dufour^{1,3,*}, Cyril Bories¹,
Martin Deschênes^{1,2}, Réal Vallée^{1,3}, Yves De Koninck^{1,2,3}.

¹*Centre de recherche Université Laval Robert-Giffard, Québec, QC, Canada, G1J 2G3.*

²*Department of Psychiatry & Neuroscience, Université Laval, Québec, QC, Canada, G1K 7P4.*

³*Centre d'optique, photonique et laser, Université Laval, Québec, QC, Canada, G1K 7P4.*

** These authors contributed equally to this work.*

***Nature methods* | VOL.8 NO.4 | APRIL 2011**

Résumé

L'enregistrement de l'activité électrique de neurones identifiés dans des tissus intacts est la clé pour comprendre leurs rôles respectifs dans le traitement de l'information. Les techniques récentes de marquage par fluorescence donnent la possibilité de combiner l'enregistrement électrophysiologique avec la détection optique des neurones individuels dans les régions profondes du cerveau. Pour cela, nous avons développé une microsonde composée d'une fibre optique à deux cœurs : un cœur optique servant à exciter/collecter localement la fluorescence et un cœur creux rempli d'électrolytes pour l'électrophysiologie extracellulaire unitaire. Contrairement aux solutions précédentes, ce concept de microsondes permet d'obtenir des pointes de $<10\ \mu\text{m}$, ce qui donne une résolution pour l'enregistrement optique de cellule unique. Nous démontrons dans cet article une co-détection électrique et optique de neurones individuels fluorescents identifiés par marquage rétrograde ou par l'expression de protéines GFP. Cette approche peut aussi être utilisée avec la technique de quantification optique de Ca^{2+} , elle permet aussi la détection et l'activation de neurones exprimant la channelrhodopsine dans les souris transgéniques Thy1 :: ChR2-YFP. Cette microsonde étend considérablement les possibilités d'enregistrement électrophysiologique *in vivo* en donnant accès à la fois à l'enregistrement électrique, à l'analyse et au contrôle optique de cellules individuelles.

Abstract

Recording electrical activity from identified neurons in intact tissue is key to understand their respective role in information processing. Recent fluorescent labeling techniques open new possibilities to combine electrophysiological recording with optical detection of individual neurons deep into brain tissue. For this, we developed dual core fiber optics-based microprobes with an optical core to locally excite/collect fluorescence and an electrolyte-filled hollow core for extracellular single unit electrophysiology. In contrast to previous solutions, this design provides microprobes with tips $<10\ \mu\text{m}$, yielding single cell optical resolution. We demonstrate electrical and optical co-detection of single fluorescent neurons from retrograde labeling or GFP expression. This approach also combined with optical Ca^{2+} measurements from single thalamic relay neurons in rats, as well as detection and activation of single channelrhodopsin-expressing neurons in *Thy1::ChR2-YFP* transgenic mice. This microprobe vastly expands possibilities for *in vivo* electrophysiological recording, providing parallel access to single cell optical monitoring and control.

Introduction

The central nervous system (CNS) is characterized by heterogeneous populations of cells with highly specialized phenotypes defined by their morphological, biochemical and physiological properties. Efficient characterization of each cell type in intact tissue has remained challenging because the neurons of interest are often dispersed within highly heterogeneous cell populations, even within specific brain nuclei. At the same time, studying the functional properties of neurons within the intact CNS is essential to understand their respective role in signal processing within networks. To this end, electrophysiologists have sought means to identify the cell types they record from. Antidromic activation of projection neurons is a very useful approach, but is only applicable to a small subset of cells and requires preservation of connections between the recording and projection sites (MacLean et al., 2006; Swadlow, 1998). Labeling cells at

recording time, followed by morphological and neurochemical characterization, allows *a posteriori* identification, but this approach is inefficient when dealing with subpopulations that represent a small proportion of the overall neuronal population within an area (De Koninck et al., 1992). Labeling with fluorescent markers, on the other hand, allows for targeted recording, independently of connectivity (Honig and Hume, 1989; Feng et al., 2000; Spergel et al., 2001; Callaway, 2008; Luo et al., 2008). The latter approach has been very instrumental for studies in CNS tissue slices (Ikeda et al., 2003a; Labrakakis and MacDermott, 2003; Yuste, 2005), but cannot be fully exploited for electrophysiological investigations in live animals because the light scattering in CNS tissue limits optical microscopy to surface measurements (500-1000 μm) (Helmchen and Denk, 2005; Margrie et al., 2003). Microendoscopes help overcome limitations for deep tissue imaging but do not allow for combined electrical and optical monitoring, especially for single unit recording (Jung et al., 2004b; Levene et al., 2004a). The challenge remains to conduct combined electrophysiological recording and optical identification of individual neurons deep into CNS tissue within live animals. Combination of both approaches is important because purely optical techniques remain limited for resolving single action potentials and for prolonged functional measurements (> one hour).

Several strategies have been sought to combine electrophysiological and optical recording. First, using distinct probes brought together by separate means (Bowmaster et al., 1991; Davis and Schmidt, 2000; Mottin et al., 2003). Such an approach is not practical for *in vivo* measurements. Other groups have relied on attaching a fiber to an electrode (Kudo et al., 1989; Nakamura et al., 1999) or inserting an optical fiber inside a micropipette (Neunlist et al., 1992). The latter approaches have used relatively large fibers (>300 μm in diameter) to carry the excitation light into the tissue. More recent strategies using smaller optical fibers (25-35 μm) have relied on external sources of illumination, which precludes efficient light delivery into deep tissue and produces tissue excitation over wide areas (Bradley et al., 2008). Furthermore, in the latter design, the fiber was inserted into a micropipette, yielding tip diameters of 35-45 μm , still precluding combined optical and electrical recording from a single neuron.

To overcome these limitations, we used a completely different strategy: the design of a novel type of optical fiber, incorporating both an optical and a hollow core. The fiber could thus be pulled down to tip diameters of 6 μm , with an optical core of 3.5 μm and a hollow core of 0.7 μm . The optical core was used for both light delivery and collection, and the hollow core was used for electrolyte filling to obtain an electrode. We show that this type of microprobe provides, for the first time, sufficient spatial resolution to correlate electrophysiological and fluorescence signals that emanate from single fluorescently labeled neurons at depth $> 6000 \mu\text{m}$ in intact CNS.

Results

The microprobe

Our objective was to detect, in parallel, the electrical field and the optical signal from single fluorescent neurons *in vivo*. We thus designed an optical fiber composed of a hollow core and an optical core (**Fig. 1a-b**). The hollow core was filled with an electrolyte solution to record electrical activity, and the optical core is a graded refractive index waveguide allowing efficient light delivery and collection through a tapered tip. To achieve single cell resolution with the optical probe, the fiber was pulled to tip sizes smaller than that of the neuron somata under study (see below).

The all glass dual core fiber could be pulled on a conventional laser micropipette puller into a wide variety of shapes as with standard glass microelectrodes (**Fig. 1c**). Efficient probes were generated with end tips of 6-20 μm (**Fig. 1a-b**) adaptable to recording from a wide variety of cell types at different tissue depths. The optical core was connected to a multimode fiber to connect an optical setup to the biological preparation (**Fig.1d**). Light was injected into the probe for local delivery at the tip end. This tip was also used to collect fluorescence emanating from labeled cells.

With this design, fluorescence collection is very directional, only light in front of the tip being collected. As the probe passes by a labeled neuron, the detected fluorescent signal should follow a characteristic intensity profile: growing gradually when approaching a

labeled cell and dropping more abruptly beyond the cell (**Fig. 1e**). In contrast, the electrical signal is not directional, and should therefore grow and decline symmetrically as the probe passes by the neuron. The peaks of both signals are thus not necessarily aligned along the travelling course of the probe. Spacing between the optical and electrical peaks should relate cell size, and therefore serve as a criterion to determine whether the electrical and optical signals emanate from the same neuron (**Fig. 1e**).

Optical resolution and single cell detection

We estimated the resolution of our optical microprobe assuming a fluorescent point source as commonly used for calculation of point-spread-functions in microscopy (**Supplementary Data**). For a probe tip diameter of 10 μm (6 μm optical core), the calculated full width half maximal (FWHM) of the detected signal distribution is 13 μm in the axial direction and 6 μm in the transverse plane. For a 6 μm tip (4 μm optical core), the FWHM were 12 μm and 4 μm , respectively. Calculations revealed that NAs between 0.2-0.3 yielded an optimal compromise between axial and transverse resolution (**Fig. 2a,b**). We then estimated numerically the fluorescence decay profiles as a function of both fiber and cell diameters. With optical cores smaller than the cells, the decay profile of the detected signal in the transverse axis was sensitive to cell size, but insensitive to probe size. Conversely, in the axial direction, the decay profile was sensitive to fiber diameter but not cell size, indicating that controlling probe size is important for axial resolution of single cells (**Fig. 2c-f**).

To test the applicability of resolution estimates based on physical parameters of the fibers (**Fig. 2a-f**), we performed measurements in brain slices that contained fluorescently labeled cortical neurons. We used intracellular injection of Lucifer yellow in fixed brain slices to control the number of, and distance between labeled neurons. Slices were examined under epifluorescence to locate labeled cells. Then, the external light source was turned off, and the probe was moved in the transverse and axial directions across labeled cells. The detected signal FWHM using a 9 μm -diameter probe was $15 \pm 5 \mu\text{m}$ transversely and $11 \pm 4 \mu\text{m}$ axially for $14 \pm 1 \mu\text{m}$ -diameter neurons ($n=6$ cells; **Fig. 2g,h**), consistent

with predictions from convolution of fiber detection and cell size (**Fig. 2c-f**). Using this tip diameter, sufficient resolution could be achieved to distinguish adjacent cells in both transverse (**Fig. 2i**) and axial directions (**Fig. 2j**). Importantly, although the detected fluorescence peak intensity varied from cell to cell, as expected, the axial resolution remained constant and independent of excitation power for a given microprobe. This was confirmed by repeated measurements with different excitation powers (**Fig. 2k**).

In conclusion, the probe physical characteristics required to resolve single neurons are dictated by the size of the cells targeted following the parameters established in **figure 2a-d**.

Recording from single retrogradely labeled neurons *in vivo*

We then tested the optical and electrical performances of the microprobe *in vivo*. We first applied it to detection of spinothalamic tract (STT) neurons retrogradely labeled from DiI injections in the thalamus (**Fig. 3a,b**). As estimated from histological sections, STT neurons in spinal laminae III-VI have soma diameter of $24 \pm 6 \mu\text{m}$ ($n=153$; **Fig. 3c**).

We used microprobes with $14 \pm 3 \mu\text{m}$ tip diameter to record from STT neurons down to $2200 \mu\text{m}$ within the tissue. The electrical channel of the probes had 6-26 M Ω resistance, yielding spike recordings with a signal-to-noise ratio (S/N) of 7.6 ± 3.7 ($n = 155$) and stable recordings >>one hour (**Fig. 3d-f**; **Supplementary Fig. 3**). The probes recording capabilities and stability was comparable to that of conventional micropipettes.

The microprobe was lowered at constant speed into the spinal cord (4-8 $\mu\text{m/s}$) while maintaining excitation light ON throughout the descent. We observed either: 1) a gradual rise of fluorescence followed by a decay over several tens of microns without any clear spiking activity; 2) the reverse scenario consisting of spikes increasing gradually in amplitude followed by a decrease without significant change in fluorescence; 3) a parallel growth and decay of fluorescence and spike amplitude (**Fig 3d-e**). In the vast majority of cases, changes in optical and electrical signals occurred without signs of neuron damage. Peak optical S/N was not correlated with tip diameter (**Fig 3g**) indicating that there was no disadvantage in using smaller probes to increase optical resolution.

We analyzed quantitatively how the amplitude of the electrical and fluorescence signals changed as a function of the axial position of the probe. This analysis was performed from well-isolated single units as assessed by waveform analysis and the absence of short inter-spike intervals (< 2 ms) in spike trains (**Fig. 3f**). Under these conditions, the amplitude of action potentials rose and decayed symmetrically around a peak value and the FWHM was 24 ± 10 μm ($n=15$; **Fig. 4a**). In contrast, the fluorescence signal intensity rose and decayed in a non-symmetrical fashion (**Fig. 4b**). Based on results obtained with numerous descents, the criterion used to identify a neuron optically was the following: the signal had to rise to a maximum within a characteristic distance and drop back to baseline within $<$ half of the rising distance with a $S/N > 9$. In 87 optical recordings, the median of fluorescence S/N was 42. From quantitative analysis of the fluorescence rise and decay as the probe passed by the cell, we found that the distance over which the signal rose from 50% to the peak value was 21 ± 8 μm , while dropping back to 50% within 7 ± 3 μm (**Fig. 4b**; $n=14$). These values are consistent with measurements in slices and predictions from numerical simulations (see above and **Figs. 1e** and **2**).

Optical and electrical co-detection criterion

To determine whether the optical and electrical signals originated from the same cell, we measured the distance between the axial positions of the two signal peaks (**Figs. 3e**). Since the distance between peaks relates to cell size (**Fig. 1c**), one can consider that both signals arise from the same neuron if that distance is below the mean neuron diameter. In 16 STT neurons, the distance between the optical and electrical signal peaks was < 24 μm , which corresponds to the mean STT neuron soma diameter. As a more stringent criterion, we used an inter-peak distance below 90% of these soma diameters (16 μm ; **Fig. 3c**). Using this criterion, the two signals were considered to originate from the same cells in 12 cases. This likely underestimates the number of co-detections (false negatives), but minimizes false positives; a threshold based on 90% of the soma size distribution for each neuron population targeted was used henceforth.

Recording from single GFP-expressing GABAergic neurons

We then targeted GAD-GFP-expressing reticular thalamic neurons in transgenic mice. These cells' average soma diameter was $12.4 \pm 2.3 \mu\text{m}$ ($n=41$; **Fig. 5a-b**). We thus used microprobes with 6-10 μm tips. Applying the criteria described above, co-detection occurred when the optical and electrical signal peaks were $\leq 10 \mu\text{m}$ apart (**Fig. 5b**). For this neuron population, the optical signal rise from 50% to peak was 12 μm and the decay beyond the cell was 6 μm (**Fig. 5c**). Of 11 test cases with overlapping electrical and optical signals, 7 fell within the co-detection criterion, confirming applicability of the technique for recording from single genetically labeled neurons (**Fig. 5d**). In these experiments, single GAD-GFP neurons were identified even within a dense nucleus of inhibitory interneurons (**Fig. 5a**). The technique is particularly enabling in such condition because there is typically no identifiable spatial distribution of inhibitory interneurons, (in contrast to well defined layers such as the hippocampal CA1).

Parallel recording and Ca^{2+} measurements in single neurons

To confirm that optical and electrophysiological recordings with our microprobe originated from the same cell, we performed complementary experiments combining Ca^{2+} measurements with electrophysiological recording.

We first recorded spontaneous activity in thalamic barreloids after loading neurons with Oregon Green BAPTA1-AM via local injections *in vivo* in adult rats. Single unit recordings from thalamic relay neurons revealed low frequency (2-3 Hz) bursts which coincided with Ca^{2+} transients (**Fig. 6a**). To ascertain that the Ca^{2+} signals arose from a single neuron and not from the population of labelled cells, we performed a detailed analysis of the two types of activity in 5 neurons. We found that over several minutes of recording, virtually all spike bursts coincided with rise in Ca^{2+} and, inversely, Ca^{2+} fluctuations were always associated with spiking (**Fig. 6a**). Furthermore, the magnitude of the Ca^{2+} responses was highly correlated to the number spikes/burst (**Fig. 6b**). The same linear relation was found for the 5 neurons tested ($P < 0.01$). Because population activity varies much less than individual neuron activity, this correlation indicates that, in these cases, the two signals most likely arose from the same cell.

Once single unit recording of spontaneous activity was achieved in the stained area, we studied evoked responses to deflection of single whiskers (**Fig. 6c**). Concurrent robust evoked electrophysiological and Ca^{2+} responses were recorded in 47 neurons.

Thalamic relay cells within a barreloid respond differently to the direction of whisker deflection and this angular preference is cell dependent (Timofeeva et al., 2003). Thus, to correlate both signals we determined the angular preference of recorded cells using the Ca^{2+} response latency and spikes elicited in four distinct directions (**Fig. 6d**) (Bellavance et al., 2010). We found a linear relationship with a slope of one between the angular preferences for both measurements, again, indicating both signals emanating from the same cell (**Fig. 6e**; $n = 8$; $P < 0.001$).

Finally, we analysed spike failures in response to whisker deflection. Using stimuli of constant repetition rate and strength, we found that whenever spikes were elicited in thalamic neurons, this caused a Ca^{2+} response (**Fig. 6f**). In contrast, when spike failures occurred, no significant Ca^{2+} response was recorded (decreased by $94 \pm 8\%$; $n = 10$). As failures are characteristics of individual neurons, as opposed to field (population) responses, coincidence of spiking and Ca^{2+} response failures provided an additional criterion to test whether both signals were unitary and originated from the same neuron.

Codetection and activation of single ChR2 expressing cells

Experiments were also performed on *Thy1::ChR2-eYFP* transgenic mice (Arenkiel et al., 2007), which express the light-gated channels ChR2 in various subpopulations of neurons, including in the thalamus and the cortical pyramidal layer 5 (**Fig. 7a**) (Wang et al., 2007). We tested the probe ability to confirm expression of ChR2 from single identified neurons. We used a 488nm laser to stimulate simultaneously ChR2 and eYFP. Brief pulses of light (5-500ms) were used to prevent over-excitation. In six mice, 27 cells were detected optically in the motor cortex (layer 5) and the thalamus. Among these cells, 22 satisfied the co-detection criteria and, of those, 19 showed clear excitatory responses to light pulses (**Fig. 7b**). Spikes of constant amplitude and shape were recorded in response to local light pulses at different intensity, confirming single unit recordings (**Fig. 7c-e**). At the light

pulse onset and offset, small deflections were detected with opposite polarities reflecting depolarization and repolarization at the beginning and end of the pulse (**Fig. 7c**). These deflections were not present at subthreshold light intensities (**Fig. 7d**) nor in front of non-responsive neurons (not shown). Response delay to light stimulation showed minimal jitter (**Fig. 7f**). These observations indicated direct cell depolarization and thus ChR2 expression by the targeted cell (i.e. the cell was not activated indirectly, following activation of a neighbouring neuron). Finally, because light stimulation could be used to directly drive spiking, it was possible to demonstrate postsynaptic inhibition (**Fig. 7g**). These results indicate that the microprobe can deliver sufficient light for local stimulation in deep brain areas to control activity from identified single neurons.

Discussion

The advent of genetically modified mice expressing fluorescent proteins in identified neuronal populations is transforming the field of neuroscience (Feng et al., 2000; Spergel et al., 2001; Luo et al., 2008). The design described here offers the ability to generate combined optical and electrical microprobes with fine enough probe tips to take full advantage of fluorescent labeling techniques and allow single unit recording from individually identified cells deep within the CNS *in vivo*; well beyond the limits of two-photon microscopy ($\sim 1000\mu\text{m}$ (Helmchen and Denk, 2005)). In addition, the probe allows exploiting the expanding array of mouse lines and *in vivo* approaches involving fluorescent sensors and light-activated channels (Gradinaru et al., 2009; Arenkiel et al., 2007; Wang et al., 2007; Lima et al., 2009).

The optical search protocol described here involves local light delivery and does not require prolonged light exposure; the system could also be adapted to further minimize excitation cycles using pulsed illumination. Using optical probing offers the advantage of allowing localization of cells without electrically-induced search stimuli such as antidromic or afferent pathway stimulation, minimizing potential physiological alterations of neural circuits by pathway activation.

An important asset of the probe is its monomaterial nature. This all-glass microprobe can be easily shaped as with other conventional glass micropipettes and hence be tailored to different approaches (*e.g.*, shorter/longer shafts, tips, etc.). The probe can also be used for microinjection, (iontophoresis, pressure ejection) in optically-identified targeted area.

The simple optical design thus yields a versatile system easily adaptable for multiple applications, including measurements from functional fluorescent indicators and spectroscopic detection of intrinsic signals. Similarly, exploiting the *Brainbow* mouse (Livet et al., 2007), it would be possible to identify each cell by adapting the system for multicolor recording. Hence, the combined optical and electrical capabilities of the novel microprobe described here vastly expand possibilities for conventional *in vivo* electrophysiology with access to single cell molecular technologies.

Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Institute for Health Research. Y. De K. is a *Chercheur National* of the Fonds de la recherche en santé du Québec. Y. L. and S. D. were the recipient of a Studentship from the Canadian Institute for Health Research *Neurophysics* Training program grant. We thank Dr. A. Proulx and A. Croteau (INO, Québec, Canada) for the collaboration on the dual core fiber design and fabrication. We thank Drs. D. Côté and A. Castonguay for helpful comments on the manuscript. We also thank S. L. Côté, K. Bachand, K. Vandal and M. Demers for expert technical assistance.

Author Contributions

Y.L., R.V., Y.D.K. designed the microprobe. Y.L., S.D., G.L., C.B., M.D., Y.D.K. designed the experiments. Y.L., S.D., G.L., Y.D.K. analyzed data. Y.L., S.D., G.L., C.B. performed experiments. S.D. performed Ca^{2+} measurement and photostimulation

experiments. Y.L and S.D. performed numerical simulations. Y.L., S.D., G.L., C.B., M.D., R.V., Y.D.K. contributed to writing the manuscript.

Figures

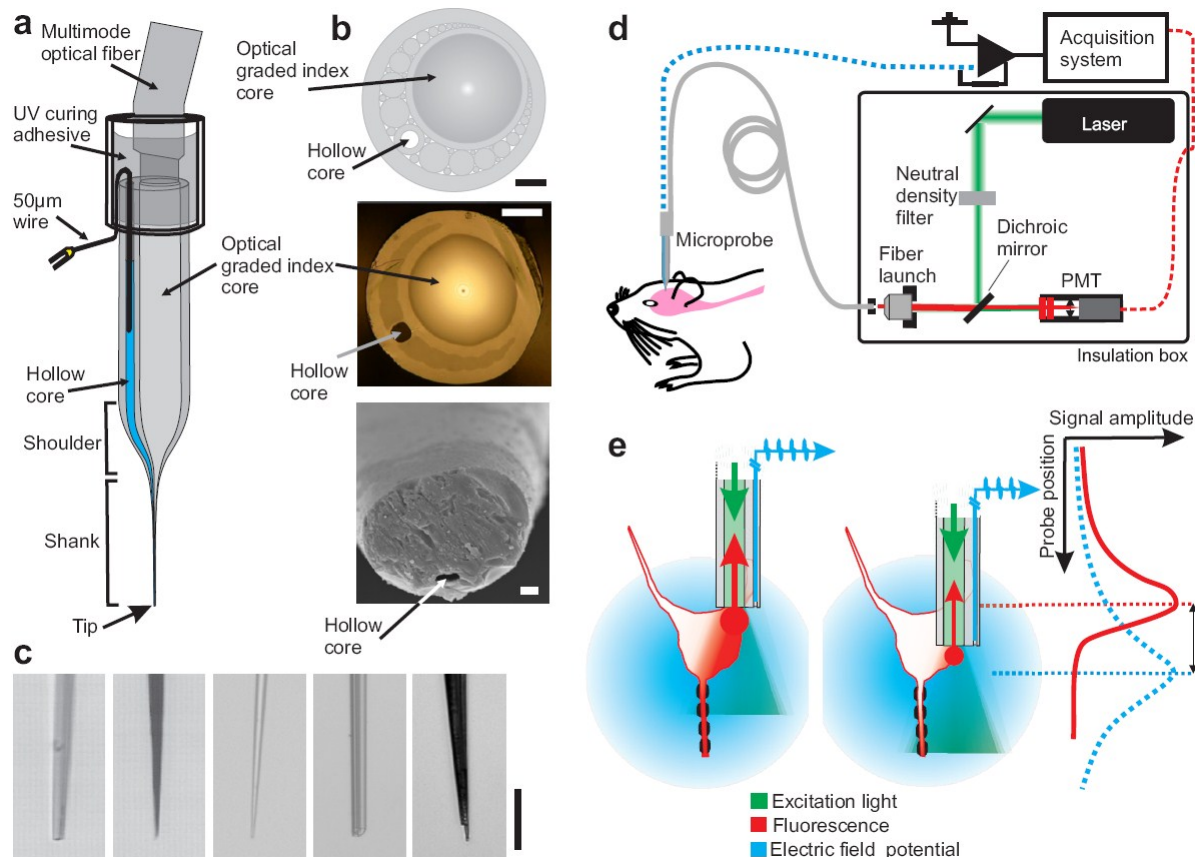


Figure 1 | The microprobe.

(a) Schematic representation of the microprobe (not drawn to scale), which is based on a dual core optical fiber: an optical graded index core and a hollow core. The optical core was connected at one end to a multimode optical fiber and the other end was tapered. The hollow core was filled with a NaCl solution for electrical connection. (b) Schematic representation of the optical fiber preform design (top): a series of different-size silica rods assembled to position the optical and hollow cores side by side within an inclusion tube. Scale bar, 2 mm. Photomicrograph of the dual core fiber cross-section (middle). Scale bar, 200 μm . Scanning Electron Microscope micrograph of the microprobe tip (bottom). Scale bar, 2 μm . (c) Microprobe comparison; from left to right: our microprobe, extracellular stainless steel microelectrode, extracellular glass microelectrode, triple barrel microelectrode, double barrel micropipette glued to an extracellular microelectrode. The

microprobe described here is not larger than probes used for other conventional recording configurations. Scale bar 50 μm . (d) Schematic diagram of the experimental setup. Light delivery and collection as well as electrical recording are all achieved through the same fiber probe. (e) Representation of the different recording geometries: the optical recording is directional while the electrical recording is non-directional. Thus, the intensity profiles do not necessarily overlap along the travel axis of the microprobe (right). However, the distance between their peaks are related to the size of the cell bodies.

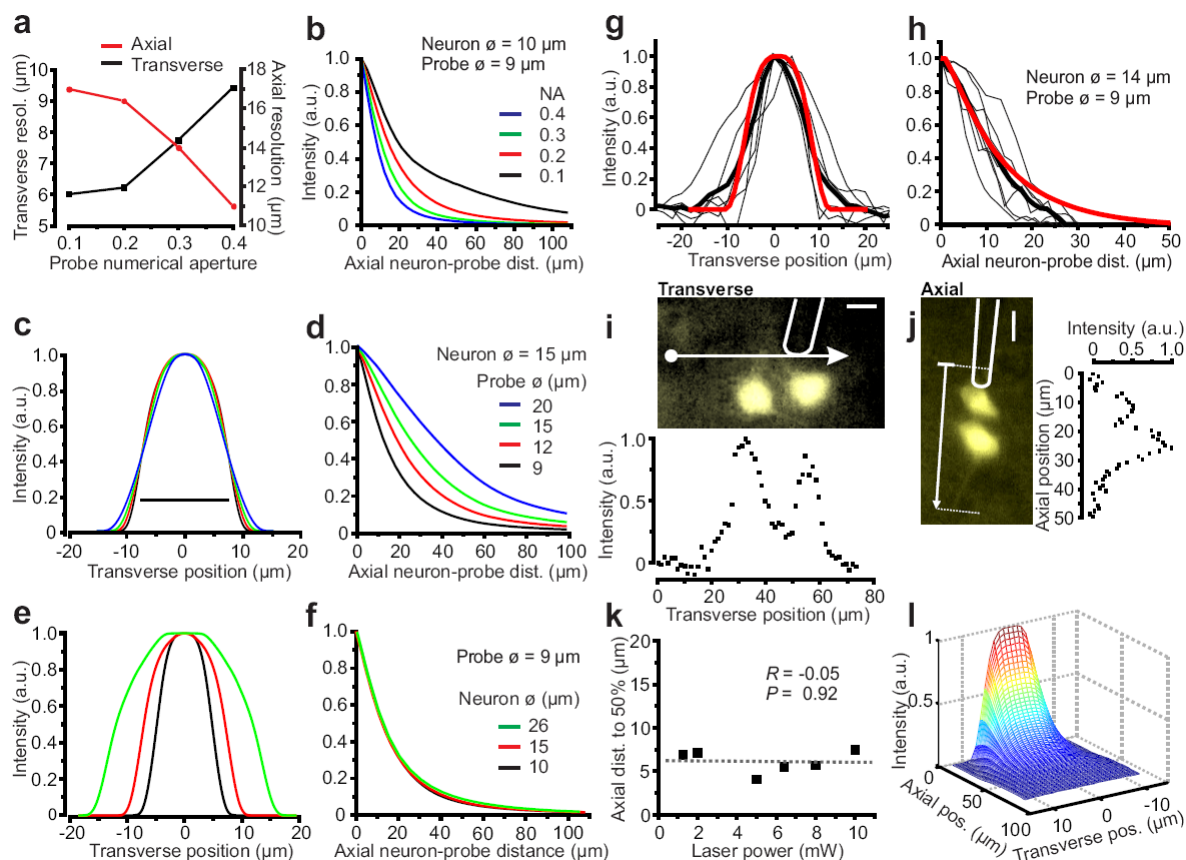


Figure 2 | Characterization of microprobe optical resolution.

(a-f) Numerical simulation of the microprobe detection characteristics. (a) Impact of probe NA on axial and transverse resolution considering a point source (calculated for a $10 \mu\text{m}$ tip diameter, the transverse resolution was calculated for an axial distance of $14 \mu\text{m}$). (b) Impact of probe NA on axial detection distance for a fixed neuron and probe diameter. (c-d) Transverse (c) and axial (d) detection profiles for a fixed neuron diameter evaluated for different probe diameters. Black line in c indicate the neuron diameter. (e-f) Transverse (e) and axial (f) detection profiles for a fixed probe diameter evaluated for different neuron diameters. (g-h) Experimental fluorescent detection profile for transverse (g) and axial (h) probe displacement in front of single Lucifer Yellow (LY)-labeled neurons in brain slices. The thick black line represents the average detection profile. The red line represents the expected detection profile based on numerical simulations. (i-j) Photomicrographs of 2

148

adjacent LY-labeled fluorescent neurons in fixed brain slices (top). The contour of the microprobes is highlighted in white and the arrow shows the probe trajectories. Scale bar, 10 μm . The graphs adjacent to the micrographs show the change in detected fluorescence during the displacements. It was clearly possible to spatially resolve side by side neurons with the probe in both the transverse and axial directions. **(k)** The axial resolution was independent of laser powers. **(l)** Simulated fluorescence collection field of a 9 μm -diameter probe in front of a 12 μm -diameter neuron.

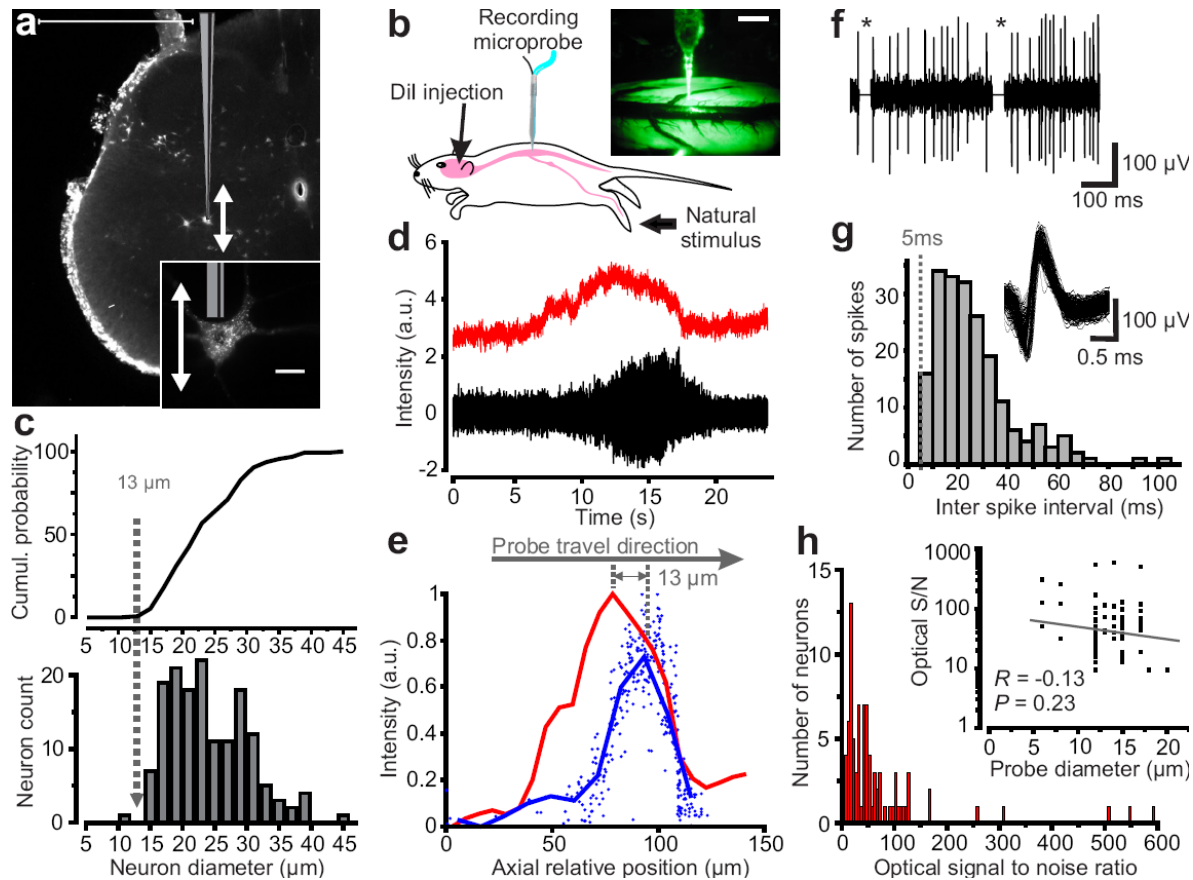


Figure 3 | Single unit recording from retrogradely labeled spinal projection neurons *in vivo*.

(a) Photomicrograph of a 100- μm -thick spinal cord transverse section where spinothalamic tract (STT) neurons were retrogradely labeled with DiI. Drawing of a microprobe (in gray) overlaid on the micrograph illustrating a typical descent (white arrow). Scale bar, 1 mm. Zoom on a STT DiI stained neuron (inset). Scale bar, 20 μm . (b) Schematic representation of the experimental paradigm. Photograph of the microprobe inserted into the spinal cord (inset). Scale bar, 1 mm. (c) Distribution of labeled STT neurons diameters. The grey dotted line indicates the distance between the optical and electrical signal maxima in e. More than 90% of the cells have a diameter $> 16 \mu\text{m}$. (d) Microprobe descent at constant speed; the fluorescent signal (red) and spikes evoked from stimulation of the receptive field (black) grew and decayed in parallel. (e) The time scale in d was converted to spatial

position. The fluorescence (red) and spike amplitude (blue) were plotted as a function of the microprobe relative position. The maxima of the two curves were 13 μm (mean \pm SD) apart, thus $< 16 \mu\text{m}$. **(f)** Trace from **d** on an expanded time scale (*digitally subtracted movement artifacts). **(g)** Confirmation of single unit recording: no interspike intervals $< 5\text{ms}$ and spikes had similar waveform ($n = 212$) (inset). **(h)** Average optical S/N was 21 ($n=87$). No correlation between the optical S/N and microprobe tip diameter (inset).

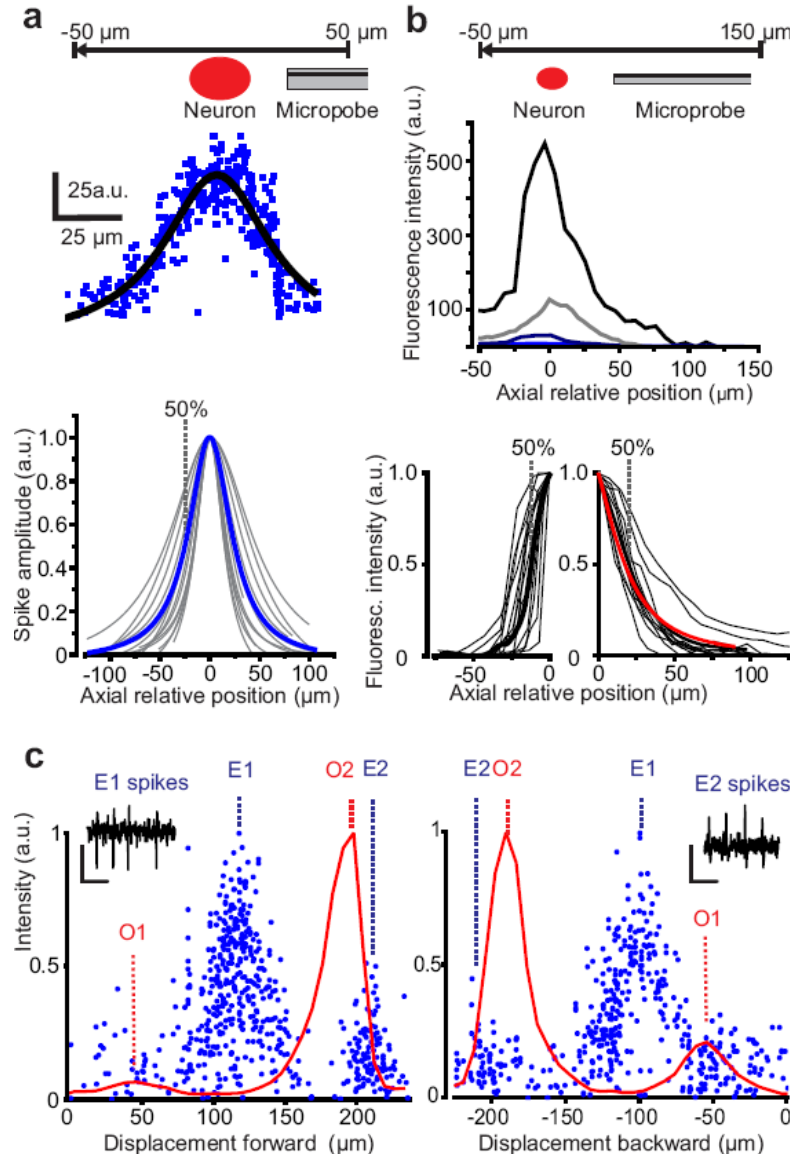


Figure 4 | Profiles of optical and electrical detection of single cells *in vivo*.

(a) Schematics of the microprobe displacement (arrow) relative to the neuron position (top). Spike amplitudes as a function of the microprobe axial position (middle). Distributions of spike amplitudes from a series of probe travel (bottom); FWHM was $24 \pm 10 \mu\text{m}$ (mean \pm SD; $n=15$; average in blue). (b) Schematics of the microprobe displacement (arrow) relative to the neuron position (top). Typical fluorescence detection

152

patterns when the microprobe passed by four fluorescently labeled neurons (middle). There was a good match between the average fluorescence rise and decay profile (thick black line) and that expected from numerical simulations (red). During approach, the fluorescence rose to FWHM within $21 \pm 8 \mu\text{m}$ (mean \pm SD; $n=14$). When probes passed beyond neurons, the fluorescence decayed to 50% within $7 \pm 3 \mu\text{m}$ (mean \pm SD; $n=14$) (bottom). **(d)** Successive units detected by fluorescence and/or electrically during a $225 \mu\text{m}$ probe excursion. Intensity patterns were similar, independently of probe travel direction, indicating minimal hysteresis. E1 and E2 represent two electrically recorded neurons and O1 and O2 represent two optically recorded ones. $\Delta E1 - O1 = 58 \mu\text{m}$; $\Delta E1 - O2 = 85 \mu\text{m}$; thus, indicating that the signals originated from different neurons. $\Delta E2 - O2 < 16 \mu\text{m}$; thus, indicating that the two signals likely originated from the same neuron. Examples of spikes recorded in E1 and E2 (insets). Scales bars, 0.1 mV and 4 ms.

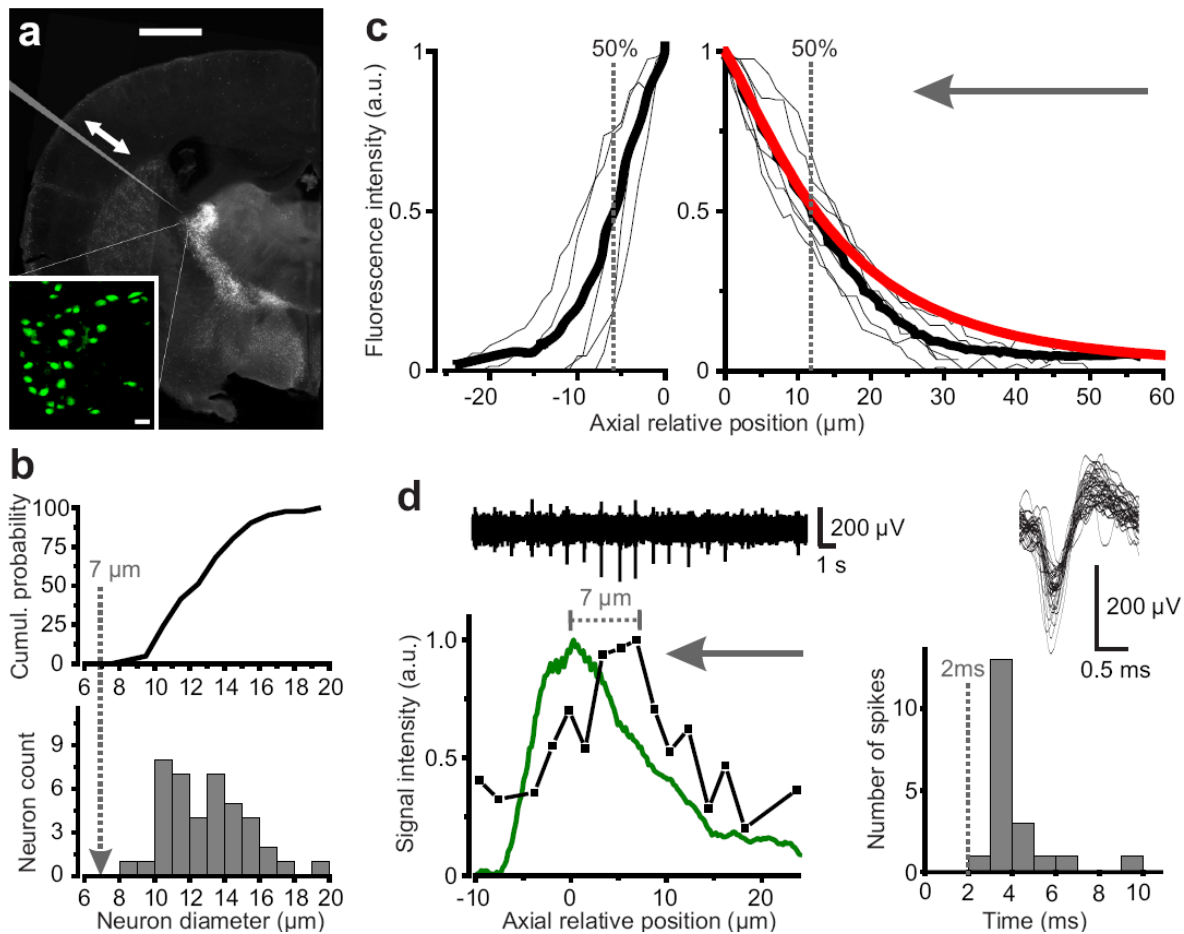


Figure 5 | Single unit recording from GAD-GFP neurons *in vivo*.

(a) Photomicrograph of an 80- μm -thick brain section of a GAD-GFP mouse. Drawing of a microprobe (in gray) overlaid on the micrograph illustrating a typical descent (white arrow) into the reticular thalamic (RT) nucleus. Scale bar, 1mm. High magnification photomicrograph of the target region highlighting GAD-GFP neurons (inset). Scale bar, 20 μm . (b) Distribution of RT GFP+ neuron diameters. The gray dotted line indicates the inter-signal maxima distance obtained in **d**; more than 90% of the cells had a diameter > 10 μm (c) There was a good match between the average fluorescence rise and decay profile (thick black line) and that expected from numerical simulations (red). During approach, the fluorescence rose to FWHM within $12 \pm 3 \mu\text{m}$ ($n=6$) (right). When probes passed beyond

neurons, the fluorescence decayed to 50% within $8 \pm 3 \mu\text{m}$ ($n=5$) (left). **(d)** Example of co-detection (optical and electrical) of an RT GFP+ neuron. As the probe travelled through the tissue, the optical (green) and electrical (black) signals peaked well within the $10 \mu\text{m}$ co-detection criterion for this population of cells, indicating that the two signals likely originated from the same neuron. Continuous electrophysiological signal as the probe travelled through the tissue (top). The inset on the right shows consecutive superimposed action potentials ($n = 26$). The histogram shows a minimum interspike interval of $> 2 \text{ ms}$, consistent with single unit recording.

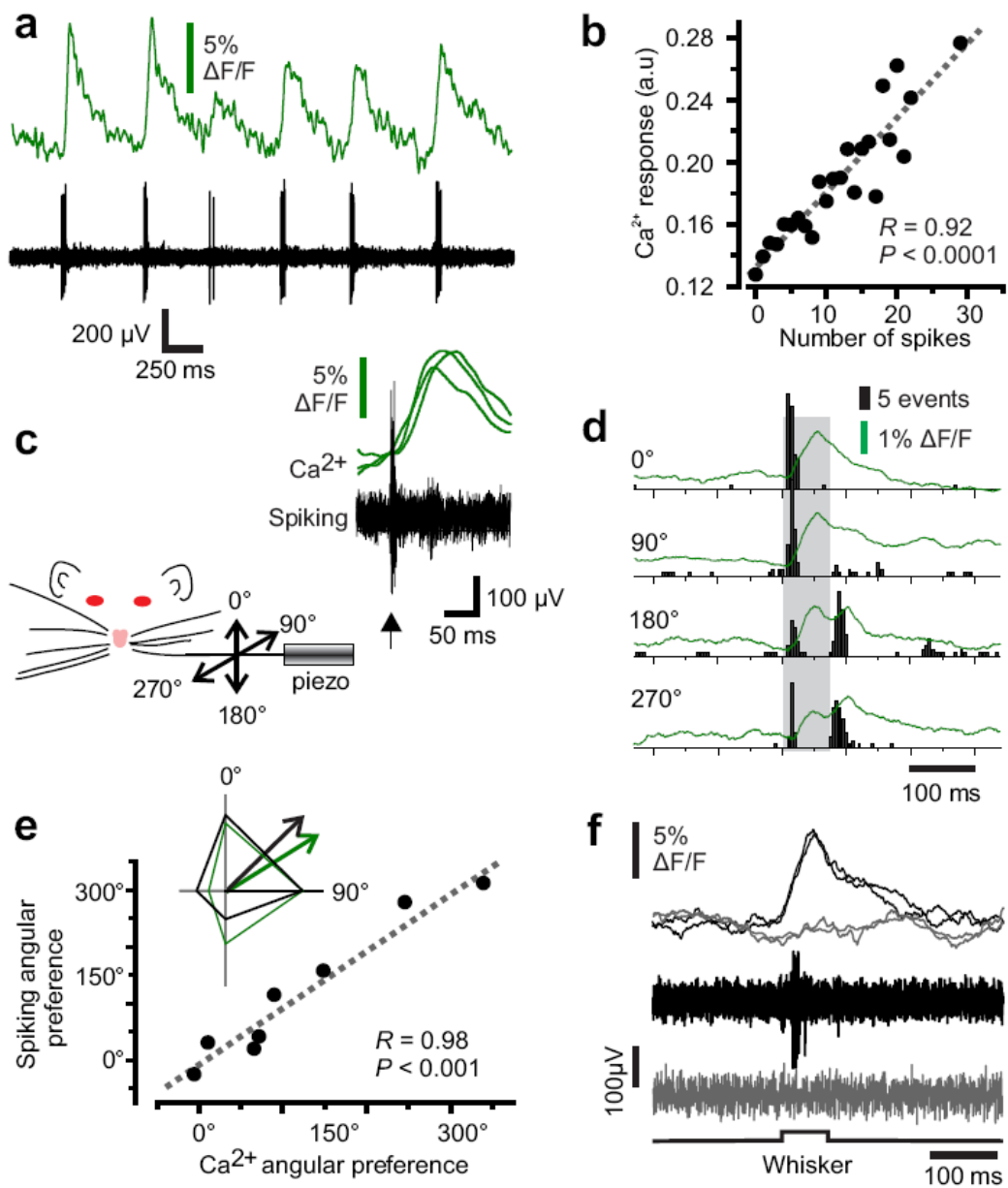


Figure 6 | Monitoring Ca^{2+} fluctuations confirm unitary optical and electrical recording from the same neuron *in vivo*.

(**a-b**) Spontaneous spiking and Ca^{2+} fluctuations in a thalamic relay neuron (recorded at a depth of 6mm within the brain). (**a**) The optical fluorescent signal (green) fluctuates synchronously with the occurrence of spike bursts (black). (**b**) Plot of the size of the Ca^{2+} response (quantified as the area under the curve) as a function of the number of spikes in each burst for the cell shown in **a**. The two parameters are linearly correlated ($n = 24$). (**c-e**) Angular coding of rat whisker deflection. (**c**) Schematic representation of the whisker deflection using a piezoelectric mechanical stimulator. *Inset*: superposition of three spiking and calcium responses following a whisker deflection. (**d**) Peri-stimulus time histograms (PSTHs) of spiking responses to 20 whisker deflections (4 directions) and the associated averaged Ca^{2+} response (green) over the same 20 stimuli for the same neuron. The duration of whisker deflection is represented in gray. (**e**) The angular preferences found with spike response latency were similar to those obtained with Ca^{2+} response ($n=8$ cells). *Inset*: polar representation of the normalized inverted spike latency after stimulation (black) and the normalized inverted latency of the Ca^{2+} response (green). (**f**) Comparison between responses and failures of a neuron to whisker deflections. Note the coincident lack of Ca^{2+} response when the neuron failed to spike in response to the stimulus.

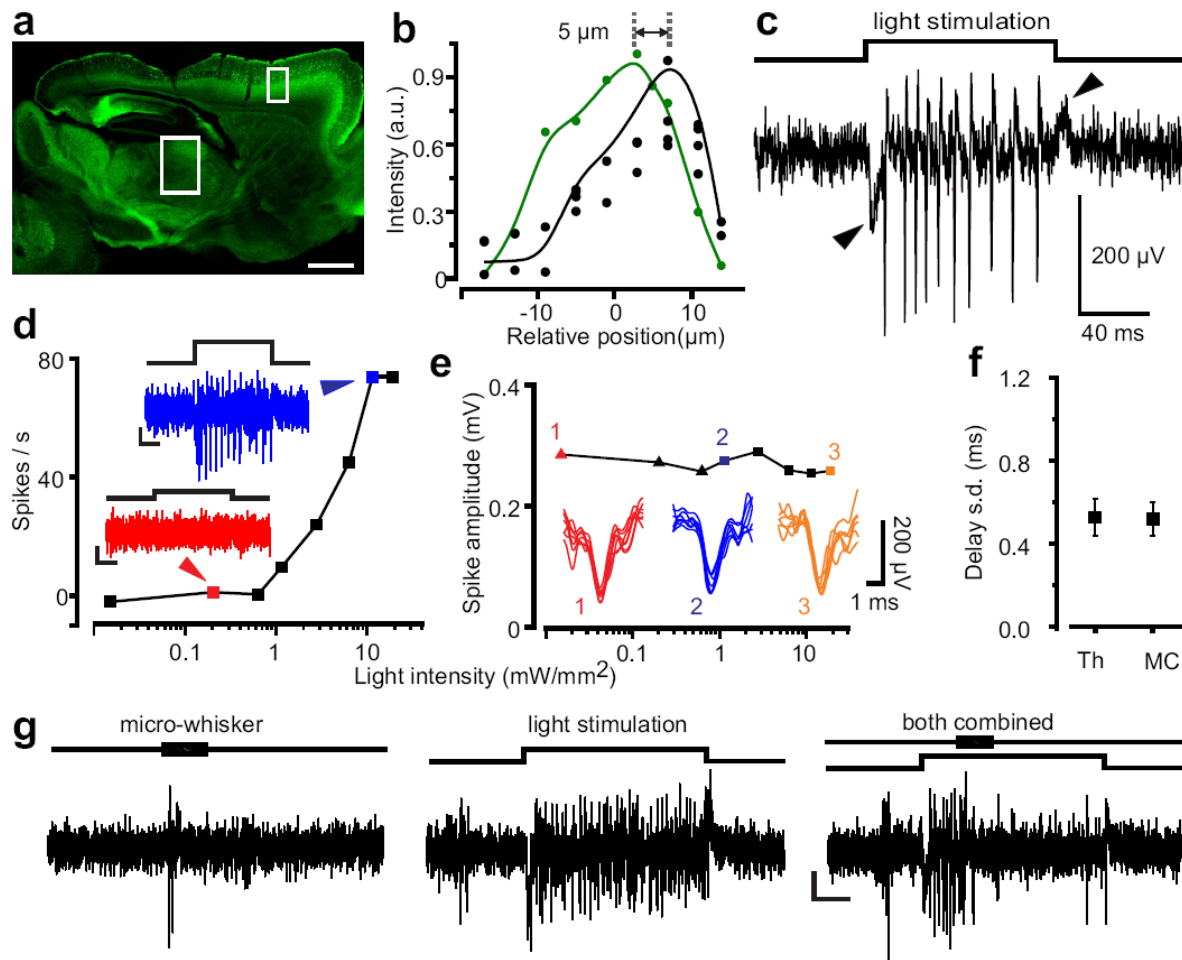


Figure 7 | Detection and activation of single ChR2 expressing neurons *in vivo*.

(a) Photomicrograph of a 100- μm -thick sagittal brain section of a *Thy1::ChR2-EYFP* mouse with highlighted recording sites (white boxes). Scale bar, 1 mm. (b) Co-detection (optical in green and electrical in black) of a ChR2-EYFP-expressing neuron. (c) Response of the neuron in **h** to light stimulation through the probe. Arrows point to the depolarization and repolarization of the cells at the pulse onset and offset, indicating direct stimulation of the neuron. (d) Neuron response to graded light intensity. The light intensity activation threshold ($1.3 \pm 0.3 \text{ mW/mm}^2$; $n = 13$ neurons tested) is consistent with that previously reported (Gradinaru et al., 2009). Insets represent individual responses. Scale bars, 100 μV , 50 ms. (e) Spikes all had the same amplitude, whether they were

158

spontaneous (recorded below stimulation threshold) or evoked at different light intensity showing that they all originated from a single cell. Each insets represent 7 superimposed spikes. **(f)** The mean standard deviation (s.d.) of the response delay to light stimulus for 15 cortical and 9 thalamic neurons indicates minimal jitter consistent with direct neuron stimulation. **(g)** Responses of a thalamic ChR2-expressing neuron to micro-whisker deflection, light stimulation or both. Note the period of inhibition following the whisker stimulation which can only be revealed with extracellular recordings when activity of the cell is driven, here by light stimulation. The fact that micro-whisker deflection silenced the cell during light-driven activity also shows that the inhibition is postsynaptic. Scale bars, 100 μ V, 50 ms.

Online Methods

Microprobe fabrication

We designed dual core optical fibers in collaboration with INO (Quebec, Canada) where the entire fibers fabrication was conducted. The fiber preform was assembled through a procedure inspired from the stack-and-draw method previously reported in the literature for the fabrication of microstructured optical fibers (Bennett et al., 1999; Knight et al., 1997). The goal was to position a graded refractive index optical core and a silica capillary hole side by side within a silica inclusion tube (**Fig 1b**). The optical core was created by modified chemical vapor deposition (MCVD) using GeO_2 dopant (Macchesn et al., 1974). The preform was pulled to obtain an optical fiber with a 900 μm external diameter, a 550 μm optical core (Numerical aperture = 0.22), and a 95-105 μm hollow core. The fiber was cleaved by a diamond pen into 5-7 cm-long rods. Then, the rods were heated and pulled with a standard laser puller (P-2000 laser-based micropipette puller, required for this type of glass; Sutter Instrument Company, Novato, USA). Probes were generated with 2-3 mm-long shoulders, 3-8 mm-long shanks (**Fig. 1a**) with a tip pulled to sub-micron diameter and grinded back at 90° to the desired diameter on a rotative diamond abrasive plate (**Fig. 1b**; BV-10 micropipette beveller; plate 104C; Sutter Instrument Company). A wetting agent (Kodak Photo-Flo 200 solution) was added on the abrasive plate to prevent small glass residues from blocking the hollow core. The hollow core was filled with 1-3 M NaCl solution using negative pressure. Then, a 50 μm -diameter tungsten or stainless steel wire was introduced into the large extremity of the fiber to make electric contact with the tip as with conventional glass microelectrodes. A 2 meter-long multimode step index fiber (BFL22-550, core = 550 μm , cladding = 600 μm , NA = 0.22, Thorlabs inc.) was aligned with the graded index core and fixed with a UV curing adhesive (NOA81, Norland products and Curing system UV75 Light, Thorlabs Inc.) inside a borosilicate glass capillary (1.5 cm long, 1.5 mm inner diameter).

Optical setup

Schematic representation of the optical setup is given in **figure 1c**. A laser diode was used as excitation light source (Lambda pro 50 mW 532 nm DPSS laser, Alltech Solutions Inc. or FCD488 20 mW 488 nm, JDS Uniphase Corporation). The light passed through a neutral density filter set (N.D. 1-3 , NEK01, Thorlabs) and was reflected on a dichroic beam splitter (z543rdc or T495LP, Chroma Technologie Corporation). The beam was injected into a 10x microscope objective (UIS-2 Plan-N, NA = 0.25, Olympus Corporation) fixed on a fiber launch system (KT110; thorlabs) mounted on a xyz translation stage (PT3; Thorlabs). The laser beam was injected into the probe and propagated to the tip. The emitted fluorescence was collected through the microprobe tip, propagated back and collimated by the 10x microscope objective, passed through the dichroic beam splitter and entered in a 2"-long light isolator tube (SM1L30, Thorlabs). The fluorescent light was then filtered by two successive band pass filters (ET605/70M or ET525/50M, Chroma Technology Corporation) and focused by a Plano-Convex lens ($f = 50$ mm, LA1131-A, Thorlabs) on a photomultiplier tube (PMT) detector (Photosensor Module H6780-20, Hamamatsu) mounted on a xyz translation stage (PT3; Thorlabs). The entire optical system was enclosed in a light isolator box. The PMT output was amplified (Gain = 0.5 to 10), filtered (30 Hz low pass, Model 440, Brown lee precision Co.), digitized and stored on disk.

Brain slice preparations

Brain slices were prepared from adult male Sprague-Dawley rats and BAC transgenic mice expressing GFP under the control of the GAD65-GFP promoter (Lopez-Bendito et al., 2004). All procedures were performed according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and were approved by the Animal Care Committee at Laval University. Animals were deeply anaesthetized with ketamine and xylazine and were decapitated. The brains were removed quickly (<60 s) and placed in a ice-cold solution containing (in mM) 210 sucrose, 3.0 KCl, 0.75 CaCl₂, 3.0 MgSO₄, 1.0 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, and 10 glucose, saturated with 95% O₂-5% CO₂. Coronal slices, including the prelimbic area, were cut at

400 μm on a vibrating tissue slicer (VT 1000s, Leica) and kept into artificial cerebral spinal fluid (ACSF) containing (in mM) 124 NaCl, 3.0 KCl, 1.5 CaCl_2 , 1.3 MgSO_4 , 1.0 NaH_2PO_4 , 26 NaHCO_3 , and 20 glucose, saturated with 95% O_2 -5% CO_2 at room temperature. A slice was transferred to a submerge-type chamber where it was continuously exposed to ACSF at 30-32°C saturated with 95% O_2 -5% CO_2 and perfused at a rate of 2.0-2.5 ml/min. The slice was viewed first with a 10x objective and the prelimbic area of the prefrontal cortex was localized as the area between the forceps minor corpus callosum and the midline. Neurons of the prelimbic area were viewed under near infrared illumination with a 40x water immersion objective (IR-ACHROPLAN, 40X/0.80W, Zeiss) and a CCD camera (CCD-KP-M1AN, Hitachi). Labelled cells were identified by epifluorescence. The microprobes were mounted and moved with a MPC-200 microelectrode manipulator (Sutter Instrument).

Single cell labeling in fixed tissue

In a subset of experiments, Lucifer Yellow (LY) was injected in single neurons in fixed brain slices to control the distance between labeled cells. Briefly, the frontal part of a rat brain was fixed overnight in PFA 4% in PB 0.1M and then stored in PB 0.1M, at 4°C. Coronal slices (400 μm thick) were cut on a vibratome (Leica VT-1200S) and then placed in a patch-clamp recording chamber in PB 0.1M for LY injection. Several pairs of pyramidal cell were thus injected, under visual control, with sharp electrode filled with 0.5% LY (Buhl and Lubke, 1989).

***In vivo* extracellular single unit recording**

Retrograde labeling of spinothalamic tract neurons was achieved using 4 injections of 1 μl DiI (2.5%, Invitrogen) under stereotaxic guidance in the thalamus of male Sprague-Dawley rats (200-250 gr) under isoflurane anesthesia. 7-10 days later animals were anesthetized with isoflurane and spinal segments L5-S1 were exposed by a laminaectomy and

stabilized with two lateral clamps on the closest vertebra. A recording chamber was created on the back of the animal using agar (3%) and this chamber was perfused continually with buffered saline heated at 37°C. A tracheotomy was performed and the jugular vein cannulated. Animals were paralyzed with pancuronium bromide (Sigma, 5 mg/ml, 0.05ml/hour, i.v.) and ventilated to reduce breathing movements. Expiratory CO₂ was maintained at 4% and body temperature at 37.5°C using a heating blanket. The microprobe was mounted on a micromanipulator (Burleigh, 6000). The extracellular signal was amplified on an ER-1 extracellular amplifier (Cygnus technology), filtered (bandwidth 0.1-3.0 KHz), digitized and stored on disk simultaneously with the PMT output signal.

In vivo experiments were also conducted on the GAD-GFP BAC transgenic mice under ketamine (100 mg/kg)/xylazine (10 mg/kg) anesthesia. The mice were placed in a stereotaxic apparatus. The animal breathed freely and body temperature was maintained at 37.5°C with a heating pad controlled thermostatically. Throughout the experiment, a deep level of anesthesia was maintained (stage III-3) using additional doses of anesthetics given at 1 h interval (ketamine 20 mg/kg plus xylazine 0.3 mg/kg, i.m.) The microprobe was mounted on a micromanipulator (Burleigh 8200, Inchworm) and descended into the brain with a 30° angle to reach GFP expressing thalamic reticular neurons (2200-2500 µm deep). The extracellular electrophysiological signal was amplified (Neurodata IR183, Cygnus technology), filtered (band pass 300-3000 Hz, Model 440, Brownlee Precision Co.), digitized and stored on disk simultaneously with the PMT output signal.

Single cell Ca²⁺ measurements

Ca²⁺ measurements were carried out in adult rats anaesthetised as described above. A craniotomy was performed over the VPM region and the dura matter was resected. In some experiments, another craniotomy was performed over the barrel cortex and the exposed tissue was lesioned with silver nitrate to abolish rhythmic thalamic activity induced by corticothalamic inputs. Vibrissae were cut at 5 mm from the skin. Prior to stereotaxic injection of Ca²⁺ indicators, the coordinates of the whisker responsive neurons were

established by electrophysiological recording. The Ca^{2+} indicator Oregon green BAPTA-1 AM (OGB-1; Invitrogen) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) containing 20% pluronic (Invitrogen). This solution was then diluted (1/20) in 0.9% saline to obtain the final staining solution which was loaded into 30 μm -tip injection micro-pipettes (Fischer scientific, Drummond wiretrol II calibrated micropipettes). The injection micro-pipette was lowered to coordinates established by prior electrophysiological recording and 200 nl of the OGB-1 AM solution was injected. Three to four whisker responsive sites were localized in the VPM and were labelled in each animals. When recording from single units, the whisker corresponding to the receptive field of the cell was deflected for 70 ms in four different directions by means of a piezoelectric stimulator.

Photostimulation in *Thy1::ChR2-EYFP* transgenic mice

Channelrhodopsin-2 transgenic mice were purchased from the Jackson Labs (B6.Cg-Tg(Thy1::COP4/EYFP)18Gfng/J). In these experiments a craniotomy was performed over the motor cortex or over the VPM region of the thalamus. The microprobe was descended into the brain (800-4000 μm deep). A 488 nm laser (FCD488 20 mW 488 nm, JDS Uniphase Corporation) was used to detect and activate ChR2 expressing cells. A set of different neutral density filters (N.D. 0.1-4, Thorlabs) was used to control the light stimulus strength and a mechanical shutter (LS3, Uniblitz) was placed in front of the laser beam to control stimulus duration. The Light intensity at the microprobe tip (I_{Tip}) is given by $I_{Tip} = (P_i \cdot T_{ND} \cdot T_{fiber} \cdot T_p) / (\pi r^2)$, where P_i is the laser power, T_{ND} is the transmission coefficient of the neutral density filters at 488 nm, T_{fiber} is the transmission coefficient after the injection, propagation in the relay fiber and across the optical junction with the probe, T_p is the transmission of the probe and r is the optical core radius at the tip. T_{fiber} and T_p were determined empirically to be 72% and 0.1%, respectively.

Histology

Brain and spinal cords were extracted from mice and rats under deep anesthesia. The entire mice brain and the rat spinal segments L5-S1 were immersed in paraformaldehyde 4% and rinsed with a phosphate buffer solution. Tissue was cut at 80-100 μm , and sections were mounted on glass slides. DiI or GFP-labeled cell body diameters were measured as the average of two perpendicular diameters for each cell. Only cell bodies with visible nuclei within the section were used for the quantification.

Simulations and data presentation

Theoretical calculations and numerical simulations used to estimate the microprobe transverse and axial resolutions as well as its excitation/collection dynamics in tissue are described in **Supplementary Data**.

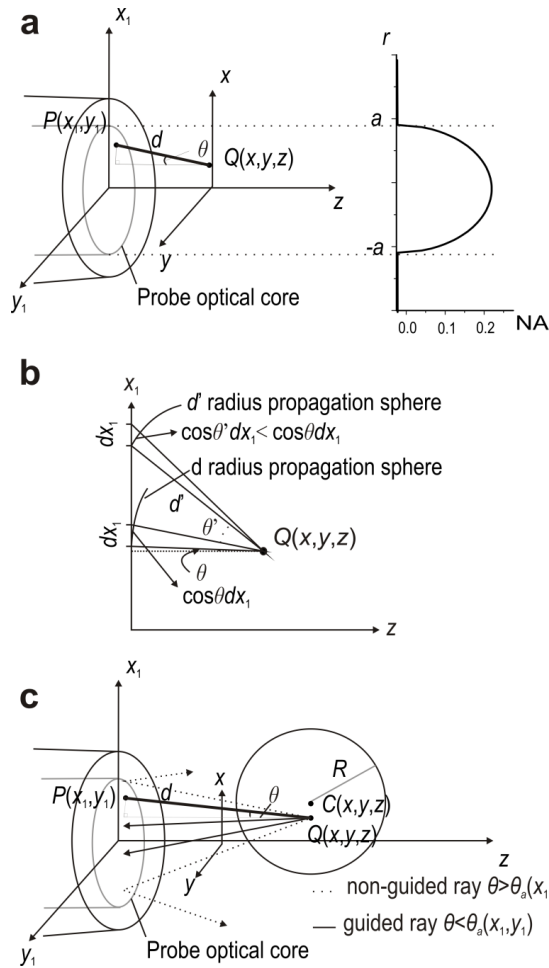
Statistical analysis

Correlation analysis was performed to analyze relationship between FWHM and laser power, Optical S/N and probe diameter, as well as Ca^{2+} responses and number of spikes discharged by the neurons. Regression analysis (ANOVA, F-Test) was conducted to analyze the angular preference to test whether 1) the relationship was linear and 2) the slope was equal to 1. Unless otherwise stated, data are expressed as mean \pm SD.

Supplementary Data

Theoretical calculations of the probe transverse and axial resolutions and of a neuron detection profile.

To calculate the theoretical transversal and axial resolution of the probe, we evaluated the collection profile in front of the probe. We thus calculated the collected power $P_Q(x,y,z)$ for each fluorescent point source $Q(x,y,z)$ in front of the probe (**Fig. A**). The value of $P_Q(x,y,z)$ depends on the local light excitation intensity $I_e(x,y,z)$ at $Q(x,y,z)$ and on the emission solid angle that fits the probe acceptance angle θ_a given by the probe numerical aperture (NA) as defined below. In the present case, the core of the probe possesses a gradient index profile so that the acceptance angle at each point $P(x_1,y_1)$ depends on its distance from the core axis.



Supplementary Figure 1 | (a) Schematic representation of a probe tip.

The optical core of the probe has a radius a and a gradient index profile resulting in a graded numerical aperture (NA; far right). $Q(x,y,z)$ represents a fluorescent point source, the emission of which will be partly collected by the probe. A ray of light emanating from $Q(x,y,z)$ and hitting the core at point $P(x_1,y_1)$ (represented by segment d) will be collected if its incidence angle θ is smaller than the acceptance angle $\theta_a(x_1,y_1)$ of the guiding probe at $P(x_1,y_1)$. (b) 2D representation of the effect of the infinitesimal core detecting element dx_1 transverse position. As dx_1 is moving transversally away from Q , the detecting surface is tilted compared to the wave front. (c) Schematic representation of a R -radius fluorescent sphere in front of the probe centered at $C(x,y,z)$. Only the points $Q(x,y,z)$ located within the sphere contribute to the total collected power.

In the following equations, we consider a uniform fluorescent medium characterized by a refractive index n_0 and a probe with a core radius a , a cladding index n_2 and a graded core index $n_1(x_1, y_1)$ that follows a quadratic profile reaching n_c at the fiber centre. Excitation wavelength is λ . For the sake of simplicity, Fresnel reflections were not taken into account, owing to their minimal impact at quasi-normal incidence.

i) Evaluation of the local excitation intensity $I_e(x, y, z)$

We assume that the light intensity $I_e(x, y, z)$ emanating from the fiber follows a Gaussian propagation profile with a waist ω_0 at the probe tip:

$$I_e(x, y, z) = \frac{\omega_0^2}{\omega^2(z)} e^{-2\left(\frac{x^2+y^2}{\omega^2(z)}\right)}, \quad (1)$$

$$\text{with } \omega(z) = \omega_0 \sqrt{1 + \frac{z^2}{z_0^2}} = \omega_0 \sqrt{1 + \frac{\lambda^2 z^2}{(\pi\omega_0)^2}} \quad (2)$$

ii) Evaluation of the collected power $P_Q(x, y, z)$ of the light emanating from point source $Q(x, y, z)$

The collected power $P_Q(x, y, z)$ of the light emanating from each point source $Q(x, y, z)$ in front of the probe follows the relation:

$$P_Q(x, y, z) \propto \iint_{\substack{\text{fiber} \\ \text{core}}} \overbrace{I_e(x, y, z)}^{\text{excitation}} \cdot \overbrace{\frac{1}{4\pi d^2}}^{\text{re-collection}} dS \quad \text{where } \theta \leq \theta_a \quad (3)$$

Note that, as the detecting surface dS is moving transversally from point source Q , the infinitesimal surface $dx_1 dy_1$ will correspond to a smaller accepted solid angle. The surface

corresponding to that solid angle will be tilted with an angle θ and dS corresponds to $\cos\theta dx_1 dy_1$, according to the cosine law of radiation. **Figure Ab** illustrates a 2D representation of the effect of the infinitesimal element dx_1 transversal position.

In equation (3):

- θ , the angle between the segment d and the z axis, is given by:

$$\theta = \arctan\left(\frac{\sqrt{(x_1 - x)^2 + (y_1 - y)^2}}{z}\right). \quad (4)$$

- d is the distance between $Q(x,y,z)$ and $P(x_1,y_1)$:

$$d = \sqrt{(x_1 - x)^2 + (y_1 - y)^2 + z^2}. \quad (5)$$

- $\theta_a(x_1, y_1)$ is the acceptance angle of the fiber, which is a function of the NA.

$$\theta_a(x_1, y_1) = \arcsin\left(\frac{NA}{n_0}\right) = \arcsin\left(\frac{\sqrt{n_1^2(x_1, y_1) - n_2^2}}{n_0}\right) \text{ and} \quad (6)$$

$$n_1(x_1, y_1) = n_c \left[1 - 2\left(\frac{n_c^2 - n_2^2}{2n_c^2}\right)\left(\frac{x_1^2 + y_1^2}{a^2}\right) \right]^{1/2}. \quad (7)$$

Computing P_Q (**Eq. 3**) for each point source $Q(x,y,z)$, one can reconstruct the excitation-collection profile in front of the probe and thus evaluate the axial and the transverse resolutions for that point source. These resolutions are actually defined in terms of the full width at half maximum of the excitation-collection profile resulting from axial or radial displacement of $Q(x,y,z)$. In this case, we were interested in the dynamics of the different normalized power, but the total collected power can be calculated by integrating equation 3 over the volume of interest V knowing the absorption factor and the quantum yields for each integrated dV .

iii) Detection of a neuron in front of the probe

In the last section, we considered a fluorescence point source. But if the fluorescence is originating from a neuron (approximated to a sphere) in front of the probe, all of the point sources $Q(x,y,z)$ within V_{sphere} , the volume of the sphere centered around $C(x,y,z)$, will contribute to the collected power P_{sphere} (**Fig. Ac**). We thus need to integrate all of the values of $P_Q(x,y,z)$ over the entire sphere volume:

$$P_{sphere} \propto \iiint_{V_{sphere}} P_Q(x, y, z) dV \quad (8)$$

The detection profile of a given neuron can be reconstructed by evaluating equation 8 for different positions $C(x,y,z)$ of the sphere (**Fig. Ac**).

Numerical model of the excitation/collection dynamics of the probe in front of a neuron

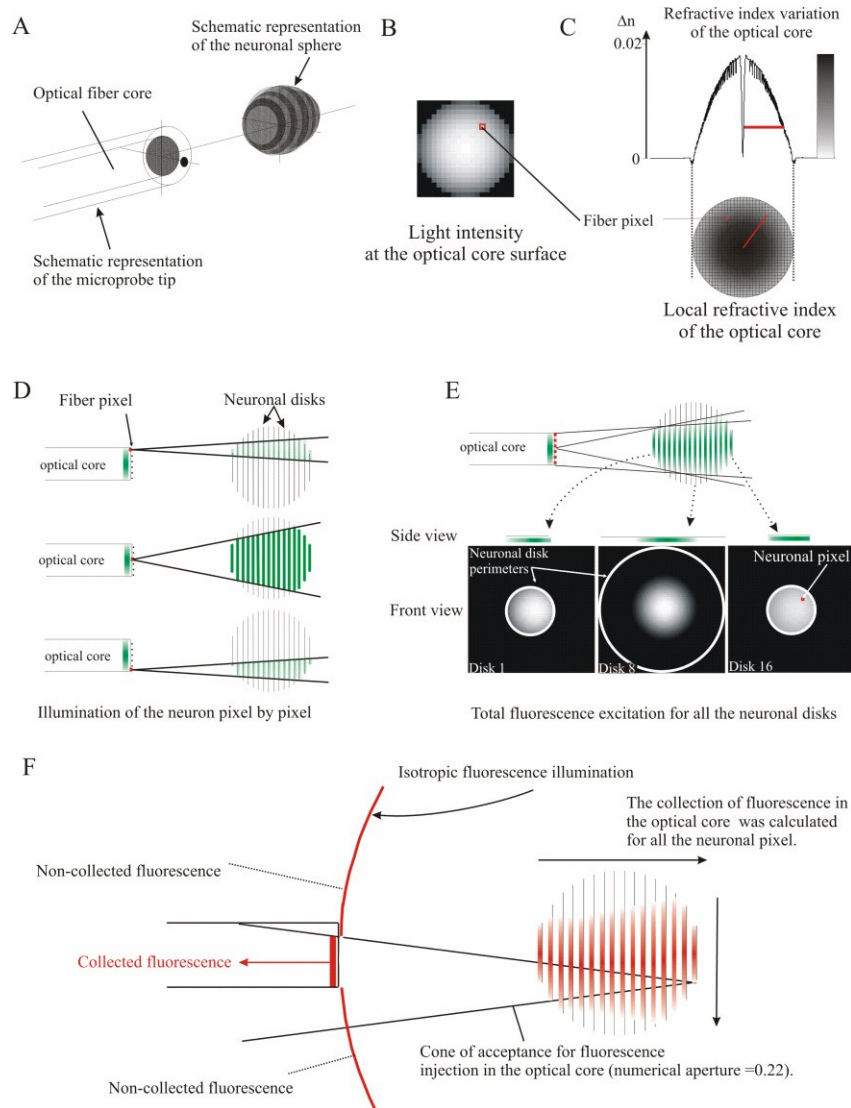
Detection profiles were also obtained with an independent approach. A numerical model was implemented that simulates the excitation/collection dynamics of the microprobe as it was displaced in front of a neuron, modeled as a fluorescent sphere of different volumes. We used the model to estimate the fluorescence power detected by the microprobe as a function of its position relative to the neuron in the axial and transverse axis.

Parameters of the model.

- 1) The light was propagated into the probe only within the optical core of the fiber;
- 2) Light propagation in tissue was calculated using geometrical optics;
- 3) The refractive index of the tissues (gray matter) was set as $n = 1.35$
- 4) The absorption and diffusion process were neglected for the following reasons:
 - i) the absorption coefficient in gray matter was $\mu_a = 0.4$ [1/cm]; it follows that the absorption mean free path ($l_a = 1/\mu_a = 2.5$ cm) was longer than the probe-neuron distances involved in the model (< 100 μm);
 - ii) the scattering parameters in gray matter were: $63 < \mu_s < 109$ [1/cm], $g \geq 0.88$ and $\mu_s' = (1-g) \mu_s$; where μ_s is the scattering coefficient, g is a measure of the scatter retained in the forward direction following a scattering event, and μ_s' is the reduced scattering coefficient; it follows that the reduced scattering mean free path ($l_s' = 1/\mu_s' = 0.76$ mm) was also longer than the probe-neuron distances involved in the model;
 - iii) the effective mean free path ($l_t' = 1/\mu_t'$, where $\mu_t' = \mu_a + (1-g) \mu_s$) in the gray matter was then estimated to be $l_t' = 0.74$ mm.
- 5) Fluorescent labeling was considered homogenous within the neuron;
- 6) The optical core at the tip was modeled as a 2D surface;
- 7) The neuron was modeled as a series of disks stacked together to form a sphere.

Consistency of the model

The estimates of detection volume obtained with the model considering a fluorescent source as a single 1 μm -diameter disk were comparable to that obtained with numerical solution of equation 3 and 8.



Supplementary Figure 2 | (a) Schematic representation of the model in 3D.

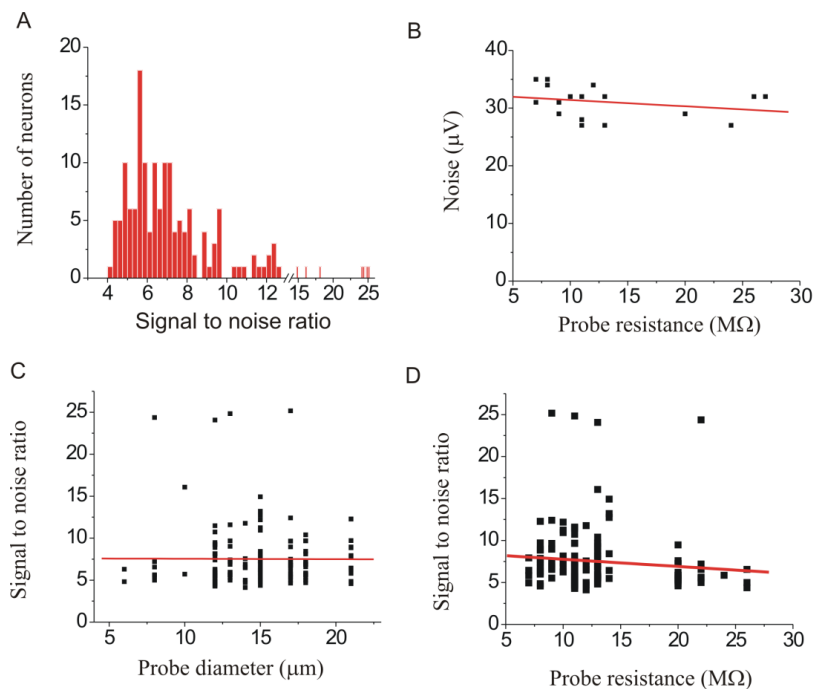
The tip of the microprobe is illustrated in front of a modeled spherical neuron. **(b)** Simulated image of light intensity at the output of the optical core (Gaussian profile) at the tip of the microprobe (pixel size = $0.25 \mu\text{m}$). **(c)** Refractive index of the optical core for each fiber pixel. The local numerical aperture of each pixel defines the illumination angle at the output. **(d)** Schematic representation of the neuron illumination process, illustrated for three pixels. Each fiber pixel acts as a directional point source emitting light at an intensity determined by the fiber output Gaussian profile (given in **b**) and with a specific

angle determined by its numerical aperture. **(e)** Excitation profile resulting from the summation of all pixel illuminations, distributed across each disk of the simulated neuronal sphere. The inset images at the bottom illustrate the illumination profile of three disks within the simulated neuronal sphere. **(f)** To calculate the fluorescence collected by the fiber, each neuron pixel was modeled as an isotropic fluorescence point source with a relative intensity proportional to its local excitation. Only light that entered the fiber surface with an angle that was within the fiber numerical aperture ($NA = 0.22$) was considered as successfully injected into the optical core of fiber. The sequence of computation illustrated in **d, e & f** was repeated for each position (transverse and axial displacement) of the microprobe tip with respect to the neuron.

Supplementary References

1. Vo-Dinh T. Biomedical Photonics handbook (CRC Press, Boca Raton, 2003).

Electrical properties of the microprobes



Supplementary Figure 3 |

Electrical properties of the microprobes **(a)** Distribution of electrical signal-to-noise ratios for all the recordings from spinothalamic tract neurons included in this study. The mean signal-to-noise ratio was 7.6 ± 3.7 (mean \pm SD; n = 155 neurons from 13 rats). **(b)** Recording noise as a function of probe resistance. There was no correlation between noise level and probe resistance (linear regression in red; R = -0.27; p = 0.29). **(c)** Signal-to-noise ratios as a function of probe tip diameter (linear regression in red; R = -0.11; p = 0.18). **(d)** Signal-to-noise ratios as a function of probe resistance (linear regression in red; R = -0.01; p = 0.95). **(b-c)** There was no correlation between signal-to-noise ratio and probe resistances or probe tip diameter.

Chapitre 5

A multimodal micro-optrode combining field and single unit recording, multispectral detection and photolabeling capabilities

Suzie Dufour^{1,2}, Guillaume Lavertu¹, Sophie Dufour Beauséjour¹, Alexandre Juneau Fecteau¹, Nicole Calakos³, Martin Deschênes¹, Réal Vallée² and Yves De Koninck^{1,2}

1Unité de neurosciences cellulaires et moléculaires, Institut universitaire en santé mentale de Québec, Québec, QC, Canada, G1J 2G3.

2Centre d'optique, photonique et laser, Université Laval, Québec, QC, Canada, G1K 7P4.

3Center for Translational Neuroscience, Duke University Medical Center, Durham, NC27710.

PLoS ONE 8 (2) e57703

Résumé

Les microélectrodes sont une solution très utile et peu invasive pour les études fonctionnelles *in vivo* des structures profondes du cerveau. Cependant, elles sont limitées quant à la quantité d'informations qu'elles fournissent. Ici, nous décrivons une fibre optique de verre, couverte d'aluminium, donnant accès à de multiples opportunités de détection électrique et optique tout en conservant des tailles de pointe permettant l'enregistrement de cellule individuelle (diamètre $\leq 10 \mu\text{m}$). La sonde permet la séparation optique de cellule individuelle dans des souris transgéniques exprimant des protéines fluorescentes de différentes couleurs. Elle permet également la conversion des protéines fluorescentes photoconvertissable, qui peuvent être utilisées pour l'identification à postériori des cellules enregistrées. Malgré le fait que le revêtement métallique n'améliore pas considérablement la capacité de séparation optique de la microsonde, la combinaison du métal à l'extérieur de la sonde et d'un noyau creux à l'intérieur permet l'enregistrement simultané de neurone individuel et l'enregistrement du potentiel de champs d'une population de neurones. L'élargissement de la gamme de fonctionnalités offertes par la même microsonde ouvre donc la voie aux études multiparamétriques à l'intérieur des structures profondes d'un système nerveux intact.

Abstract

Microelectrodes have been very instrumental and minimally invasive for *in vivo* functional studies from deep brain structures. However they are limited in the amount of information they provide. Here, we describe a, aluminum-coated, fibre optic-based glass microprobe with multiple electrical and optical detection capabilities while retaining tip dimensions that enable single cell measurements (diameter $\leq 10 \mu\text{m}$). The probe enables optical separation from individual cells in transgenic mice expressing multiple fluorescent proteins in distinct populations of neurons within the same deep brain nucleus. It also enables color conversion of photoswitchable fluorescent proteins, which can be used for post-hoc identification of the recorded cells. While metal coating did not significantly improve the optical separation capabilities of the microprobe, the combination of metal on the outside of the probe and of a hollow core within the fiber yields a microelectrode enabling simultaneous single unit and population field potential recordings. The extended range of functionalities provided by the same microprobe thus opens several avenues for multidimensional structural and functional interrogation of single cells and their surrounding deep within the intact nervous system.

Introduction

Microelectrode recordings are largely used *in vivo* to study cell physiology in intact brain. Unlike imaging techniques, they are not limited in depth measurements. Indeed, twophoton microscopy, for example, has been very instrumental to exploit the capabilities opened by fluorescent sensors for *in vivo* imaging, but the approach remains restricted to surface measurements ($<1000 \mu\text{m}$ for brain tissue) (Helmchen and Denk, 2005), limiting its applicability for *in vivo* studies from deep brain structures. Microelectrodes on the other hand, allow for very long term measurement in minimally invasive condition, but are limited in types of information they provide and do not allow distinguishing from cells that present similar electrophysiological signatures. Here we show how multiple sensing

capabilities can be embedded in a single aluminum coated glass microprobe. The design presented here extends on a recently developed microprobe made of a dual core tapered optical fibre. One core is a standard optical core used to excite and collect fluorescence and the second is a hollow core filled with an electrolyte allowing extracellular single unit electrophysiological recordings (LeChasseur et al., 2011).

Fluorescent labeling offers the advantage of having relatively narrow absorption and emission spectra and fluorescent proteins spectra are now covering the entire visible optical spectrum (Shaner et al., 2005; Chudakov et al., 2005). It is thus possible to combine two or more fluorescent markers within the same sample, as long as their spectra are not overlapping. Here we demonstrate that the probe can perform simultaneous multispectral optical recordings *in vivo* to detect similar cell types expressing different fluorescent proteins within the same brain nucleus. We also show that using photoconvertible fluorescent proteins (McKinney et al., 2009), the microprobe can be used to convert the fluorescence properties of a cell to photolabel it. This work also demonstrate that a thin reflective aluminum film can be used as a large scale field potential electrode yielding a highly compact microprobe with combined single unit and population recording capabilities. This allows relating activity in single cells to that of the surrounding population of neurons. These capabilities significantly enhance the amount of information that can be probed with minimal disruption of tissue for *in vivo* studies and no limit in depth at which measurements can be made.

Materials and Methods

Ethical Approval

All protocols were performed in accordance with the guidelines from the Canadian Council on Animal Care.

Microprobe and optical setup

Probes were made from tapered dual core optical fibre designed in collaboration with the INO (Québec, Canada, <http://www.ino.ca>). Schematics of the probes are shown in **Fig. 1a** and fabrication details were given elsewhere (LeChasseur et al., 2011). Briefly, the probe is made from a tapered multimode fibre that combines an optical core for optical illumination and detection as well as a hollow core serving as an electrode. Probes tips were cleaved to a diameter of 10 microns, were filled with 2M NaCl and connected to the optical setup via a relay fibre (**Fig. 1b**). In some experiments, an aluminum (Al) coating (100 nm) was evaporated on the probe shoulder and shank using a vacuum metal evaporation system. Aluminum was chosen to act both as an optical reflector and an electrical conductor to prevent optical losses through the tapered region and allow electrical recording. Its resistance to oxidation yielded more stable optical and electrical properties. A 100 µm diameter stainless steel wire was attached to the coating with silver epoxy (H2OE, Epoxy Technology). Conductive metallic films were isolated with UV curing adhesive (NOA81, Norland products). Only 100-250 µm at the tip of the probe remained uncovered to serve as an electrode. A dual wavelength detection system was used to differentiate labeled cell types on the basis of their fluorescence spectrum. The optical setup used with the probe and its components is described in **Fig.1b**. Photomultiplier tube (PMT) detector outputs were amplified (Gain = 0.5 to 10), filtered (10Hz low pass, Model 440, Brownlee Precision Co.) and stored on disk.

Animals

Experiments were conducted on adult male Sprague-Dawley rats (n=4 rats) (250-350 g) anesthetized with ketamine (75 mg/kg)-xylazine (5 mg/kg) or on mice (n=2 mice) anesthetized with ketamine (100 mg/kg)-xylazine (10 mg/kg). Animals were placed into a stereotaxic apparatus. The animal breathed freely and body temperature was maintained at 37.5°C with a heating pad controlled thermostatically. During the experiment, the animal was maintained under deep anesthesia using additional doses of anesthetics given at 1 h interval. A craniotomy was performed over the region of interest where the probe was lowered using a micromanipulator (Burleigh 8200, Inchworm).

Optical and electrical recordings

The hollow core of the optrode was used to perform single unit recordings and in a subset of experiments metal coatings were used to record the activity of a large volume of surrounding cells. Field potential and single unit recordings were amplified (Neurodata IR183, Cygnus Technology) and filtered (bandpass 0.2-300 and 200-3000 Hz respectively, Model 440, Brownlee Precision Co.) For multicolour detection experiments (see **Fig. 1b**), two different excitation sources were needed (a HeNe, 5mW, 543 nm from Coherent and a FCD488, 24 mW, 488 nm from JDS Uniphase Corporation). A shutter (LS3, Uniblitz) was placed in front of each source to continuously alternate (at a $\cong 2$ Hz frequency) between the two excitation wavelengths. The first laser was reflected on a mirror and passed through the dichroic mirror (495DCLP, Chroma Technology Corporation) before being reflected by a multiline dichroic mirror (51015bs, Chroma Technology Corporation). The second laser reflected on the first dichroic mirror and on the second. Fluorescence was collected and transmitted by the multiline dichroic mirror. The fluorescence was then reflected (for the green fluorescence) or transmitted (for the red fluorescence) by a third dichroic mirror (495DCLP, Chroma Technology Corporation) toward two different PMT detectors. Again, two bandpass filters were placed in front of each detector to isolate the sampled fluorescence (ET520/40M and ET005/52M, Chroma Technology Corporation). Fluorescence and the electrophysiological recordings were simultaneously digitized and stored on disk.

Cell cultures

To demonstrate multicolour detection, *in vitro* experiments were conducted on hippocampal cultured neurons (14 days old) previously transfected with tdTomato or mGFP. 24 hours prior to the experiments, cells were placed in a well containing 0.5 ml of neurobasal (NB, 21103-049) medium supplemented with B-27 (1:50, 17504-044), Penicillin-Streptomycin (1:200, 15140-122) and Glutamax (1:400, 35050-061) and 100 μ L of NB containing 0.5 μ g of DNA and 2 μ L of lipofectamine (11668) was deposited in the

well for five hours incubation, after what cells were incubated in supplemented NB until experimentation. All culture medium chemical were purchased from Invitrogen Inc. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 10-20 min and placed in a microscope recording chamber filled with phosphate buffer (0.1M). The optical probe was mounted on a manipulator (ROE-200, Sutter Instrument Company) and moved towards fluorescent cells under visual guidance using an Eclipse E600FN, Nikon microscope. The fluorescence signals of the two different PMTs were recorded simultaneously as the probe was moved in front of the cells.

Multicolour transgenic mice

In vivo experiments were conducted on BAC transgenic mice where neurons expressing tdTomato and EGFP proteins under the control of the promoters for D1 and D2 dopamine receptors, respectively (*Drd1a*-tdTomato/*Drd2*-EGFP transgenic mice (Gong et al., 2003; Shuen et al., 2008; Zhang et al., 2010), courtesy of Nicole Calakos and Jean-Martin Beaulieu). A craniotomy was performed over the frontal part of the striatum (where dopaminergic inputs are abundant). Probes were lowered into the striatum to depths ranging from 1500-2500 μm while red and green fluorescence were simultaneously recorded along with the electrophysiological signal.

Photoconversion

In vitro experiments were also conducted in hippocampal mEOS2 transfected cells. Protocol for cultured cell handling and transfection was similar to the one presented in previous section. But in this case, cells were not fixed and were kept alive under microscope with the help of a constant ACSF perfusion (120 mM NaCl, 0.6 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 2.5 mM KCl, 10 mM Hepes (7.9) and 8 mM D-Glucose). For these experiments, a conventional mercury lamp (Wild Leitz Canada) was filtered (Thorlabs, FP400-40), collimated and injected through the microprobe. Emission properties of mEOS2 were converted using UV illumination provided by the microprobe. Fluorescent red and green signals were image separately (Zeiss filter sets: (BP564/12, FT580, LP590) and (BP450-490, FT510, BP515-565) under a microscope objective to visualize in real

time the emission spectral shift of the mEOS2 as it was being exposed to UV light through the microprobe. Red fluorescence was continuously recorded, and to insure that the increase was due to conversion, green fluorescence was measured at two different time points during photo-conversion.

Quantification of light collection through the microprobe wall

The Al coating serves as electrodes but they also prevent light losses through the tapered wall of the probe. To quantify the side collection of uncoated probe, the tapered region of an Al-coated probe was soaked into a (10 mM) Lucifer Yellow 4% Agar solution and the fluorescence collected was recorded. The metal coating was then chemically attacked using a basic solution (NaOH, 0.1M). Finally, the probe was soaked again into the same fluorescent solution and the collected signal was re-evaluated. This technique allowed us to compare the exact same probe without having to change the conditions for light injection in to the probe.

Data Analysis

To show the correlation between single unit and local field potential activity, spikes were computed in time histograms where the time point $t=0$ corresponds to the maxima of the slow component of the local field potential (2-10Hz). Spikes were computed for 15 field cycles.

Fluorescence values are commonly presented as the variation of fluorescence divided by the initial fluorescence level ($\Delta F/F_0$). In a vertical scanning protocol, as the one we use here, the value of F_0 can be very low or vary as a function of the probe penetration in tissue and we opted to present the fluorescence data as the variation of fluorescence intensity divided by the peak-to-peak root mean square (RMS) value of the initial fluorescence (signal-to-noise (S/N)). Details on the cell detection protocol and criteria were described elsewhere (Shaner et al., 2005).

Results

Multispectral detection

Multispectral detection is used in microscopy to discriminate cells labeled with proteins having different emission spectra. To test the compatibility of multispectral detection with our microprobe, we injected light from two different excitation sources in the probe optical channel. The detection system proposed here (see schematics in **Fig. 2a**) was successfully used to differentiate two cell populations labeled with two different fluorescent markers *in vitro* and *in vivo*. Recorded fluorescence signals as a function of the probe position in front of a fixed GFP cell is shown in **Fig. 2b**. The same result is shown for a tdTomato cell (**Fig. 2c**). Fluorescence increase and decrease only in the corresponding PMT signal as the probe passed the cell. To test the ability of the probe to differentiate between two labeled populations of cells *in vivo*, we performed vertical scanning experiments through the striatum of adult transgenic mice expressing tdTomato and EGFP proteins under the control of the D1 and D2 dopaminergic receptor's promoters, respectively {Gong, 2003 683 /id;Shuen, 2008 684 /id;Zhang, 2010 685 /id}. Probes descents were repeated within the following stereotaxic coordinates: 1.5 to 2.5 mm lateromedial, 0.5 to 1.5 anterior to Bregma and 2 to 3.5 mm below brain surface. **Figure 2d** and **2e** shows the distribution of tdTomato and EGFP in the striatum. Cells expressing the D1 and D2 receptors could be clearly identified (**Fig. 2d**) and very few cells expressed both markers. Identification of D1 and D2 cells with the microprobe yielded a similar distribution of D1-only, D2-only and combined D1/D2 cell detection as that obtained under microscopy analysis (**Fig. 2f**). Optical detection of EGFP and tdTomato expressing cells respectively is shown in **figure 2g-h** along with five superimposed consecutive spikes recorded at fluorescence peaks. The microprobe thus provides a means to identify and record from different labeled populations of cells intermingled within the same deep brain structure.

Photoconversion

To test whether the microprobe could be used to change emission properties of photo-switchable fluorescent proteins, we illuminated mEOS2 transected cells with UV light

injected through the microprobe. Intensity at probe tip used to convert emission properties was estimated to 2 mW/mm². Results show a significant increase in red signal and a decrease in green fluorescence of an isolated mEOS2 expressing neuron (**Fig. 3**). This indicates that the microprobe is suitable to label by photo-conversion or photo-activation *in vivo* recorded cells.

Light collection through the microprobe wall

Tapered waveguides can collect light through their wall with an acceptance angle that varies with the taper angle θ . Wall collection is less effective per surface area than tip collection, but the surface of the tapered region is significantly larger than the tip transversal surface. **Figure 4** illustrates light behavior as a ray is incident on the wall of a tapered waveguide. θ and α are the half angles of the cladding and core tapers. They are determined with the taper length L as well as the initial (R and r_c) and final (R_f and r_{cf}) dimensions of the waveguide. These parameters are defined in **Figure 4**. The ray encounters four interfaces with incidence angles θ_1 , θ_2 , θ_3 and θ_4 respectively. The refractive index of the external medium, the waveguide core and cladding are defined as n_0 , n_1 and n_2 . For small incidence angle θ_1 the ray will be transmitted through the tapered waveguide, but for large θ_1 , the ray will undergoes total internal reflection at the interface between the waveguide core and the cladding (if θ_1 is big enough) or at the interface between the cladding and the external medium. In the later case, the ray will be first guided in the cladding, and after few reflections its incidence angle in the waveguide core will fulfill the total internal reflection requirement of the core. From Snell-Descartes law we can calculate the critical angle θ_{4c} at the interface between the cladding and the external medium and evaluate the angle θ_{1c} that will lead to that critical angle.

$$\theta_{4c} = \sin^{-1} \frac{n_0}{n_2}, \quad (1)$$

$$\theta_{3c} = \sin^{-1} \left[\frac{n_2}{n_1} \sin(\theta_{4c} - \theta + \alpha) \right], \quad (2)$$

$$\theta_{2c} = \sin^{-1} \left[\frac{n_1}{n_2} \sin(\theta_{3c} - 2\alpha) \right] \text{ and} \quad (3)$$

$$\theta_{1c} = \sin^{-1} \left[\frac{n_2}{n_0} \sin(\theta_{2c} + \alpha - \theta) \right]. \quad (4)$$

The critical accepted incidence angle θ_{1c} as a function of the taper angle θ was calculated for our probe parameters ($R = 100 \mu\text{m}$, $R_f = 5 \mu\text{m}$, $r_c = 60 \mu\text{m}$, $r_{cf} = 3 \mu\text{m}$, $n_1 = 1.47$ and $n_2 = 1.45$.) in air ($n_0 = 1$) and in tissue ($n_0 = 1.35$). **Figure 4b** shows that a significant range of incidence angles along the shank of the probe will enter and remain within the waveguide. Note that for angles that are not satisfying the total internal reflection condition, partial reflection will occur. We therefore made a batch of probes coated with a thin reflective layer of Al to block light collection through the probe shank (**Fig 1a**).

Effect of aluminum coating on background fluorescence noise

To ascertain the value of coating the probes with a reflective film, we measured experimentally the impact of fluorescence collection through the microprobe wall. For this, we measured fluorescence collected from coated versus uncoated probes as they were dipped into a uniform fluorescent medium. For uncoated probes, the fluorescence increased as a function of the penetration depth whereas this was not the case for the coated probes (**Fig. 5a**). Thus Al coating effectively prevents fluorescent signal contamination from the side of the microprobe. We then tested fluorescence changes as the microprobe is advanced through tissue containing individual labeled cells. Transient rise and decay in fluorescence occurred as the probe passed by labeled cells as previously described (LeChasseur et al., 2011). These transients were similar with the coated and uncoated probes. However, wall collection caused a gradual shift in the signal DC level with the bare probes (**Fig. 5b**). In a static protocol, where the probe position is maintained and fluorescence is used to measure functional events such as fluctuations in ionic concentration, wall collection must be considered when choosing the experimental conditions (*e.g.*, labeling volume and sparseness, probe tapering angle). The coating also helps minimize photobleaching and photodamage due to light escaping from the side of the probe. In contrast, the presence of coating does not improve individual cell detection when using the dynamic vertical scanning protocol described previously (LeChasseur et al., 2011).

***In vivo* simultaneous field potential and single unit recordings**

Given the conductive properties of Al, coatings can also serve as field potential electrodes. The detecting surface (uninsulated tip) of these electrodes must be relevant to the size of the region of interest and their resistance must be as small as possible. To characterize probe performances, we measured electrode resistance for different detecting areas. Thin metallic layers may have very high resistances, but the thickness used here (≈ 100 nm) is large enough and has as a negligible effect on the electrode resistance. The resistance is therefore low enough for field potential recordings and can be adjusted as desired by controlling the uninsulated tip surface of the electrode and, as predicted by the Robinson model [9], is inversely proportional to that surface (**Fig. 6a**, $R^2 = 0.95$, $n=74$ electrodes). Microprobes with metal coating resistances ranging from 0.6 to 4 M Ω were used to record simultaneously single unit (through the hollow core) and field potentials during spontaneous activity ($n = 28$ cells) (**Figs. 6c**). In **figure 6c**, field and single unit recordings show the typical slow wave activity of cortical neurons under ketamine-xylazine anesthesia (Sheeba et al., 2008). Note that this frequency differs from anaesthetized rat respiratory frequency (typically 1 Hz). **Figure 6c** also shows a histogram where spikes were computed according to the slow field cycles (2-10 Hz) and an interspike interval histogram. Spike occurrence shows a correlation with the field state. This dual recording capability is a complement to our fibre optic microprobe that allows for interrogating the central nervous system both at cellular and network levels concurrently.

Discussion

The present work shows how a unique micro-optrode can combine single unit and large scale field recordings. It also shows that the probe optical channel is suitable for multicolour detection.

Fluorescent proteins are now covering the majority of the visible spectrum (Chudakov et al., 2005) and consequently, more than one cell types can easily be labeled within the same animal with a specific genetic colour coding. Using multi-excitation sources and detectors

we showed that the same probe can be used to simultaneously identify and record two different cell populations at depth inaccessible to conventional two-photon microscopy (Helmchen and Denk, 2005). Alternative techniques are being developed to reach deeper regions of the brain such as micro-endoscopy, but they remain relatively invasive and they do not allow direct electrical single unit recordings (Jung et al., 2004a; Levene et al., 2004b). Additionally, the multispectral capabilities presented here open possibilities for ratiometric dye measurements (*e.g.*, with the calcium indicator Fura-2) or for spectral measurements of frequency resonance energy transfer (FRET) (Jares-Erijman and Jovin, 2003).

Our experiments also demonstrate that probes can be used to convert fluorescence of photoconvertible fluorescent proteins to label recorded cells *in vivo*. Labeling recorded cells can be extremely valuable for post-hoc morphological or biochemical characterization.

This work also demonstrated that reflective metal films on the microprobe while reducing fluorescent contamination in some protocols and architectures can be used to perform field potential recordings. Thus the probe can be used to simultaneously acquire single cell recordings and field potentials from large number of cells. Knowing the overall activity of the population can be valuable especially when using a stimulation protocol; it can therefore be very instrumental to compare the cell response to the population response. One advantage of the probe is that the field recording electrode is located very near the single cells recording component ensuring that both signals are centered at the same point even though they represent different sampling volumes. Coupled with the ability to identify cells based on their fluorescence this can be particularly enabling to contrast the response of sparsely distributed genetically modified cells (*e.g.*, after *in utero* electroporation) to that of the surrounding population (Klausberger et al., 2003; Bazetot et al., 2010).

Controlling the sampling volume can be achieved by modifying the impedance properties and recording surface of the field electrode provided by the coating. To achieve this, the impedance can be adapted using different tapering shapes and insulation length as well as by adding spongy or rough deposit (to modify surface contact (Robinson, 1968)).

In conclusion, the combined optical and electrical multimodalities of the probe and its micrometric resolution vastly expand the possibilities for *in vivo* electrophysiology, in particular, with optical means to monitor the impact of genetic manipulations of individual cells *in vivo*. The simplicity of the probe, its low cost, ease of use and adaptability make it particularly attractive modality to enhance *in vivo* electrophysiological recording systems.

Figures

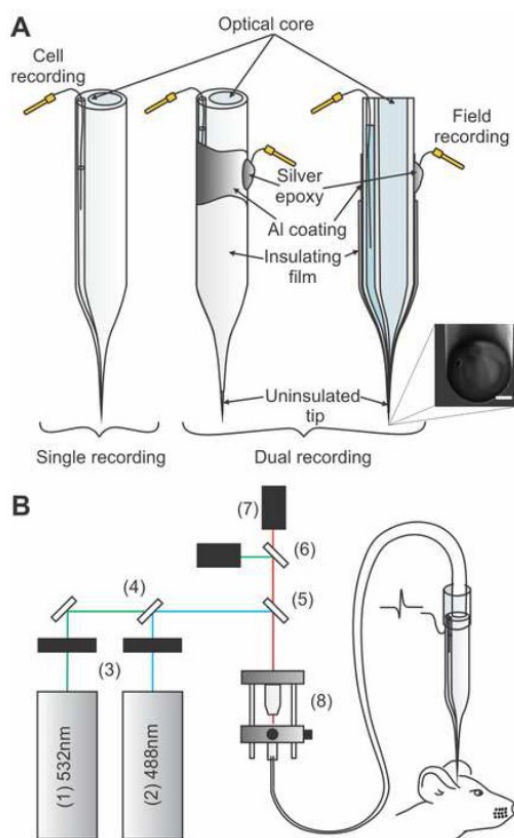


Figure 1: Optical and electrical microprobes.

a) Schematic representation of the probe (left) and a metal coated probe adapted to achieve large field recording through the Al coating (middle: 3D representation, right: transverse cut view). Insets are scanning electron microscopy images of the respective electrode tips (scale bars are 2 μm). b) Experimental setup for multispectral detection showing : (1) 543 nm laser (25-LGR-193-249, Melles Griot), (2) 488 nm laser (FCD488 24 mW, JDS Uniphase Corporation), (3) shutters (LS3,Uniblitz), (4) 495 nm dichroic mirror (495DCLP, Chroma Technology Corporation), (5) multiline dichroic mirror (51015bs, Chroma Technology Corporation), (6) 495 nm dichroic mirror (495DCLP, Chroma Technology Corporation), (7) PMT detectors (H6780-20, Hamamatsu) and bandpass filters (ET520/40M and ET005/52M, Chroma Technology Corporation) and (8) objective (UIS-2

Plan-N, NA=0.25, Olympus Corporation) and the fibre optic launch system (KT110, Thorlabs Inc.).

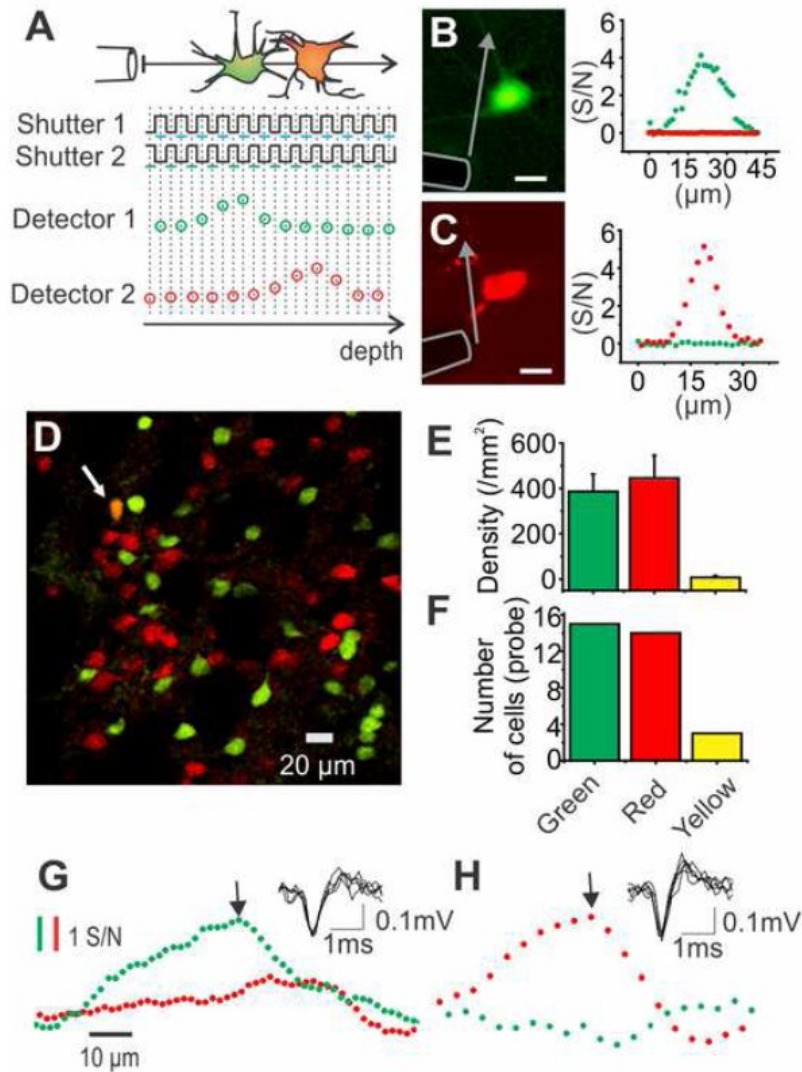


Figure 2: Multispectral detection allows identifying D1 and D2 expressing neurons.

A) Schema of the shutters state and incident signals on the detecting PMTs as the probe passes by a green and a red cell in succession. B) (Left) Micrograph of a GFP fluorescent cell and a microprobe (highlighted with gray contour). Scale bar is 10 μm . (Right) Collected fluorescence in the PMT detector 1 (green dots), and 2 (red dots) as the probe is

190

moved transversally in front of the cell shown in left panel. C) Same result is shown as the probe pass by a tdTomato fluorescent cell. Scale bar is 10 μm . Arrows in (B) and (C) represent the probe displacement in front of the cell. D) Striatal section of a transgenic mouse showing cells expressing fluorescent proteins under the control of D1 (red) or D2 (green) receptor (green) promoters. Some cells co-express both fluorescent proteins (see arrow). E) Average density of the different cell types in the striatum (n=5 striatal sections). Cells were counted and densities were estimated with the help of the software Image J. F) Histogram of the optically detected cells. Fluorescent cell detections were accompanied by a rise (signal-to-noise > 2) and a decay of green and/or red fluorescence as described previously. A total of 29 cells were detected and computed in a histogram according to their fluorescence colour. (G-H) Examples of *in vivo* simultaneous optical and electrical recordings (inset) as the probe pass by a green (G) or a red (H) cell.

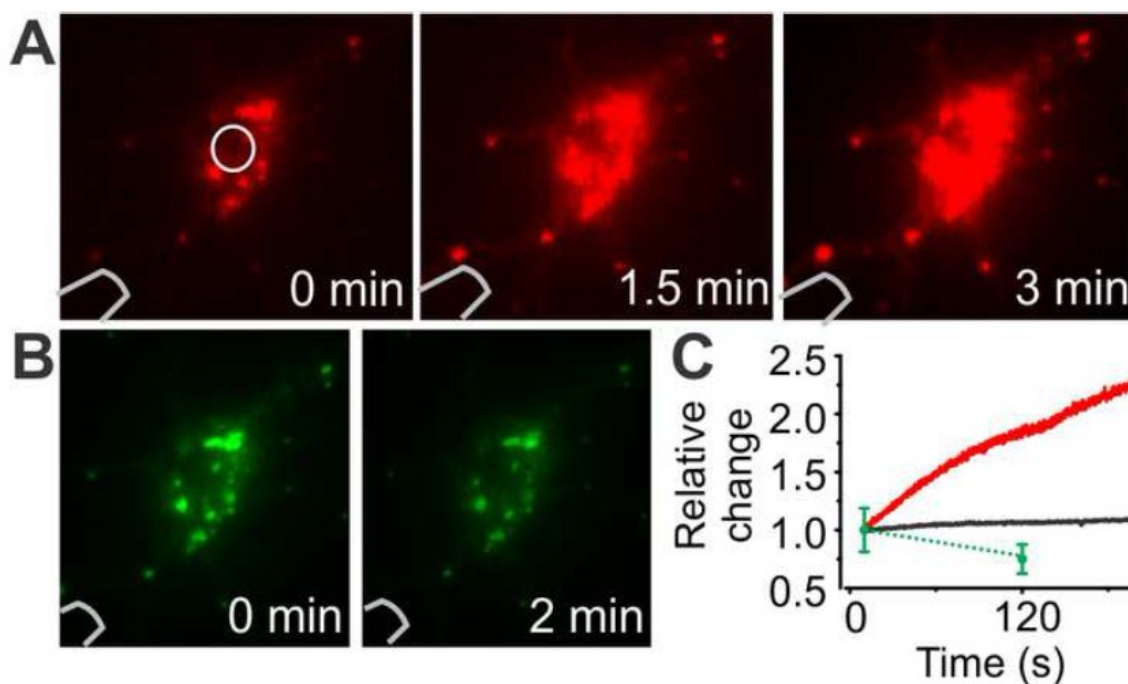


Figure 3: Photoconversion of mEOS.

A-B) Images at different time points of a mEOS2 expressing cell during UV-induced photoconversion. UV illumination with the probe causes an increase in red fluorescence

(A) and a decrease in green signal (B). C) Red and green emission of a cell during photo-conversion as a function of time. The region of interest taken into account is shown in (A) (white circle). Note that only two time points were measured for the green signal. Change in background fluorescence around the cell is shown in black.

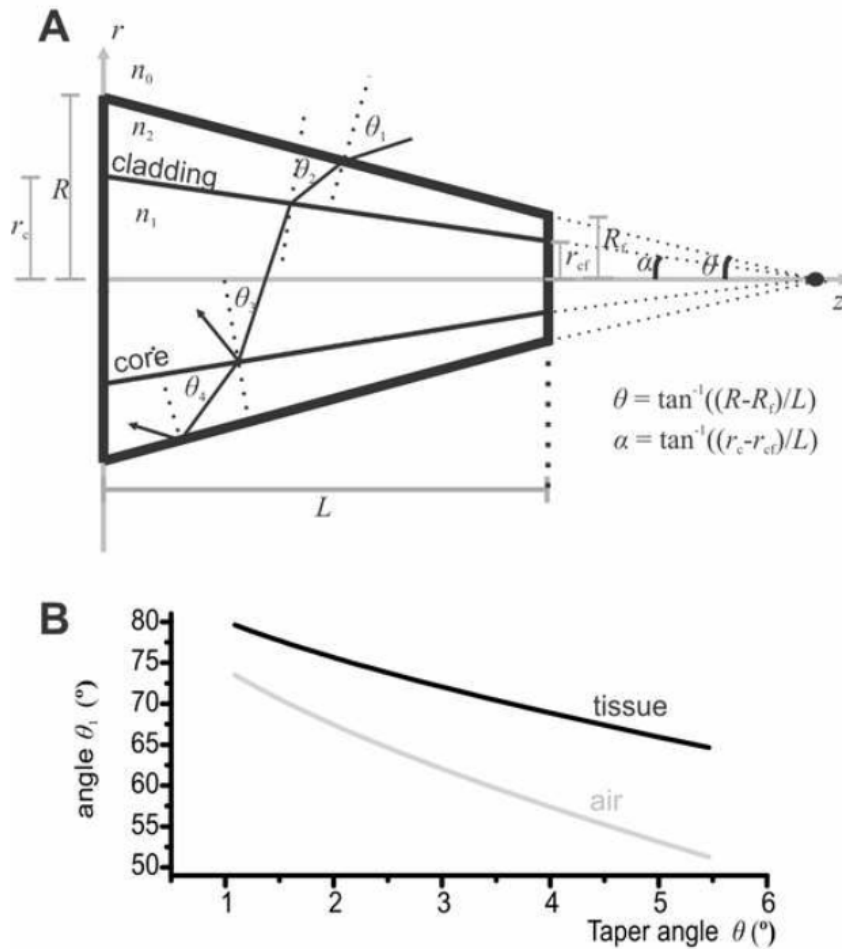


Figure 4: Side acceptance of tapered waveguides.

A) 2D schematic representation of ray acceptance within a tapered waveguide (thick black boundaries). Note that for visualization purpose the taper angle was exaggerated in this illustration. B) Critical accepted incidence angle θ_{lc} as a function of the taper angle θ . Rays

with incidence angles ranging from θ_{1c} to 90° will be accepted in the waveguide (parameters were fixed as follows: $R = 100 \mu\text{m}$, $R_f = 5 \mu\text{m}$, $r_c = 60 \mu\text{m}$, $r_{cf} = 3 \mu\text{m}$, $n_0 = 1$ (air), $n_0 = 1.35$ (tissue) $n_1 = 1.47$ and $n_2 = 1.45$).

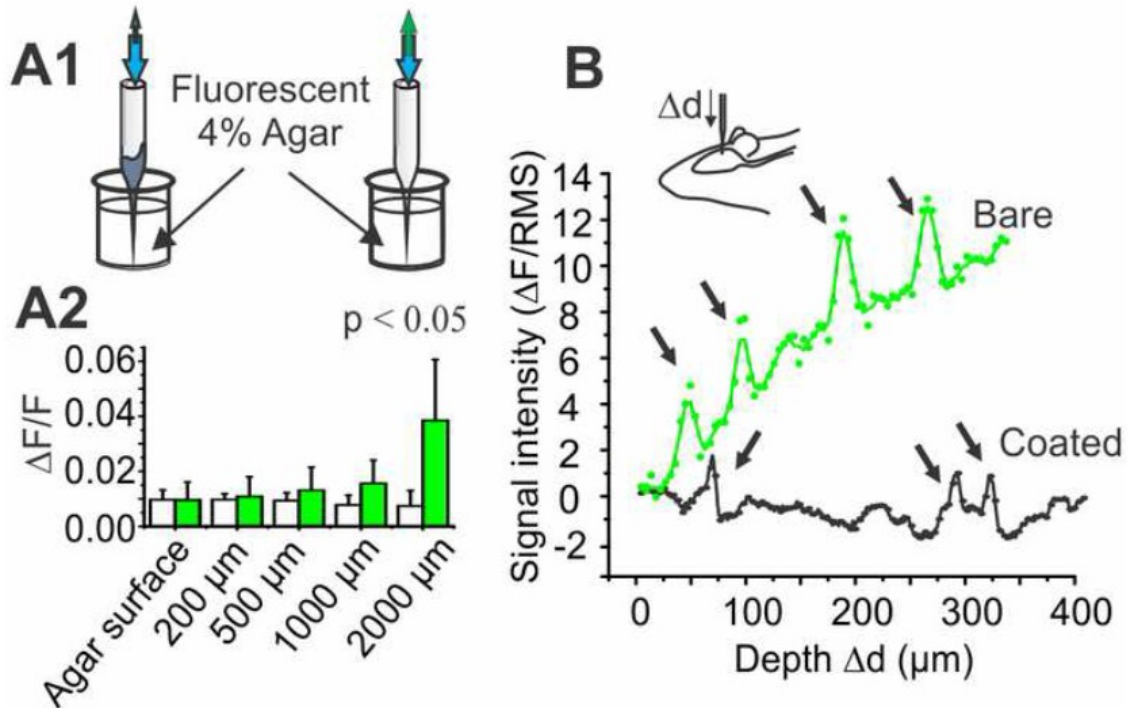


Figure 5: Impact of fluorescence collection through the microprobe walls.

A1) Schematics of the coated and uncoated microprobe descents into fluorescent agar. A2) Fluorescence measurements for different penetration depths into fluorescent agar for bare (green) and coated (white) probes ($n = 5$ probes; $1^\circ < \theta < 3^\circ$). B) Effect of the coating on the fluorescence DC level when a bare (green) or a coated (black) probe is lowered into cortex and thalamic issue. Arrows show location of fluorescent cells (inset: representation of the probe displacement).

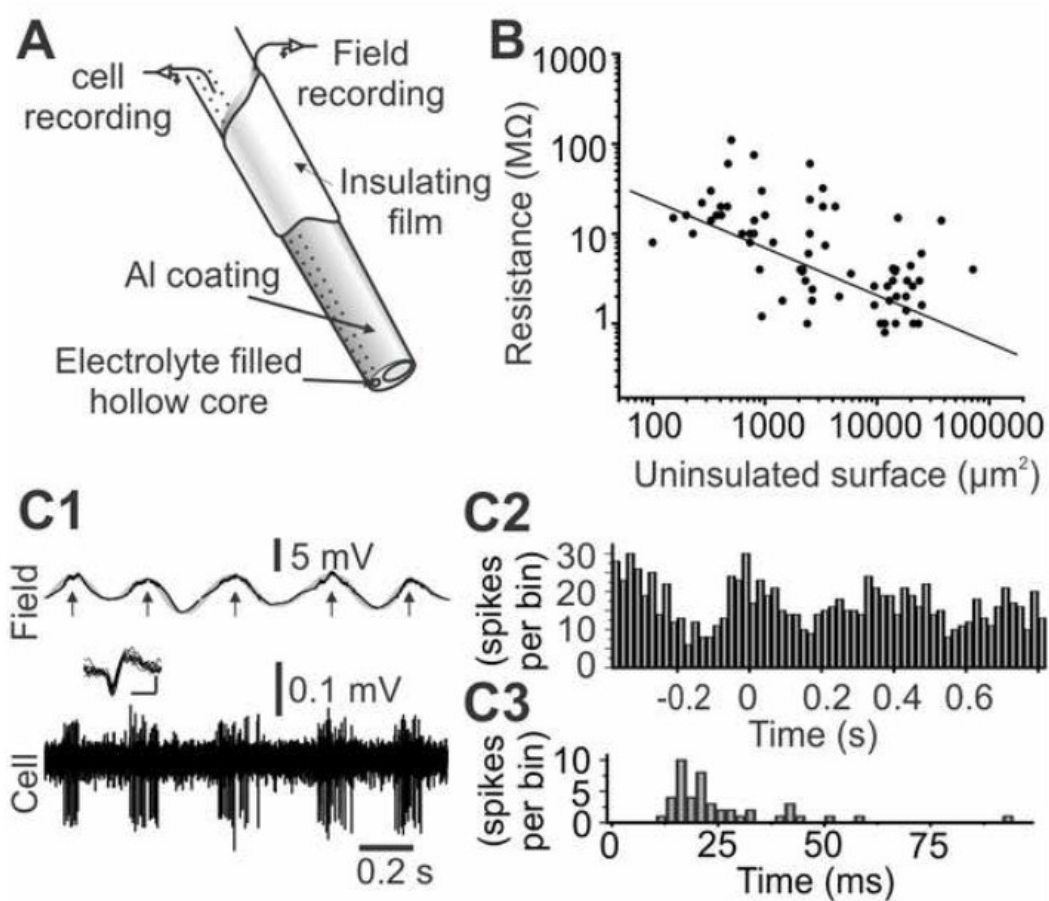


Figure 6: Coated glass microprobes enable dual electrical recordings.

A) Schematic representation of a multimodal microprobe tip. B) Measured resistance as a function of the uninsulated surface. C) Simultaneous recording of field potential oscillations and single unit achieved with the microprobes. Spikes were computed in a time histogram (C1). Inset: overlay of 10 successive spikes (vertical scale bar: 0.1 mV, horizontal scale bar: 1 ms) (C2) according to time of occurrence relative to field maxima (arrows in c1; n=15) and into an interspike interval histograms (C3).

Acknowledgment

We thank Prof. P. De Koninck and Dr. M.-E. Paquet for providing neuronal culture and plasmids for transfections and Prof. M. Beaulieu for the D1-D2 mice. We also thank K. Bachand, K. Vandal, F. Nault and M. Demers for expert technical assistance.

Chapitre 6

Discussion générale

Récapitulation

Cette thèse c'est concentrée sur l'étude du système nociceptif de la moelle épinière, plus précisément sur l'encodage que fait ce système des entrées nociceptives mécaniques provenant de la périphérie avant de les projeter au cerveau. Cette étude fondamentale du système physiologique apporte beaucoup à la compréhension du fonctionnement de ce mécanisme vital de protection. En plus de décrire le système physiologique, cette thèse a aussi beaucoup mis l'accent sur les changements survenant dans les douleurs neuropathiques, principalement sur les changements d'encodage. Les résultats de cette étude (chapitre 2) ont premièrement ouvert la porte à la validation de pharmacologies précises pour les douleurs neuropathiques (chapitre 3). Deuxièmement, cette thèse montre l'importance de la caractérisation d'une des classes fonctionnelles (les NS), la nécessité de pousser l'analyse à d'autres niveaux (morphologique, moléculaire, etc.) et le besoin de développer des outils pour y parvenir (chapitres 4 et 5). Les différents résultats de cette thèse ont démontré que :

- Les neurones nociceptifs spécifiques (NS) sont les seuls neurones de projection spinothalamique qui changent lors du développement des douleurs neuropathiques et leur seuil d'activation semble lié au seuil de retrait (comportemental) des animaux ;
- Au niveau des neurones de projection, les WDR ne changent pas et uniquement les NS sont altérés lors du développement des douleurs neuropathiques, ce qui valide la théorie des voies spécifiques et rend la théorie des patrons de décharge peu probable ;
- Une perte d'inhibition spinale réplique les mêmes changements que ceux survenant dans le développement des douleurs neuropathiques, supportant l'hypothèse de la désinhibition spinale comme cause des douleurs neuropathiques ;
- L'inhibition de la fonction d'extrusion des ions chlorures par le cotransporteur KCC2 réplique les mêmes changements que ceux survenant dans le développement des douleurs neuropathiques, qui sont les mêmes que ceux induits par la perte d'inhibition

spinale. Ceci apporte des arguments à l'hypothèse selon laquelle la désinhibition spinale est directement liée à l'homéostasie des ions chlorures et non pas à une action directe sur les canaux GABA_A et glycine ;

- L'utilisation d'un nouveau composé qui augmente l'extrusion des ions chlorures par le KCC2 (le CLP 257), montre que ce mécanisme d'action est une avenue thérapeutique prometteuse ;
- En utilisant le CLP 257, on est capable de ramener l'encodage d'un neurone nociceptif spécifique hypersensibilisé chez un animal en conditions de douleurs neuropathiques à des valeurs d'encodage normal ;
- Le développement de nouveaux outils nous permet maintenant d'enregistrer des neurones individuels marqués par fluorescence dans des structures profondes et un protocole de photoconversion permet de retrouver les neurones enregistrés à postériori.

Si l'on voulait transposer les divers résultats obtenus durant ma thèse dans un réseau neuronal simplifié nous obtiendrions le réseau suivant (Figure 30). Un réseau nociceptif connectant à la fois les WDR-STT et NS-STT et un réseau non nociceptif innervant uniquement les WDR-STT en condition physiologique mais possédant aussi une connexion on maintenu silencieuse par une inhibition constante connectant aux NS-STT.

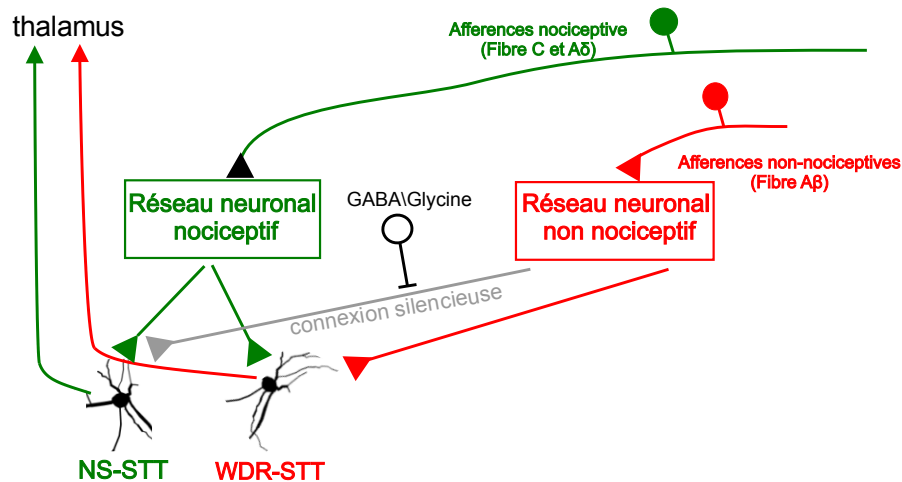


Figure 30 Réseau neuronal simplifié basé sur les résultats des travaux présentés dans cette thèse

Vers une identification des nociceptifs spécifiques

En lisant cette thèse, certains peuvent se demander pourquoi j'ai mis autant d'emphasis sur le développement technologique alors que l'orientation de ma thèse est clairement dirigée vers une compréhension de la douleur physiologique et pathologique. Bien sûr, la création d'outils et de technologies de recherche qui ont de nombreuses applications, comme ceux décrits dans les chapitres 4 et 5, est un objectif en soi. Je suis particulièrement content des avancées en recherche qui sont maintenant possibles grâce à ma contribution à la réalisation de ces outils.

Par contre, je dois aussi avouer que j'avais un objectif secondaire directement en lien avec le projet principal de ma thèse. Dans l'avancement de mon projet principal, j'ai découvert que l'encodage des NS est primordial dans les douleurs neuropathiques. Par contre, une de mes problématiques était que le seul moyen d'identifier ces neurones comme étant des NS est de les caractériser par électrophysiologie. Je devais trouver un moyen d'enregistrer et de caractériser les neurones par électrophysiologie et de retrouver par la suite ces mêmes neurones pour pouvoir faire d'autres types d'analyses (décrites plus loin).

Certains pourraient se demander pourquoi je n'ai pas simplement effectué des marquages juxtacellulaires sur les neurones enregistrés. J'ai fait plusieurs tentatives de marquage juxtacellulaire (avec environ 50 rats), mais expérimentalement, le marquage juxtacellulaire dans la moelle épinière a un taux de réussite extrêmement faible, probablement à cause des mouvements respiratoires de l'animal. Malgré beaucoup d'efforts (respirateur artificiel, injection de bloqueur neuromusculaire, pneumothorax, suspension de l'animal), il m'a été impossible de bloquer tous les mouvements respiratoires chez l'animal vivant. Le marquage juxtacellulaire nécessite d'être situé très près du neurone et de maintenir cette distance durant tout le protocole de remplissage, ce qui, pour ma part, s'est avéré plutôt infructueux (2 cellules partielles en 50 animaux).

Comme le marquage juxtacellulaire ne fonctionnait pas bien pour mes neurones spinothalamiques et que l'imagerie *in vivo* se limite aux structures superficielles (Grienberger and Konnerth, 2012) je me devais de trouver un autre moyen d'enregistrer et de marquer des cellules individuelles dans les couches profondes de la moelle épinière.

Pour ce faire, j'ai donc participé activement aux projets de Yoan Lechasseur et Suzie Dufour (chapitres 4 et 5). Les outils que nous avons développés m'ont permis premièrement d'enregistrer des neurones individuels identifiés, par marqueur fluorescent par marquage rétrograde en provenance du thalamus (chapitre 4). En deuxième lieu, j'ai développé un protocole utilisant des constructions virales comme le MeOS2, qui me permettait de photoconvertir un fluorophore vert à rouge (chapitre 5, figure 3) et donc de retrouver le neurone enregistré (rouge) parmi une multitude de neurones STT (verts).

Un des problèmes rencontrés avec l'utilisation de MeOS2 dans une construction virale rétrograde (adénovirus), est que l'intensité de fluorescence de base des neurones infectés par MeOS2 est faible. Pour comparaison, entre nos mains, nous estimons que le marquage des neurones spinothalamique par MeOS2 est d'une intensité de fluorescence d'au moins 4 à 5 fois moins forte qu'un marquage rétrograde d'adénovirus encodant la GFP. La protéine MeOS étant à la base moins fluorescente que celle de la GFP rend la fluorescence des neurones STT très faible. Ce problème est majeur lorsqu'on cherche des neurones peu

nombreux, comme les STT, car le facteur limitant dans ces expériences électrophysiologiques est de trouver les neurones de projection STT. Donc, plus ces neurones seront faiblement marqués plus il sera difficile de les trouver.

À l'aide d'informations privilégiées que nous a fait parvenir un collaborateur, professeur Charles Lin, de la Harvard Medical School, nous avons une solution possible pour contourner ce problème d'intensité de fluorescence. Grâce à ce collaborateur, nous avons appris que les marqueurs inorganiques classiques DiR, DiD, DiI, DiO (*Figure 31*), qui sont très efficaces pour le marquage rétrograde, qui ont des intensités de fluorescence très élevée et qui sont couramment utilisés dans notre laboratoire (LeChasseur et al., 2011), ont aussi une autre utilisation insoupçonnée. Ces marqueurs sont photoconvertibles et ce qui avait été attribué à de la photoinstabilité «photobleaching» de la fluorescence était en fait dû en partie à une photoconversion vers une configuration moléculaire émettant dans une longueur d'onde plus faible. Cela signifie que lorsqu'on excite ces fluorophores pour en observer l'émission, on photoconvertit en même temps le colorant vers une configuration moléculaire émettant dans une longueur d'onde plus faible. Les différents marqueurs ayant cette propriété sont les suivants : DiR, DiD, et DiI. De plus, il y a photoconversion du spectre de DiR vers celui de DiD, du spectre de DiD vers celui de DiI et du spectre de DiI vers celui de DiO (*Figure 31*).

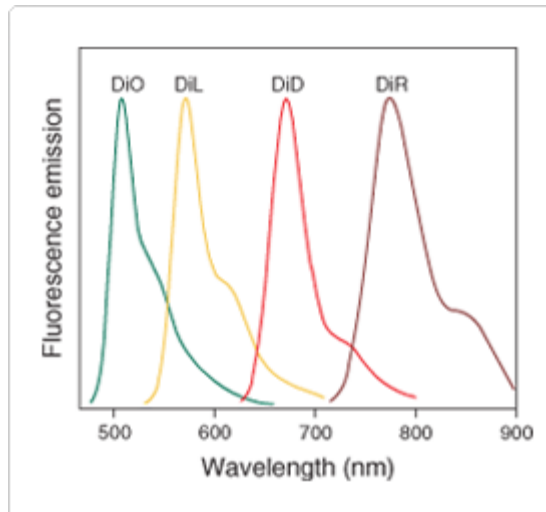
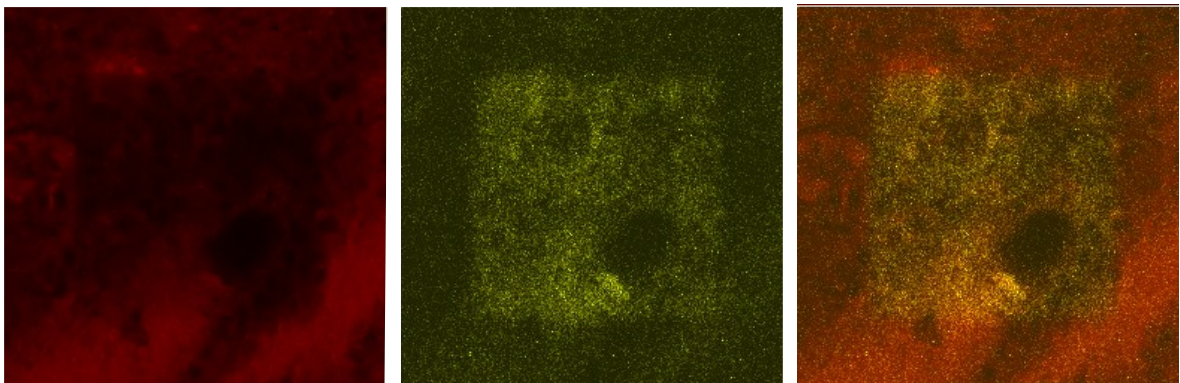


Figure 31 : Spectre d'émission des différents marqueurs inorganique classique (invitrogen).

Nous avons ensuite tenté de voir si ces marqueurs inorganiques pouvaient remplacer le MeOS. Nous avons donc fait des marquages au niveau du thalamus avec le DiD pour marquer les neurones STT. En utilisant un microscope confocal, nous avons tenté de voir si la photoconversion des marqueurs inorganiques était possible pour identification neuronale dans nos conditions expérimentales. Les résultats des tests préliminaires sont surprenants ; en utilisant des intensités d'excitation standard, nous sommes capables de photoconvertir le DiD en DiI, mais uniquement au niveau des sites d'injections du marqueur ; pas chez les neurones individuels marqués par transport rétrograde loin du site d'injection (Figure 32, Figure 33).



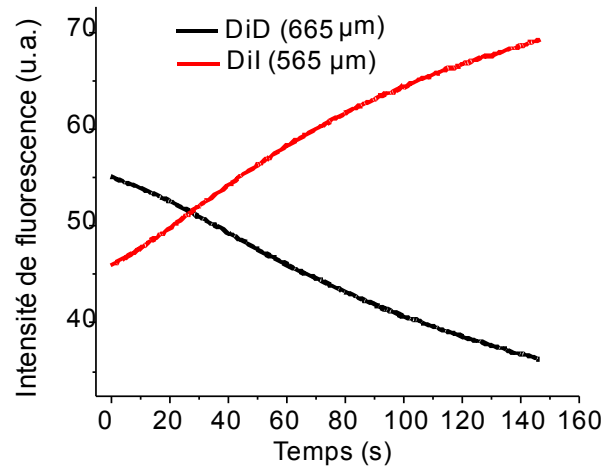


Figure 32 : Effet de la photoconversion de DiD au niveau du site d'injection.

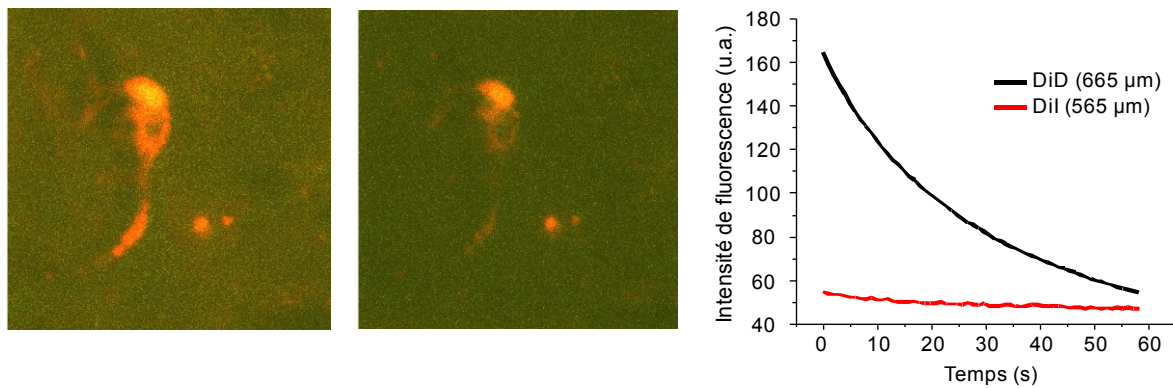


Figure 33 : Effet de la photoconversion de DiD au niveau de neurones individuels.

Les hypothèses principales sur lesquelles nous avons travaillé étaient les suivantes : premièrement, il serait possible que contrairement à la protéine MeOS, la fixation des tissus inhibe la photoconversion, et que celle-ci soit tout de même possible au site d'injection puisque la concentration du marqueur est très élevée. Deuxièmement, il serait possible que la compartimentalisation du marqueur soit différente entre les neurones du

site d'injection, avec un marquage direct des neurones, et les neurones marqués par migration rétrograde, influencés par le transport du marqueur vers le corps cellulaire. Cette différence de compartimentalisation pourrait même expliquer les différences visibles de marquage entre un neurone marqué directement, provoquant un marquage uniforme, et un neurone marqué de manière rétrograde, générant un marquage punctiforme. Si le marquage punctiforme représente un agglomérat de marqueurs inorganiques dans un endosome avec un pH différent du reste de la cellule, cette variation de pH pourrait expliquer l'absence de photoconversion.

Bien sûr, ces hypothèses devaient être confirmées avant de rejeter la possibilité de l'utilisation de ces marqueurs pour la photoconversion. Lorsque nous avons fait les différents contrôles nécessaires à la validation de ces hypothèses, nous avons découvert que la cause du problème était tout autre. La solution pour la photoconversion de cellule unique est l'intensité d'excitation. Alors que moins de 0.5 mW est amplement suffisant pour observer le fluorophore, une intensité d'excitation élevée (environ 10 fois plus élevée) de courte durée est nécessaire pour la photoconversion. Le fait que le site d'injection ne nécessite pas autant de lumière pour photoconvertir est sûrement en lien avec la concentration extrême de fluorophore dans cette zone.

La photoconversion nécessitant une plus forte intensité lumineuse comparativement à celle nécessaire pour identifier le fluorophore, cela diminue grandement les chances de photoconversion non spécifique. Par analogie avec la technique de marquage juxtacellulaire, la photoconversion nécessitera un protocole spécifique. Lorsque j'utiliserai la microsonde et que je ferai plusieurs descentes dans la moelle pour chercher des neurones, je ne photoconvertirai pas tous les neurones rencontrés dans chacune des descentes. Ce sera seulement une fois le neurone d'intérêt complètement caractérisé que j'enverrai dans la sonde une intensité d'excitation suffisante pour provoquer la photoconversion de ce neurone précis.

Tel qu'expliqué en conclusion du chapitre 2, l'importance de cette caractérisation plus poussée des NS vient du fait que si le seuil des NS est lié au seuil de perception

douloureuse, normaliser le seuil de ces NS de projection est une cible pharmaceutique extrêmement prometteuse autant comme analgésique que comme traitement de douleur pathologique. Le problème est que pour le développement pharmaceutique, on doit trouver une cible spécifique des NS, qui nous permettrait de normaliser leur réponse. Pour trouver cette cible, les analyses électrophysiologiques *in vivo* sont très limitées. C'est pourquoi, en parallèle de mes travaux principaux, j'ai travaillé sur des projets et collaborations qui pouvaient m'apporter certaines solutions.

Je désirais faire une analyse morphométrique des neurones STT et déterminer si les NS et WDR ont une morphologie typique. Si des différences morphologiques évidentes existent entre ces deux classes, cette information me serait très utile pour les retrouver sans passer par l'électrophysiologie *in vivo*.

Par contre, même avec les outils décrits aux chapitres 4 et 5, la photoconversion de neurones individuels ne générera qu'un très faible nombre de neurones analysables. Malheureusement, une analyse morphométrique robuste nécessite un nombre important de neurones analysables. Pour résoudre ce problème, j'ai monté un projet à la fois intéressant pour des stagiaires d'été et utile pour mon projet. Des étudiantes stagiaires se sont concentrées à monter une banque de reconstruction de neurones STT marqués par des adénovirus qui encodent la protéine GFP. L'idée derrière cette banque est qu'avec un nombre suffisant de neurones et leurs caractéristiques morphométriques, il me sera possible de séparer les STT en groupes morphologiques. À l'aide de cette préclassification morphologique, je pourrai, malgré un faible rendement en nombre de neurones obtenus par photoconversion, tenter d'associer les NS et WDR enregistrés avec ces groupes morphologiques prédéfinis. Pour le moment, suite à plusieurs obstacles, cette banque s'élève à environ 40 neurones et aucun groupe bien défini n'est encore apparu.

Une autre avenue pour laquelle j'ai entamé les démarches a engendré une collaboration avec Dr Martin Lévesque. Il s'agissait de caractériser les ARNm qui seraient spécifiques aux NS. Ce projet est très complexe, mais il a le potentiel d'être très profitable. L'idée est

d'utiliser les outils décrits aux chapitres 4 et 5 pour obtenir des neurones identifiés individuellement par électrophysiologie, mais en utilisant cette fois un système de microdissection laser et de récupérer l'intérieur des cellules NS et WDR. Avec tout le matériel intracellulaire de ces cellules, il serait possible de comparer les ARNm des NS-STT et des WDR-STT entre eux et de les comparer avec les cellules avoisinantes non identifiées. Ce projet peut paraître ambitieux, mais avec des systèmes d'amplification appropriés, un nombre de cellules aussi faible que 5 à 10 par groupe apparaît suffisant pour arriver à nos fins. Nous en sommes présentement aux tests préliminaires afin de déterminer la limite inférieure en nombre de cellules nécessaires pour obtenir des résultats utilisables. Ce projet serait particulièrement intéressant pour l'identification d'une cible pharmaceutique potentielle pour normaliser les propriétés des neurones NS.

Questions qui restent en suspens

Dans cette section, je me concentrerai sur la mise en perspective de mes données en me concentrant sur les questions qui sont restées sans réponse, ainsi qu'à celles que les résultats de ma thèse ont soulevées.

Qu'en est-il de l'hyperalgésie ?

Dans le chapitre 2, nous avons démontré un lien entre le seuil d'activation des NS et le seuil comportemental des animaux en condition physiologique, et entre les NS altérés (NEW) et le nouveau seuil comportemental chez des animaux neuropathiques. Ces résultats semblent lier le seuil de réponse des NS avec le phénomène d'allodynie. C'est cohérent, car les NS semblent faire partie d'un réseau conçu uniquement pour percevoir les stimuli douloureux. Chez des animaux neuropathiques, les NS réagissent à des stimulations d'intensité non douloureuse, tel que décrit dans le chapitre 2. Il est donc logique de penser que le cerveau de ces animaux interprètera ces stimulations de faible intensité comme de la douleur.

Qu'en est-il de l'hyperalgésie? Comment expliquer une augmentation de l'intensité de réponse aux stimulations douloureuses? Les partisans de la théorie des motifs de décharge

peuvent facilement expliquer l'hyperalgésie par une augmentation de la fréquence de décharge chez les WDR dans les douleurs neuropathiques combinée à une intégration de l'intensité douloureuse par le cerveau en fonction de la fréquence de décharge des WDR. Cette augmentation de fréquence des WDR a été démontrée (Leem et al., 1995;Hains et al., 2002;Hains et al., 2003), mais ces études ont été faites uniquement sur des populations de neurones non identifiées et, lorsqu'on observe les neurones de projection au thalamus (chapitre 2), on voit que les WDR de projection (STT) ne subissent aucune augmentation de leur fréquence de décharge dans le développement des douleurs neuropathiques. Si l'augmentation de fréquence des WDR reste au niveau spinal et n'est pas transférée au cerveau via les neurones de projection, comment expliquer l'hyperalgésie ? Plusieurs possibilités s'offrent à nous.

Il est possible qu'une sous-population des neurones WDR-nonSTT, qui subissent une augmentation de fréquence de décharge dans les douleurs neuropathiques, soit des neurones projetant dans une autre région du cerveau. Cette hypothèse est logique et simple, mais s'imbrique plus difficilement avec les données de la littérature qui décrivent les WDR de projection (Chung et al., 1986) comme étant principalement des STT. Il est tout de même possible que cette hypothèse soit confirmée avec l'amélioration de nos connaissances sur les voies de projection.

L'hyperalgésie pourrait aussi s'expliquer par une augmentation du champ récepteur des neurones de projection (NS ou WDR). Plusieurs groupes ont démontré une augmentation de la taille du champ récepteur (encore une fois, souvent chez des neurones non identifiés) (Hains et al., 2002;Hains et al., 2003;Sorkin et al., 1998;Sorkin et al., 1998;Tabo et al., 1999) suite au développement des douleurs neuropathiques. Le système nociceptif semble être un modèle de convergence de l'information, ce qui veut donc dire qu'au niveau des sites de projection, par exemple au thalamus, les neurones présents reçoivent l'information provenant de plusieurs neurones de projection. Si la taille du champ récepteur auquel réagit chacun des neurones de projection augmente, cela signifie donc que les neurones de

convergence au cerveau reçoivent plus d'entrées pour le même stimulus. Cette augmentation pourrait expliquer l'hyperalgésie.

Un dernier point que j'aimerais apporter à propos de l'hyperalgésie est que malgré la quantité importante de publications décrivant un phénomène d'hyperalgésie mécanique ((Araldi et al., 2013; Cuellar et al., 2004; Dougherty and Willis, 1992b) et beaucoup d'autres), presque aucune des techniques utilisées ne quantifie réellement l'hyperalgésie. Par définition, l'hyperalgésie est une perception douloureuse accrue face à un stimulus normalement douloureux. Ce qui veut donc dire que pour vraiment quantifier ce phénomène, on se doit de quantifier uniquement l'intensité de réponse et de s'affranchir du seuil de réponse. Malheureusement, la très grande majorité des techniques de mesure d'hyperalgésie ne sépare pas les deux. La technique la plus courante consiste à utiliser un stimulus au seuil de douleur et à quantifier sur 5 essais le nombre de réactions de l'animal avant et après un traitement (Wu et al., 2012). Dans ces tests, on considère un animal comme hyperalgésique s'il réagit à 3 stimulations sur 5 en condition contrôle et qu'après un traitement, il réagit aux 5 stimulations. Personnellement, je trouve cette technique incohérente, car il ne s'agit pas d'une caractérisation d'intensité, mais bien d'un nombre de fois que l'animal a atteint son seuil de douleur (allodynie). Le problème est qu'il est extrêmement difficile de quantifier une intensité douloureuse, étant donné que les animaux ne parlent pas. Certains tests sont basés sur les réactions faciales (Langford et al., 2010) ou la vocalisation (Attal et al., 1991; Da Silva et al., 2010). Dans le cas de la vocalisation, la majorité des tests utilise le seuil de vocalise plutôt qu'une quantification d'intensité (Attal et al., 1991). À cause de tous ces éléments, je considère que très peu d'études ont vraiment étudié l'hyperalgésie mécanique.

Si on considère, comme moi, que les méthodes de quantification d'hyperalgésie mécanique sont déficientes, cela veut donc dire que nous n'avons pas d'information sur l'intensité de la douleur, ni même sur la présence d'hyperalgésie mécanique dans nos modèles animaux de douleurs neuropathiques. En projet parallèle, j'ai tenté de créer un protocole qui quantifierait l'intensité d'une réponse douloureuse en observant certains comportements des animaux lors de stimulations douloureuses. Comme expliqué précédemment, il est

important de s'affranchir du seuil de réponse pour quantifier l'hyperalgésie ; je cherchais donc un comportement quantifiable qui génère une réponse variant en intensité selon la force de la douleur ressentie. Pour essayer de trouver ce comportement quantifiable, j'ai filmé plusieurs rats dans des hamacs et j'ai quantifié plusieurs de leurs comportements lors de l'application de différentes intensités de stimulation. Les différents comportements que j'ai quantifiés sont les suivants : le nombre de vocalisations audibles, le nombre de mouvements de tête, le nombre de mouvements de la patte contralatérale, le nombre de mouvements des pattes avant et le nombre de mouvements de queue. Contrairement à mes attentes, tous les paramètres, y compris la vocalisation pour laquelle j'avais beaucoup d'espoir, ne corrélaient pas avec l'intensité de stimulation, à l'exception du nombre de mouvements de tête. Ces expériences étaient des tests préliminaires pour voir s'il valait la peine d'étudier le problème plus en profondeur (

Figure 34). En faisant ces tests préliminaires, nous avons identifié une cible comportementale intéressante pour la quantification d'intensité de perception douloureuse.

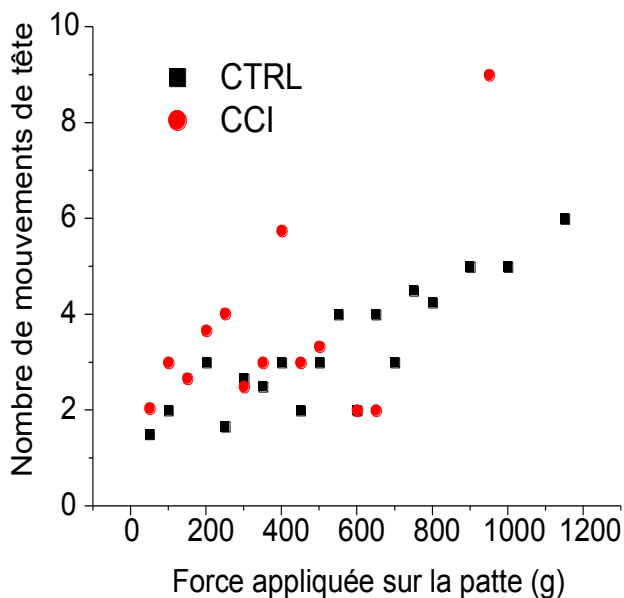


Figure 34 : Effet de la pression appliquée sur le nombre de mouvements de tête.

Toutefois, il ne s'agit que d'une analyse préliminaire et les procédures expérimentales doivent être améliorées pour avoir une étude robuste. Dans ces expériences, les stimulations de 5 secondes ont été faites manuellement avec un système nommé Randall-Settillo Paw Pressure (UgoBasile) qui permet de voir, avec un moniteur numérique, la force appliquée avec une forme de pince. Ce système ne permet pas de générer lui-même une force et ne fait que la quantifier, ce qui veut donc dire que l'expérimentateur doit tenter, le plus précisément possible, d'appliquer une pression stable durant 5 secondes. Cette technique génère donc une variabilité expérimentale non négligeable. Les différents mouvements de tête et autres comportements sont quantifiés suite au visionnement des vidéos enregistrés.

Toutes ces étapes non automatisées sont autant de sources de variabilité ou de biais qui peuvent influencer les résultats. Pour contrer ce problème, j'ai commandé la modification du stimulateur mécanique (Paw Pressure) pour pouvoir lui envoyer une commande analogique, qui me permettrait d'appliquer une pression précise et stable durant un temps constant d'une expérimentation à l'autre. En plus, pour m'affranchir de l'analyse visuelle pour quantifier les mouvements de tête, j'ai acheté et installé des gyroscopes électroniques (les mêmes que ceux que l'on retrouve dans les tablettes électroniques et les téléphones cellulaires) sur la tête des animaux. Ces gyroscopes me permettent de quantifier, en temps réel, à l'aide d'une sortie analogique les mouvements de tête dans les trois axes. Par contre, cette automatisation n'est pas encore complétée et aucun résultat n'est encore disponible.

Quelle est la fonction des WDR ?

Dans le chapitre 2, nos résultats associent le seuil de réponse des NS avec le seuil comportemental de perception de douleur, suggérant un rôle physiologique de perception de seuil de douleur aux NS. Qu'en est-il du rôle des WDR ? Cette question reste entière et doit être investiguée plus loin. Est-ce que cette voie, qui est en lien direct avec l'intensité de stimulation (Chapitre 2, figure 2b), sert seulement à la perception tactile non douloureuse ? Si c'est le cas, pourquoi encode-t-elle aussi les intensités de stimulation douloureuse ? Est-ce que cette voie sert à apporter des informations sur le caractère et l'intensité du stimulus ? Malgré le fait que l'on étudie ces neurones depuis très longtemps (Willis et al., 1974), leur fonction reste encore inconnue et plusieurs recherches devront encore être faites pour comprendre leur fonction.

Qu'en est-il de la lamina I ?

Nous avons mentionné dans le chapitre 2 qu'au niveau des couches profondes (lamina IV,V,VI), seuls les neurones de projection NS sont affectés dans le modèle de lésion de nerf. On sait que la lamina I est composée presque exclusivement de neurones NS, que certains d'entre eux projettent aussi au thalamus et que d'autres projettent au parabrachial (Craig and Burton, 1981; Han et al., 1998). Est-ce que les NS de la lamina I réagissent à la lésion de nerf comme ceux des couches profondes, c'est-à-dire par une diminution du seuil d'activation en conservant leur pente et leur fréquence de décharge ? Les données d'un article antérieur de notre laboratoire pourraient suggérer une réponse similaire (Keller et al., 2007). Dans cet article, on décrit une augmentation importante des neurones WDR au niveau de la lamina I suite à la lésion de nerf. Contrairement aux travaux décrits dans le chapitre 2 de cette thèse, dans lequel j'ai utilisé un stimulateur mécanique en rétroaction de force qui me permettait d'appliquer des pressions précises et stables, ces travaux ont classifié les NS et WDR en fonction de stimuli qualitatifs (frôlement d'un pinceau, pression et pincement). Le passage de NS vers WDR classifié qualitativement pourrait très bien être un passage de NS vers NEW classifié quantitativement, comme je l'ai démontré

pour les couches profondes. Il serait intéressant de vérifier si tous les NS de la moelle réagissent de la même manière dans les douleurs neuropathiques, surtout si le CLP 257 restaure un encodage normal à tous les niveaux de la moelle, devenant ainsi une drogue efficace pour tout NS et non pas seulement active sur une sous-population de NS.

Est-ce que le système thermique fonctionne comme le système mécanique ?

L'ensemble des expériences qui ont été faites dans cette thèse l'ont été avec des stimulations mécaniques. Il serait pertinent de déterminer si le système encode l'information de la même manière, peu importe le type d'encodage nociceptif, et si les changements qui surviennent suite au développement des douleurs neuropathiques sont les mêmes au niveau thermique que mécanique. Il est difficile de prédire si le fonctionnement du système nociceptif thermique est pareil ou même semblable au système mécanique. D'une part, la majorité des modèles de douleurs neuropathiques qui induisent une allodynie mécanique induisent en même temps une allodynie thermique, ce qui suggère un possible mécanisme commun aux deux formes d'hypersensibilités (Terayama et al., 2008). D'une autre part, ce n'est pas toutes les interventions qui induisent une combinaison de ces deux types d'hypersensibilités (Manering et al., 2013). Il y a aussi une subtilité de plus au niveau du système thermique nociceptif, la possibilité d'avoir une douleur thermique au chaud, mais aussi une perception douloureuse au froid. Ces deux types de douleur thermique semblent avoir des différences et ne sont pas véhiculés par les mêmes types de neurones (Andrew, 2009). Ce qui veut donc dire que, selon moi, on ne peut utiliser mes résultats pour en déduire le fonctionnement du système thermique, mais il est possible que certains éléments découverts soient semblables.

De quelle façon les différentes voies de projection participent-elles à la douleur ?

Au cours des dernières années, les études qui se sont penchées sur les neurones de projection (Craig, 2004b; Andrew and Craig, 2002; Craig, 2004a; Keller et al., 2007) se sont principalement concentrées sur l'étude de deux voies de projection : les voies spinothalamiques et spinoparabrachiales. Malgré le nombre d'études sur ces voies de

projection, on ne connaît toujours pas avec certitude l'implication de ces voies dans les différentes facettes de la perception douloureuse. Certains ont avancé des hypothèses décrivant la voie spinoparabrachiale comme étant liée au côté émotionnel de la douleur, alors que la voie spinothalamique serait liée au côté sensoriel discriminatif (Chung et al., 1986; Guirimand and LeBars, 1996; Willis and Westlund, 1997; Bester et al., 2000). Le test ultime pour vérifier la participation de chacune des voies serait soit leur ablation, soit leur complète inhibition. Certains médecins ont tenté de sectionner le faisceau spinothalamique chez des patients atteints de douleurs pathologiques extrêmes et ont montré une disparition complète, bien que parfois transitoire, de la douleur (Cetas et al., 2008; Meglio and Cioni, 1981). Par contre, ces expériences cliniques n'ont été faites que très rarement et de manière peu standardisée.

Déterminer la participation des différentes voies de projection dans la perception de la douleur est selon moi à la base de la compréhension du système douloureux. Pour y parvenir, j'ai commandé la création d'un adénovirus qui encode le récepteur Allatostatine (Tan et al., 2006a). Ce récepteur est sensible à un agoniste uniquement présent chez les insectes et l'intégration agoniste/récepteur provoque une inhibition temporaire (environ 30 min suite à une injection intraveineuse) via l'activation d'une protéine G couplée à un canal générant un courant potassique rectifiant entrant (GIRK) (Tan et al., 2006a). L'utilisation du vecteur viral adénovirus me permet de faire migrer de manière rétrograde le virus et d'infecter sélectivement les neurones de la moelle épinière qui projettent aux différentes régions du cerveau où l'injection virale a été faite. De cette manière, je peux avoir, dans différents rats, les neurones spinothalamiques ou spinoparabrachiaux infectés par le virus et donc présentant des récepteurs allatostatines à leur membrane. Grâce à ces récepteurs, je peux inhiber l'ensemble des neurones d'une voie de projection par une injection intrathécale de l'agoniste allatostatine (ou du moins la fraction infectée) et évaluer au niveau comportemental la participation de cette voie à la douleur.

Les résultats obtenus lorsqu'on inhibe les neurones STT sont extrêmement encourageants. Avant d'analyser ces résultats, un point important à noter est que le test comportemental

couramment utilisé pour établir le seuil de retrait de la patte (Von Frey) est conçu et principalement utilisé pour observer une hypersensibilité et non une analgésie. Ceci implique que la plage de seuil pour laquelle ce test est le plus fiable est entre un seuil contrôle (environ 17g) et les seuils d'hypersensibilité extrême (moins de 1 g). Certains groupes utilisent aussi les tests Von Frey pour observer des effets purement analgésiques, mais ceci est, selon moi, une grave erreur, principalement pour deux raisons. La première est que lorsqu'on atteint des intensités de stimulation élevée, la force appliquée dépasse le poids de la patte elle-même et soulève la patte. La force perd donc en précision. La deuxième est la précision de la mesure en condition analgésique, car entre 15 et 100g de force, il n'y a que 2 fils différents caractérisant toute cette plage de force. Notre l'hypothèse de base était que l'inhibition des STT par l'allatostatine induirait une analgésie. Cette analgésie ferait donc passer leur seuil au-dessus du 20 g, une région peu fiable pour les raisons décrites plus haut. Pour contrer ce problème, nous avons induit une hypersensibilité passagère en injectant de la capsaïcine sous-cutanée au niveau de la patte. Cette technique courante d'hypersensibilisation périphérique (Zhu et al., 2012; Wang et al., 2011) permet d'investiguer de manière plus robuste l'effet analgésique généré par l'allatostatine (*Figure 35*).

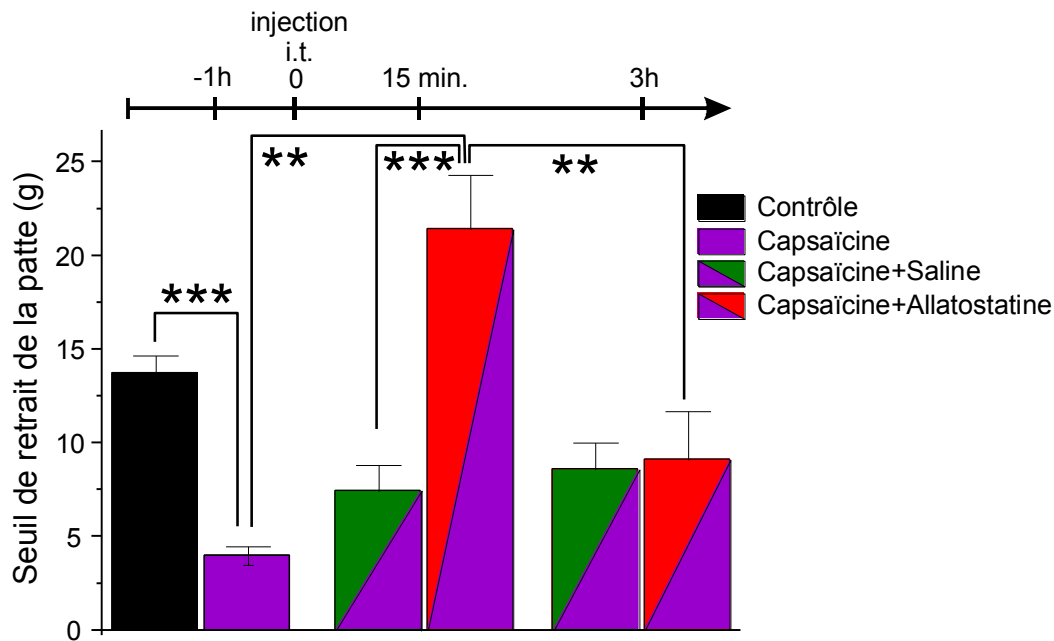


Figure 35 : Effet de l'inhibition des neurones STT par l'allatostatine.

Dans cette figure, nous voyons en premier lieu que la capsaïcine induit, comme prévu, une hypersensibilité mécanique qui se résorbe lentement. On remarque aussi que l'injection intrathécale d'allatostatine chez des animaux avec des neurones STT encodant les récepteurs inhibiteurs décrits plus haut, provoque une importante analgésie comparativement à l'injection de saline. Cette analgésie est temporaire, car trois heures après l'injection, celle-ci disparaît et le seuil de retrait revient à des valeurs comparables aux conditions salines, ce qui est conforme avec la littérature (Tan et al., 2006b). Cette expérience montre donc la participation importante des STT à la perception du seuil de douleur.

À quel niveau du réseau le CLP257 agit-il ?

Les résultats que nous apportons aux chapitres 2 et 3 démontrent que l'effet du CLP 257 sur les neurones de spinothalamique. Ces neurones de projection sont les derniers neurones par lesquelles l'information nociceptive passe avant d'être projetée aux aires supérieures. Ce qui veut donc dire que peut importe le site d'action du CLP 257 sur le réseau neuronale

nociceptif de la moelle son action ce fera sentir sur les la réponse des neurones de projection. Une question importante est donc de savoir à quel niveau l'action sur l'homéostasie des ions chlorures se produit : directement et uniquement sur les neurones de projection, sur tous les neurones du réseau ou plus spécifiquement sur certains interneurons liés à certaines voies dans la moelle ? La possibilité d'une action sur tous les neurones de la moelle est assez improbable, car si c'était le cas, les WDR-STT seraient aussi modulés par l'antagoniste (VU 0240551) ou l'activateur (CLP 257) du KCC2 (chapitre 2 Fig. 5). Pour répondre à cette question, plusieurs tests d'immunohistochimie sont présentement en cours afin de tenter de voir sur quels neurones se situe le KCC2 et à quel niveau les taux de KCC2 chutent dans le développement des douleurs neuropathiques.

Potentiel thérapeutique important

Un des buts de la recherche fondamentale dans le domaine de la santé est l'amélioration des traitements chez l'homme. Ces études peuvent être la première étape d'une très longue série qui mènera ultimement à une découverte applicable pour la thérapeutique humaine. Pendant mon doctorat, j'ai eu la chance de travailler sur une des dernières étapes du développement préclinique d'un traitement pour les douleurs neuropathiques.

Nouvelle classe d'analgésique

Ces dernières années, le développement pharmacologique des anesthésiques s'est concentré soit sur la modulation d'analgésiques déjà existants (faute de nouvelles cibles viables), soit sur des composés déjà utilisés pour d'autres maladies, ce qui implique souvent des effets secondaires importants lors d'un traitement uniquement pour la douleur (Lyrica/Neurontin, Duloxetine/Cymbalta). Par exemple, l'utilisation d'opiacés sous forme de timbres à libération transdermale lente (Fentanyl) ou le développement d'opiacés plus puissants (Oxycodone) ont été les parmi principales avancées récentes dans le domaine du traitement de la douleur. Un des aspects particulièrement enthousiasmants du CLP 257 est qu'il est le premier d'une nouvelle classe médicament (nouveau mécanisme d'action) et qu'il représente donc une toute nouvelle approche.

Fenêtre thérapeutique théoriquement sécuritaire

Lorsqu'on utilise des simulations numériques du comportement des neurones (Doyon et al., 2011), il nous est possible d'évaluer théoriquement l'effet de la modulation de plusieurs facteurs sur les échanges ioniques. En analysant l'effet d'une modulation de l'activité du KCC2, on remarque que lorsqu'on diminue sa capacité d'extrusion, même faiblement, l'effet général de l'inhibition médiée par des échanges d'ions chlorures est grandement affecté. À l'opposé, rétablir l'extrusion des ions chlorures par l'application de CLP 257 ramène l'inhibition médiée par ces ions à des niveaux normaux. Ce qui est intéressant pour l'analyse de la fenêtre thérapeutique est que, selon les modèles mathématiques, l'augmentation de l'extrusion des ions chlorures dans un système normal n'aurait qu'un très faible effet sur l'inhibition GABA_A et glycinergique (Doyon et al., 2011). Cela veut donc dire qu'en tant que cible pharmaceutique, un modulateur du KCC2 est intéressant à plusieurs niveaux.

Premièrement, puisqu'amplifier l'extrusion du KCC2 au-dessus des valeurs physiologiques n'influence que peu l'inhibition, les chances de générer des effets secondaires majeurs ou des surdoses mortelles sont faibles.

Deuxièmement, une fenêtre thérapeutique large est particulièrement intéressante pour les compagnies pharmaceutiques à cause des possibilités de véhicule. Le véhicule idéal pour la commercialisation d'un médicament est le comprimé par voie d'administration *per os*, mais le problème de cette voie est que la concentration disponible du médicament varie de manière importante entre les doses, contrairement par exemple à un timbre dermique à libération lente. Quand une dose sanguine plus élevée que la dose thérapeutique n'est pas délétère, on parle de fenêtre thérapeutique sécuritaire. Cela permet justement l'utilisation du comprimé oral.

Un autre point qui pourrait aussi être à l'avantage d'une modulation du KCC2 concerne la dépendance. Le problème avec la principale classe d'analgésiques, les opioïdes, c'est qu'une dose supérieure à la dose analgésique requise provoque un effet euphorisant. La

recherche de cet état d'euphorie peut mener à des problèmes de dépendance grave. Encore une fois, l'absence (ou la faiblesse) des effets secondaires prédite par le modèle d'une suractivation de KCC2 sur l'inhibition implique que la prise d'une dose supérieure à la dose nécessaire ne devrait théoriquement pas provoquer d'effet euphorisant.

Bien sûr, ces hypothèses sont spéculatives et basées seulement sur un modèle mathématique et toutes les phases cliniques devront être faites pour confirmer ces hypothèses, car nous ne connaissons pas l'ensemble des mécanismes sur lesquels le KCC2 pourrait agir.

Potentiel thérapeutique pour d'autres maladies

Au cours des dernières années, en plus du développement des douleurs pathologiques (Tsuda et al., 2003; Coull et al., 2003; Coull et al., 2005), un déséquilibre dans l'homéostasie des ions chlorures a été remarqué dans plusieurs autres pathologies. Cette liste de pathologies est très variée : l'épilepsie (Kohling, 2002), le stress (Hewitt et al., 2009), la spasticité (Boulenguez et al., 2010), la schizophrénie (Arion, 2011), l'autisme (Lemonnier et al., 2012) et la dépendance aux drogues (Ferrini et al., 2013). Toutes ces études démontrent le potentiel pharmaceutique important d'un modulateur de l'extrusion des ions chlorures pour le traitement d'une multitude de maladies graves.

Le CLP 257 chez l'homme ?

Malheureusement, malgré le potentiel impressionnant du CLP 257, celui-ci ne se retrouvera pas sur les tablettes des pharmacies à cause de sa pharmacodynamie. Malgré les efforts des chimistes médicaux, à cause de plusieurs problèmes (absorption, métabolisation), la molécule ne rend pas en concentration suffisante au niveau de la moelle épinière pour qu'un traitement puisse être envisagé sans injection intrathécale. Par contre, comme je l'ai déjà mentionné, le CLP 257 est la première molécule d'une nouvelle classe et d'autres composés, déjà synthétisés, sont capables de se rendre au niveau de la moelle grâce même via la voie la plus classique, le comprimé *per os*.

Conclusion

Un des quatre objectifs principaux de cette thèse était de comprendre l'encodage physiologique que fait la moelle épinière de l'information nociceptive provenant de la périphérie avant de la transmettre aux aires supérieures. Par la suite, il s'agissait de cibler les neurones affectés par le développement des douleurs neuropathiques et d'en quantifier les changements. Une fois ces changements établis, le but était d'en identifier les mécanismes par des expériences répliquant ou normalisant ces changements. En dernier lieu, cette thèse avait pour but de créer les outils permettant de mieux caractériser les neurones impliqués dans l'encodage des douleurs neuropathiques.

Comprendre comment et à quel niveau se produit l'encodage de la nociception par la moelle épinière nous permet d'identifier de nouvelles cibles neuronales et de nouveaux mécanismes pour le traitement des douleurs pathologiques.

Bibliographie

Reference List

Agresti A (2002) Categorical Data Analysis. Wiley.

Akgun E, Javed MI, Lunzer MM, Smeester BA, Beitz AJ, Portoghese PS (2013) Ligands that interact with putative MOR-mGluR5 heteromer in mice with inflammatory pain produce potent antinociception. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:11595-11599.

Alvarez-Leefmans FJ, Leon-Olea M, Mendoza-Sotelo J, Alvarez FJ, Anton B, Garduno R (2001) Immunolocalization of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in peripheral nervous tissue of vertebrates. *Neuroscience* 104:569-582.

Amir R, Michaelis M, Devor M (2002) Burst discharge in primary sensory neurons: Triggered by subthreshold oscillations, maintained by depolarizing afterpotentials. *J Neurosci* 22:1187-1198.

Andrew D (2009) Sensitization of lamina I spinoparabrachial neurons parallels heat hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *J Physiol* 587:2005-2017.

Andrew D, Craig AD (2002) Quantitative responses of spinothalamic lamina I neurones to graded mechanical stimulation in the cat. *J Physiol* 545:913-931.

Apkarian AV, Bushnell MC, Treede RD, Zubieta JK (2005) Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain* 9:463-484.

Araldi D, Ferrari L, Lotufo C, Vieira A, Athie M, Figueiredo J, Duarte D, Tambeli C, Ferreira S, Parada C (2013) Peripheral inflammatory hyperalgesia depends on the COX increase in the dorsal root ganglion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:3603-3608.

Arenkiel BR, Peca J, Davison IG, Feliciano C, Deisseroth K, Augustine GJ, Ehlers MD, Feng GP (2007) In vivo light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *Neuron* 54:205-218.

Arion D (2011) ALtered expression of regulators of the cortical chloride transporters nkcc1 and kcc2 in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry* 68:21-31.

Attal N, Chen YL, Kayser V, Guilbaud G (1991) Behavioral Evidence That Systemic Morphine May Modulate A Phasic Pain-Related Behavior in A Rat Model of Peripheral Mononeuropathy. *Pain* 47:65-70.

Baba H, Ji RR, Kohno T, Moore KA, Ataka T, Wakai A, Okamoto M, Woolf CJ (2003) Removal of GABAergic inhibition facilitates polysynaptic A fiber-mediated excitatory transmission to the superficial spinal dorsal horn. *Mol Cell Neurosci* 24:818-830.

Baba H, Kohno T, Okamoto M, Goldstein PA, Shimoji K, Yoshimura M (1998) Muscarinic facilitation of GABA release in substantia gelatinosa of the rat spinal dorsal horn. *J Physiol* 508:83-93.

Baron R (2008) Neuropathic Pain: Clinical. In: *The Senses, Volume 5*.

Baron R, Binder A, Wasner G (2010) Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurol* 9:807-819.

Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009) Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* 139:267-284.

Basbaum AI, Bushnell MC (2008) Science of Pain.

Bazelot M, Dinocourt C, Cohen I, Miles R (2010) Unitary inhibitory field potentials in the CA3 region of rat hippocampus. *J Physiol* 588:2077-2090.

Bellavance MA, Demers M, Deschenes M (2010) Feedforward Inhibition Determines the Angular Tuning of Vibrissal Responses in the Principal Trigeminal Nucleus. *J Neurosci* 30:1057-1063.

Bennett GJ, Xie YK (1988b) A Peripheral Mononeuropathy in Rat That Produces Disorders of Pain Sensation Like Those Seen in Man. *Pain* 33:87-107.

Bennett GJ, Xie YK (1988a) A Peripheral Mononeuropathy in Rat That Produces Disorders of Pain Sensation Like Those Seen in Man. *Pain* 33:87-107.

Bennett GJ (2012) What Is Spontaneous Pain and Who Has It? *The Journal of Pain* 13:921-929.

Bennett PJ, Monro TM, Richardson DJ (1999) Toward practical holey fiber technology: fabrication, splicing, modeling, and characterization. *Optics Letters* 24:1203-1205.

- Benrath J, Brechtel C, Sandkuhler J (2005) Low dose of S(+)-ketamine prevents long-term potentiation in pain pathways under strong opioid analgesia in the rat spinal cord in vivo. *Br J Anaesth* 95:518-523.
- Bester H, Chapman V, Besson JM, Bernard JF (2000) Physiological properties of the lamina I spinoparabrachial neurons in the rat. *J Neurophysiol* 83:2239-2259.
- Bishop GH (1949) Relation of Pain Sensory Threshold to Form of Mechanical Stimulator. *J Neurophysiol* 12:51-57.
- Bohlhalter S, Weinmann O, Mohler H, Fritschy JM (1996) Laminar compartmentalization of GABA(A)-receptor subtypes in the spinal cord: An immunohistochemical study. *J Neurosci* 16:283-297.
- Boulenguez P, Liabeuf S, Bos R, Bras H, Jean-Xavier C, Brocard C, Stil A, Darbon P, Cattaert D, Delpire E, Marsala M, Vinay L (2010) Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. *Nat Med* 16:302-307.
- Bowmaster TA, Davis CC, Krauthamer V (1991) Excitation and Detection of Action Potential-Induced Fluorescence Changes Through A Single Monomode Optical Fiber. *Biochimica et Biophysica Acta* 1091:9-14.
- Bradley PMJ, Murphy D, Kasparov S, Croker J, Paton JFR (2008) A micro-optrode for simultaneous extracellular electrical and intracellular optical recording from neurons in an intact oscillatory neuronal network. *J Neurosci Methods* 168:383-395.
- Braz JM, Nassar MA, Wood JN, Basbaum AI (2005) Parallel "pain" pathways arise from subpopulation of primary afferent nociceptor. *Neuron* 47:787-793.
- Buhl EH, Lubke J (1989) Intracellular Lucifer Yellow Injection in Fixed Brain-Slices Combined with Retrograde Tracing, Light and Electron-Microscopy. *Neuroscience* 28:3-16.
- Buzsaki G, Kaila K, Raichle M (2007) Inhibition and brain work. *Neuron* 56:771-783.
- Callaway EM (2008) Transneuronal circuit tracing with neurotropic viruses. *Curr Opin Neurobiol* 18:617-623.
- Calvino B (2006) Neural basis of pain. *Psychol Neuropsychiatr Vieil*.
- Campbell JN, Raja SN, Meyer RA, Mackinnon SE (1988) Myelinated Afferents Signal the Hyperalgesia Associated with Nerve Injury. *Pain* 32:89-94.
- Castrolopes JM, Tavares I, Coimbra A (1993) Gaba Decreases in the Spinal-Cord Dorsal Horn After Peripheral Neurectomy. *Brain Res* 620:287-291.

- Cetas JS, Saedi T, Burchiel KJ (2008) Destructive procedures for the treatment of nonmalignant pain: a structured literature review. *J Neurosurg* 109:389-404.
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994) Quantitative Assessment of Tactile Allodynia in the Rat Paw. *J Neurosci Methods* 53:55-63.
- Chen K, Li HZ, Ye N, Zhang J, Wang JJ (2005) Role of GABA(B) receptors in GABA and baclofen-induced inhibition of adult rat cerebellar interpositus nucleus neurons in vitro. *Brain Research Bulletin* 67:310-318.
- Chery N, De Koninck Y (1999) Junctional versus extrajunctional glycine and GABA(A) receptor-mediated IPSCs in identified lamina I neurons of the adult rat spinal cord. *J Neurosci* 19:7342-7355.
- Chery N, De Koninck Y (2000) GABA(B) receptors are the first target of released GABA at lamina I inhibitory synapses in the adult rat spinal cord. *J Neurophysiol* 84:1006-1011.
- Chorin E, Vinograd O, Fleidervish I, Gilad D, Herrmann S, Sekler I, Aizenman E, Hershinkel M (2011) Upregulation of KCC2 Activity by Zinc-Mediated Neurotransmission via the mZnR/GPR39 Receptor. *J Neurosci* 31:12916-12926.
- Chubbuck JG (1966) Small-motion biological stimulator. *Johns Hopkins APL Tech Dig* 5:18-23.
- Chudakov DM, Lukyanov S, Lukyanov KA (2005) Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging. *Trends in Biotechnology* 23:605-613.
- Chung JM, Surmeier DJ, Lee KH, Sorkin LS, Honda CN, Tsong Y, Willis WD (1986) Classification of Primate Spinothalamic and Somatosensory Thalamic Neurons Based on Cluster-Analysis. *J Neurophysiol* 56:308-327.
- Clapper JR, Moreno-Sanz G, Russo R, Guijarro A, Vacondio F, Duranti A, Tontini A, Sanchini S, Sciolino NR, Spradley JM, Hohmann AG, Calignano A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D (2010) Anandamide suppresses pain initiation through a peripheral endocannabinoid mechanism. *Nat Neurosci* 13:1265-1270.
- Cliffer KD, Giesler GJ (1989) Postsynaptic Dorsal Column Pathway of the Rat .3. Distribution of Ascending Afferent-Fibers. *J Neurosci* 9:3146-3168.
- Colleoni M, Sacerdote P (2010) Murine models of human neuropathic pain. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 1802:924-933.
- Costigan M, Scholz J, Woolf CJ (2009) Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage. *Annu Rev Neurosci* 32:1-32.

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

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

Cox JJ, Reimann F, Nicholas AK, Thornton G, Roberts E, Springell K, Karbani G, Jafri H, Mannan J, Raashid Y, Al Gazali L, Hamamy H, Valente EM, Gorman S, Williams R, Mchale DP, Wood JN, Gribble FM, Woods CG (2006) An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* 444:894-898.

Craig AD (1995) Distribution of Brain-Stem Projections from Spinal Lamina-I Neurons in the Cat and the Monkey. *J Comp Neurol* 361:225-248.

Craig AD (1996) An ascending general homeostatic afferent pathway originating in lamina I. *Emotional Motor System* 107:225-242.

Craig AD (2003a) Distribution of trigeminothalamic and spinothalamic lamina I terminations in the cat. *Somatosensory and Motor Research* 20:209-222.

Craig AD (2003b) Pain mechanisms: Labeled lines versus convergence in central processing. *Annu Rev Neurosci* 26:1-30.

Craig AD (2004a) Distribution of trigeminothalamic and spinothalamic lamina I terminations in the macaque monkey. *J Comp Neurol* 477:119-148.

Craig AD (2004b) Lamina I, but not lamina V, spinothalamic neurons exhibit responses that correspond with burning pain. *J Neurophysiol* 92:2604-2609.

Craig AD, Burton H (1981) Spinal and Medullary Lamina-I Projection to Nucleus Submedius in Medial Thalamus - A Possible Pain Center. *J Neurophysiol* 45:443-466.

Craig AD, Bushnell MC, Zhang ET, Blomqvist A (1994) A Thalamic Nucleus Specific for Pain and Temperature Sensation. *Nature* 372:770-773.

Craig AD, Zhang ET, Bushnell MC, Blomqvist A (1995) Pain in the Brain and Lower Parts of the Anatomy - Reply. *Pain* 62:391-393.

Cramer SW, Baggott C, Cain J, Tilghman J, Allcock B, Miranpuri G, Rajpal S, Sun D, Resnick D (2008) The role of cation-dependent chloride transporters in neuropathic pain following spinal cord injury. *Mol Pain* 4.

Cregg R, Momin A, Rugiero F, Wood JN, Zhao J (2010) Pain channelopathies. *J Physiol* 588:1897-1904.

- Cuellar JM, Antognini JF, Carstens E (2004) An in vivo method for recording single unit activity in lumbar spinal cord in mice anesthetized with a volatile anesthetic. *Brain Res Brain Res Protoc* 13:126-134.
- Da Silva LFS, Coutinho MR, Menescal-De-Oliveira L (2010) Opioidergic and GABAergic mechanisms in the rostral ventromedial medulla modulate the nociceptive response of vocalization in guinea pigs. *Brain Research Bulletin* 82:177-183.
- Daousi C, MacFarlane IA, Woodward A, Nurmikko TJ, Bundred PE, Benbow SJ (2004) Chronic painful peripheral neuropathy in an urban community: a controlled comparison of people with and without diabetes. *Diabetic Medicine* 21:976-982.
- Davis MD, Schmidt JJ (2000) In vivo spectrometric calcium flux recordings of intrinsic caudate-putamen cells and transplanted IMR-32 neuroblastoma cells using miniature fiber optrodes in anesthetized and awake rats and monkeys. *J Neurosci Methods* 99:9-23.
- De Koninck Y (2007) Altered chloride homeostasis in neurological disorders: a new target. *Current Opinion in Pharmacology* 7:93-99.
- De Koninck Y, Ribeiro da Silva A, Henry JL, Cuello AC (1992) Spinal Neurons Exhibiting A Specific Nociceptive Response Receive Abundant Substance-P-Containing Synaptic Contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5073-5077.
- Decosterd I, Dertat T (2008) Animal Models and Neuropathic Pain. In: *The Senses, Volume 5*.
- Decosterd I, Woolf CJ (2000) Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87:149-158.
- Delmas P, Hao JZ, Rodat-Despoix L (2011) Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons. *Nat Rev Neurosci* 12:139-153.
- Delpire E, Days E, Lewis LM, Mi DH, Kim K, Lindsley CW, Weaver CD (2009) Small-molecule screen identifies inhibitors of the neuronal K-Cl cotransporter KCC2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:5383-5388.
- Devor M (2009b) Ectopic discharge in A beta afferents as a source of neuropathic pain. *Exp Brain Res* 196:115-128.
- Devor M (2009a) Ectopic discharge in A beta afferents as a source of neuropathic pain. *Exp Brain Res* 196:115-128.
- Dharmshaktu P, Tayal V, Kalra BS (2012) Efficacy of Antidepressants as Analgesics: A Review. *Journal of Clinical Pharmacology* 52:6-17.

- Digman MA, Caiolfa VR, Zamai M, Gratton E (2008) The phasor approach to fluorescence lifetime imaging analysis. *Biophysical Journal* 94:L14-L16.
- Dimon JH, Funk FJ, Wells RE (1965) Congenital Indifference to Pain with Associated Orthopedic Abnormalities. *Southern Medical Journal* 58:524-&.
- Djoughri L, Lawson SN (2004) A beta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res Rev* 46:131-145.
- Dougherty PM, Willis WD (1992b) Enhanced Responses of Spinothalamic Tract Neurons to Excitatory Amino-Acids Accompany Capsaicin-Induced Sensitization in the Monkey. *J Neurosci* 12:883-894.
- Dougherty PM, Willis WD (1992a) Enhanced Responses of Spinothalamic Tract Neurons to Excitatory Amino-Acids Accompany Capsaicin-Induced Sensitization in the Monkey. *J Neurosci* 12:883-894.
- Doyon N, Prescott SA, Castonguay A, Godin AG, Kroger H, De Koninck Y (2011) Efficacy of Synaptic Inhibition Depends on Multiple, Dynamically Interacting Mechanisms Implicated in Chloride Homeostasis. *Plos Computational Biology* 7.
- Drdla R, Sandkuhler J (2008) Long-term potentiation at C-fibre synapses by low-level presynaptic activity in vivo. *Mol Pain* 4.
- Dubner R, Kenshalo DR, Maixner W, Bushnell MC, Oliveras JL (1989) The Correlation of Monkey Medullary Dorsal Horn Neuronal-Activity and the Perceived Intensity of Noxious Heat Stimuli. *J Neurophysiol* 62:450-457.
- Ducreux D, Attal N, Parker F, Bouhassira D (2006) Mechanisms of central neuropathic pain: a combined psychophysical and fMRI study in syringomyelia. *Brain* 129:963-976.
- Eaton MJ, Plunkett JA, Karmally S, Martinez MA, Montanez K (1998) Changes in GAD- and GABA- immunoreactivity in the spinal dorsal horn after peripheral nerve injury and promotion of recovery by lumbar transplant of immortalized serotonergic precursors. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 16:57-72.
- Echeverry S, Shi XQ, Zhang J (2008) Characterization of cell proliferation in rat spinal cord following peripheral nerve injury and the relationship with neuropathic pain. *Pain* 135:37-47.
- Eckert WA, McNaughton KK, Light AR (2003) Morphology and axonal arborization of rat spinal inner lamina II neurons hyperpolarized by mu-opioid-selective agonists. *J Comp Neurol* 458:240-256.

Feng GP, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M, Nerbonne JM, Lichtman JW, Sanes JR (2000) Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28:41-51.

Ferrini F, Trang T, Mattioli TAM, Laffray S, Del'Guidice T, Lorenzo LE, Castonguay A, Doyon N, Zhang WB, Godin AG, Mohr D, Beggs S, Vandal K, Beaulieu JM, Cahill CM, Salter MW, De Koninck Y (2013) Morphine hyperalgesia gated through microglia-mediated disruption of neuronal Cl⁻ homeostasis. *Nat Neurosci* 16:183-192.

Gagnon M, Lavertu G, Castonguay A, Bergeron M, Bonin R, Bacjhand K, Vandal K, Jacob-Wagner M, Isenring P, Attardo G, Coull J, De Koninck Y (2012) Small molecule KCC2 activators as novel therapeutic agents for neuropathic pain. to be submitted.

Galan A, Laird JMA, Cervero F (2004) In vivo recruitment by painful stimuli of AMPA receptor subunits to the plasma membrane of spinal cord neurons. *Pain* 112:315-323.

Gaudio C, Hao JZ, Martin-Eauclaire MF, Gabriac M, Delmas P (2012) Menthol pain relief through cumulative inactivation of voltage-gated sodium channels. *Pain* 153:473-484.

Giesler GJ, Menetrey D, Guilbaud G, Besson JM (1976) Lumbar Cord Neurons at Origin of Spinothalamic Tract in Rat. *Brain Res* 118:320-324.

Giesler GJ, Nahin RL, Madsen AM (1984) Postsynaptic Dorsal Column Pathway of the Rat .1. Anatomical Studies. *J Neurophysiol* 51:260-275.

Gilron I, Coderre TJ (2007) Emerging drugs in neuropathic pain. *Expert Opinion on Emerging Drugs* 12:113-126.

Gold MS (2000) Spinal nerve ligation: what to blame for the pain and why. *Pain* 84:117-120.

Goldberg YP, et al. (2007) Loss-of-function mutations in the Na(v)1.7 gene underlie congenital indifference to pain in multiple human populations. *Clinical Genetics* 71:311-319.

Gong SC, Zheng C, Doughty ML, Losos K, Didkovsky N, Schambra UB, Nowak NJ, Joyner A, Leblanc G, Hatten ME, Heintz N (2003) A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* 425:917-925.

Grace PM, Rolan PE, Hutchinson MR (2011) Peripheral immune contributions to the maintenance of central glial activation underlying neuropathic pain. *Brain Behavior and Immunity* 25:1322-1332.

- Gracely RH, Lynch SA, Bennett GJ (1992) Painful Neuropathy - Altered Central Processing Maintained Dynamically by Peripheral Input. *Pain* 51:175-194.
- Gradinaru V, Mogri M, Thompson KR, Henderson JM, Deisseroth K (2009) Optical Deconstruction of Parkinsonian Neural Circuitry. *Science* 324:354-359.
- Grienberger C, Konnerth A (2012) Imaging Calcium in Neurons. *Neuron* 73:862-885.
- Guhring H, Gorig M, Ates M, Coste O, Zeilhofer HU, Pahl A, Rehse K, Brune K (2000) Suppressed injury-induced rise in spinal prostaglandin E-2 production and reduced early thermal hyperalgesia in iNOS-deficient mice. *J Neurosci* 20:6714-6720.
- Guirimand F, LeBars D (1996) Physiology of nociception. *Ann Fr Anesth Reanim* 15:1048-1079.
- Gunduz O, Oltulu C, Guven R, Buldum D, Ulugol A (2011) Pharmacological and behavioral characterization of the saphenous chronic constriction injury model of neuropathic pain in rats. *Neurol Sci* 32:1135-1142.
- Hains BC, Willis WD, Hulsebosch CE (2002) Differential electrophysiological effects of brain-derived neurotrophic factor on dorsal horn neurons following chronic spinal cord hemisection injury in the rat. *Neurosci Lett* 320:125-128.
- Hains BC, Willis WD, Hulsebosch CE (2003) Temporal plasticity of dorsal horn somatosensory neurons after acute and chronic spinal cord hemisection in rat. *Brain Res* 970:238-241.
- Hammond DL, Ackerman L, Holdsworth R, Elzey B (2004) Effects of spinal nerve ligation on immunohistochemically identified neurons in the L4 and L5 dorsal root ganglia of the rat. *J Comp Neurol* 475:575-589.
- Han HC, Lee DH, Chung JM (2000) Characteristics of ectopic discharges in a rat neuropathic pain model. *Pain* 84:253-261.
- Han ZS, Zhang ET, Craig AD (1998) Nociceptive and thermoreceptive lamina I neurons are anatomically distinct. *Nat Neurosci* 1:218-225.
- Harvey RJ, Depner UB, Wasse H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K, Schutz B, Abo-Salem OM, Zimmer A, Poisbeau P, Welzl H, Wolfner DP, Betz H, Zeilhofer HU, Muller U (2004) GlyR alpha 3: An essential target for spinal PGE(2)-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* 304:884-887.
- Head H, Holmes G (1911) Sensory disturbances from cerebral lesions. *Brain* 34:102-254.
- Helmchen F, Denk W (2005) Deep tissue two-photon microscopy. *Nature Methods* 2:932-940.

- Hewitt SA, Wamsteeker JI, Kurz EU, Bains JS (2009) Altered chloride homeostasis removes synaptic inhibitory constraint of the stress axis. *Nat Neurosci* 12:438-443.
- Hillman P, Wall PD (1969) Inhibitory and Excitatory Factors Influencing Receptive Fields of Lamina-5 Spinal Cord Cells. *Exp Brain Res* 9:284-&.
- Honig MG, Hume RI (1989) Dil and Dio - Versatile Fluorescent Dyes for Neuronal Labeling and Pathway Tracing. *Trends in Neurosciences* 12:333-&.
- Hosl K, Reinold H, Harvey RJ, Muller U, Narumiya S, Zeilhofer HU (2006) Spinal prostaglandin E receptors of the EP2 subtype and the glycine receptor alpha 3 subunit, which mediate central inflammatory hyperalgesia, do not contribute to pain after peripheral nerve injury or formalin injection. *Pain* 126:46-53.
- Huberfeld G, Wittner L, Clemenceau S, Baulac M, Kaila K, Miles R, Rivera C (2007) Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 27:9866-9873.
- Hudmon A, Lebel E, Roy H, Sik A, Schulman H, Waxham MN, De Koninck P (2005) A mechanism for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II clustering at synaptic and nonsynaptic sites based on self-association. *J Neurosci* 25:6971-6983.
- Huettner JE (2003) Kainate receptors and synaptic transmission. *Prog Neurobiol* 70:387-407.
- Hwang JH, Yaksh TL (1997) The effect of spinal GABA receptor agonists on tactile allodynia in a surgically-induced neuropathic pain model in the rat. *Pain* 70:15-22.
- Hyde TM, Lipska BK, Ali T, Mathew SV, Law AJ, Metitiri OE, Straub RE, Ye TZ, Colantuoni C, Herman MM, Bigelow LB, Weinberger DR, Kleinman JE (2011) Expression of GABA Signaling Molecules KCC2, NKCC1, and GAD1 in Cortical Development and Schizophrenia. *J Neurosci* 31:11088-11095.
- Ibuki T, Hama AT, Wang XT, Pappas GD, Sagen J (1997) Loss of GABA-immunoreactivity in the spinal dorsal horn of rats with peripheral nerve injury and promotion of recovery by adrenal medullary grafts. *Neuroscience* 76:845-858.
- Ikeda H, Heinke B, Ruscheweyh R, Sandkuhler J (2003a) Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia. *Science* 299:1237-1240.
- Ikeda H, Kusudo K, Ryu PD, Murase K (2003b) Effects of corticotropin-releasing factor on plasticity of optically recorded neuronal activity in the substantia gelatinosa of rat spinal cord slices. *Pain* 106:197-207.

- Ikeda H, Stark J, Fischer H, Wagner M, Drdla R, Jager T, Sandkuhler J (2006) Synaptic amplifier of inflammatory pain in the spinal dorsal horn. *Science* 312:1659-1662.
- Jakowec MW, Fox AJ, Martin LJ, Kalb RG (1995a) Quantitative and Qualitative Changes in Ampa Receptor Expression During Spinal-Cord Development. *Neuroscience* 67:893-907.
- Jakowec MW, Yen L, Kalb RG (1995b) In-Situ Hybridization Analysis of Ampa Receptor Subunit Gene-Expression in the Developing Rat Spinal-Cord. *Neuroscience* 67:909-920.
- Jares-Erijman EA, Jovin TM (2003) FRET imaging. *Nat Biotechnol* 21:1387-1395.
- Ji RR, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ (2003) Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends in Neurosciences* 26:696-705.
- Jia H, Rustioni A, Valtchanoff JG (1999) Metabotropic glutamate receptors in superficial laminae of the rat dorsal horn. *J Comp Neurol* 410:627-642.
- Jinks SL, Martin JT, Carstens E, Jung SW, Antognini JF (2003) Peri-MAC depression of a nociceptive withdrawal reflex is accompanied by reduced dorsal horn activity with halothane but not isoflurane. *Anesthesiology* 98:1128-1138.
- Jolivald CG, Lee CA, Ramos KM, Calcutt NA (2008) Allodynia and hyperalgesia in diabetic rats are mediated by GABA and depletion of spinal potassium-chloride co-transporters. *Pain* 140:48-57.
- Jourdan D, Ardid D, Eschali r A (2002) Analysis of ultrasonic vocalisation does not allow chronic pain to be evaluated in rats. *Pain* 95:165-173.
- Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413:203-210.
- Jung JC, Mehta AD, Aksay E, Stepnoski R, Schnitzer MJ (2004b) In vivo mammalian brain Imaging using one- and two-photon fluorescence microendoscopy. *J Neurophysiol* 92:3121-3133.
- Jung JC, Mehta AD, Aksay E, Stepnoski R, Schnitzer MJ (2004a) In vivo mammalian brain Imaging using one- and two-photon fluorescence microendoscopy. *J Neurophysiol* 92:3121-3133.
- Kahle KT, Staley KJ, Nahed BV, Gamba G, Hebert SC, Lifton RP, Mount DB (2008) Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease. *Nature Clinical Practice Neurology* 4:490-503.
- Keller AF, Beggs S, Salter MW, De Koninck Y (2007) Transformation of the output of spinal lamina I neurons after nerve injury and microglia stimulation underlying neuropathic pain. *Mol Pain* 3.

- Kim J, Yao A, Atherley R, Carstens E, Jinks SL, Antognini JF (2007) Neurons in the ventral spinal cord are more depressed by isoflurane, halothane, and propofol than are neurons in the dorsal spinal cord. *Anesth Analg* 105:1020-1026.
- Kim SH, Chung JM (1992) An Experimental-Model for Peripheral Neuropathy Produced by Segmental Spinal Nerve Ligation in the Rat. *Pain* 50:355-363.
- King T, Vera-Portocarrero L, Gutierrez T, Vanderah TW, Dussor G, Lai J, Fields HL, Porreca F (2009b) Unmasking the tonic-aversive state in neuropathic pain. *Nat Neurosci* 12:1364-1366.
- King T, Vera-Portocarrero L, Gutierrez T, Vanderah TW, Dussor G, Lai J, Fields HL, Porreca F (2009a) Unmasking the tonic-aversive state in neuropathic pain. *Nat Neurosci* 12:1364-1366.
- Klausberger T, Magill PJ, Marton LF, Roberts JDB, Cobden PM, Buzsaki G, Somogyi P (2003) Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature* 421:844-848.
- Knight JC, Birks TA, Russell PSJ, Atkin DM (1997) All-silica single-mode optical fiber with photonic crystal cladding: Errata. *Optics Letters* 22:484-485.
- Kohling R (2002) GABA Becomes Exciting. *Science* 298:1350-1351.
- Kontinen VK, Stanfa LC, Basu A, Dickenson AH (2001) Electrophysiologic evidence for increased endogenous GABAergic but not glycinergic inhibitory tone in the rat spinal nerve ligation model of neuropathy. *Anesthesiology* 94:333-339.
- Kubo A, Koyama M, Tamura R, Takagishi Y, Murase S, Mizumura K (2012) Absence of mechanical hyperalgesia after exercise (delayed onset muscle soreness) in neonatally capsaicin-treated rats. *Neuroscience Research*.
- Kudo Y, Takeda K, Hicks TP, Ogura A, Kawasaki Y (1989) A New Device for Monitoring Concentrations of Intracellular Ca²⁺ in Cns Preparations and Its Application to the Frogs Spinal-Cord. *J Neurosci Methods* 30:161-168.
- Kumar K, Toth C, Nath RK (1997) Deep brain stimulation for intractable pain: A 15-year experience. *Neurosurgery* 40:736-746.
- Kuner T, Augustine GJ (2000) A genetically encoded ratiometric indicator for chloride: Capturing chloride transients in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 27:447-459.
- Kupers R, Yu W, Persson JKE, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z (1998) Photochemically-induced ischemia of the rat sciatic nerve produces a dose-dependent and highly

reproducible mechanical, heat and cold allodynia, and signs of spontaneous pain. *Pain* 76:45-59.

Labrakakis C, Ferrini F, Koninck Y (2011) Mechanisms of plasticity of inhibition in chronic pain conditions. *Inhibitory Synaptic Plasticity* 91-105.

Labrakakis C, MacDermott AB (2003) Neurokinin receptor 1-expressing spinal cord neurons in lamina I and III/IV of postnatal rats receive inputs from capsaicin sensitive fibers. *Neurosci Lett* 352:121-124.

Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, Glick S, Ingrao J, Klassen-Ross T, LaCroix-Fralish ML, Matsumiya L, Sorge RE, Sotocinal SG, Tabaka JM, Wong D, van den Maagdenberg AMJM, Ferrari MD, Craig KD, Mogil JS (2010) Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Methods* 7:447-U52.

LeChasseur Y, Dufour S, Lavertu G, Bories C, Deschenes M, Vallee R, De Koninck Y (2011) A microprobe for parallel optical and electrical recordings from single neurons in vivo. *Nature Methods* 8:319-U63.

Leem JW, Lee BH, Willis WD, Chung JM (1994) Grouping of Somatosensory Neurons in the Spinal-Cord and the Gracile Nucleus of the Rat by Cluster-Analysis. *J Neurophysiol* 72:2590-2597.

Leem JW, Park ES, Paik KS (1995) Electrophysiological Evidence for the Antinociceptive Effect of Transcutaneous Electrical-Stimulation on Mechanically Evoked Responsiveness of Dorsal Horn Neurons in Neuropathic Rats. *Neurosci Lett* 192:197-200.

Lemonnier E, Degrez C, Phelep M, Tyzio R, Josse F, Grandgeorge M, Hadjikhani N, Ben Ari Y (2012) A randomised controlled trial of bumetanide in the treatment of autism in children. *Transl Psychiatry* 2:e202.

Levene MJ, Dombek DA, Kasischke KA, Molloy RP, Webb WW (2004a) In vivo multiphoton microscopy of deep brain tissue. *J Neurophysiol* 91:1908-1912.

Levene MJ, Dombek DA, Kasischke KA, Molloy RP, Webb WW (2004b) In vivo multiphoton microscopy of deep brain tissue. *J Neurophysiol* 91:1908-1912.

Levy D, Strassman AM (2002) Mechanical response properties of A and C primary afferent neurons innervating the rat intracranial dura. *J Neurophysiol* 88:3021-3031.

Light AR, Durkovic RG (1984) Features of Laminar and Somatotopic Organization of Lumbar Spinal-Cord Units Receiving Cutaneous Inputs from Hindlimb Receptive-Fields. *J Neurophysiol* 52:449-458.

Liljencrantz J, Bjornsdotter M, Morrison I, Bergstrand S, Ceko M, Seminowicz D, Cole J, Bushnell M, Olausson H (2013) Altered C-tactile processing in human dynamic tactile allodynia. *Pain* 154:227-234.

Lima D, Almeida A (2002) The medullary dorsal reticular nucleus as a pronociceptive centre of the pain control system. *Prog Neurobiol* 66:81-108.

Lima SQ, Hromadka T, Znamenskiy P, Zador AM (2009) PINP: A New Method of Tagging Neuronal Populations for Identification during In Vivo Electrophysiological Recording. *Plos One* 4.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* 46:3-26.

Litcher-Kelly L, Martino SA, Broderick JE, Stone AA (2007) A systematic review of measures used to assess chronic musculoskeletal pain in clinical and randomized controlled clinical trials. *J Pain* 8:906-913.

Liu CN, Wall PD, Ben Dor E, Michaelis M, Amir R, Devor M (2000a) Tactile allodynia in the absence of C-fiber activation: altered firing properties of DRG neurons following spinal nerve injury. *Pain* 85:503-521.

Liu XG, Eschenfelder S, Blenk KH, Janig W, Habler HJ (2000b) Spontaneous activity of axotomized afferent neurons after L5 spinal nerve injury in rats. *Pain* 84:309-318.

Liu XG, Morton CR, Azkue JJ, Zimmermann M, Sandkuhler J (1998) Long-term depression of C-fibre-evoked spinal field potentials by stimulation of primary afferent A delta-fibres in the adult rat. *Eur J Neurosci* 10:3069-3075.

Livet J, Weissman TA, Kang HN, Draft RW, Lu J, Bennis RA, Sanes JR, Lichtman JW (2007) Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature* 450:56-+.

Loomis CW, Khandwala H, Osmond G, Heffean MP (2001) Coadministration of intrathecal strychnine and bicuculline effects synergistic allodynia in the rat: An isobolographic analysis. *J Pharmacol Exp Ther* 296:756-761.

Lopez-Bendito G, Sturgess K, Erdelyi F, Szabo G, Molnar Z, Paulsen O (2004) Preferential origin and layer destination of GAD65-GFP cortical interneurons. *Cerebral Cortex* 14:1122-1133.

Lloyd DR, Chen PB, Hargreaves KM (2012) Anti-Hyperalgesic Effects of Anti-Serotonergic Compounds on Serotonin- and Capsaicin-Evoked Thermal Hyperalgesia in the Rat. *Neuroscience* 203:207-215.

- Lu Y, Perl ER (2003) A specific inhibitory pathway between substantia gelatinosa neurons receiving direct C-fiber input. *J Neurosci* 23:8752-8758.
- Lu Y, Perl ER (2005) Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II). *J Neurosci* 25:3900-3907.
- Lu Y, Zheng JH, Xiong LZ, Zimmermann M, Yang J (2008) Spinal cord injury-induced attenuation of GABAergic inhibition in spinal dorsal horn circuits is associated with down-regulation of the chloride transporter KCC2 in rat. *J Physiol* 586:5701-5715.
- Luo L, Callaway EM, Svoboda K (2008) Genetic dissection of neural circuits. *Neuron* 57:634-660.
- Macchesn J, Oconnor PB, Presby HM (1974) New Technique for Preparation of Low-Loss and Graded-Index Optical Fibers. *Proceedings of the Ieee* 62:1280-1281.
- MacLean JN, Fenstermaker V, Watson BO, Yuste R (2006) A visual thalamocortical slice. *Nature Methods* 3:129-134.
- Manering NA, Reuter T, Ihmsen H, Yeomans DC, Tzabazis A (2013) High-dose remifentanyl prevents development of thermal hyperalgesia in a neuropathic pain model. *Br J Anaesth* 110:287-292.
- Margeta-Mitrovic M, Mitrovic I, Riley RC, Jan LY, Basbaum AI (1999) Immunohistochemical localization of GABA(B) receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 405:299-321.
- Margrie TW, Meyer AH, Caputi A, Monyer H, Hasan MT, Schaefer AT, Denk W, Brecht M (2003) Targeted whole-cell recordings in the mammalian brain in vivo. *Neuron* 39:911-918.
- Mayer DJ, LIEBESKI JC (1974) Pain Reduction by Focal Electrical-Stimulation of Brain - Anatomical and Behavioral-Analysis. *Brain Res* 68:73-93.
- McDermott AM, Toelle TR, Rowbotham DJ, Schaefer CP, Dukes EM (2006) The burden of neuropathic pain: results from a cross-sectional survey. *Eur J Pain* 10:127-135.
- McKinney SA, Murphy CS, Hazelwood KL, Davidson MW, Looger LL (2009) A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein. *Nature Methods* 6:131-133.
- Meglio M, Cioni B (1981) The Role of Percutaneous Cordotomy in the Treatment of Chronic Cancer Pain. *Acta Neurochir (Wien)* 59:111-121.
- Melzack R, EISENBER.H (1968) Skin Sensory Afterglows. *Science* 159:445-&.
- Melzack R, Wall PD (1965) Pain Mechanisms - A New Theory. *Science* 150:971-&.

- Mendell LM (2011) Computational functions of neurons and circuits signaling injury: Relationship to pain behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:15596-15601.
- Mercado A, Mount DB, Gamba G (2004) Electroneutral cation-chloride cotransporters in the central nervous system. *Neurochemical Research* 29:17-25.
- Millan MJ (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66:355-474.
- Mogil JS (2009) Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci* 10:283-294.
- Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ (2002) Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci* 22:6724-6731.
- Mosconi T, Kruger L (1996) Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: Ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. *Pain* 64:37-57.
- Mottin S, Laporte P, Cespuglio R (2003) Inhibition of NADH oxidation by chloramphenicol in the freely moving rat measured by picosecond time-resolved emission spectroscopy. *Journal of Neurochemistry* 84:633-642.
- Nakamura T, Minamisawa H, Katayama Y, Ueda M, Terashi A, Nakamura K, Kudo Y (1999) Increased intracellular Ca²⁺ concentration in the hippocampal CA1 area during global ischemia and reperfusion in the rat: A possible cause of delayed neuronal death. *Neuroscience* 88:57-67.
- Nasu T, Taguchi T, Mizumura K (2010) Persistent deep mechanical hyperalgesia induced by repeated cold stress in rats. *Eur J Pain* 14:236-244.
- Neunlist M, Zou SZ, Tung L (1992) Design and Use of An Optrode for Optical Recordings of Cardiac Action-Potentials. *Pflugers Arch* 420:611-617.
- Nightingale S (2012) The neuropathic pain market. *Nature Reviews Drug Discovery* 11:101-102.
- Ossipov MH, Bian D, Malan TP, Lai J, Porreca F (1999) Lack of involvement of capsaicin-sensitive primary afferents in nerve-ligation injury induced tactile allodynia in rats. *Pain* 79:127-133.
- Patapoutian A, Tate S, Woolf CJ (2009) Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nature Reviews Drug Discovery* 8:55-68.

- Perl ER (1998) Getting a line on pain: is it mediated by dedicated pathways? *Nat Neurosci* 1:177-178.
- Perl ER, Djouhri L, Lawson SN (1997) Intracellular recordings from dorsal root ganglion (DRG) neurones in the anaesthetized guinea-pig to allow comparisons of afferent receptive and cytochemical properties. *J Physiol* 504P:58.
- Pernia-Andrade AJ, Kato A, Witschi R, Nyilas R, Katona I, Freund TF, Watanabe M, Filitz J, Koppert W, Schuttler J, Ji GC, Neugebauer V, Marsicano G, Lutz B, Vanegas H, Zeilhofer HU (2009) Spinal Endocannabinoids and CB1 Receptors Mediate C-Fiber-Induced Heterosynaptic Pain Sensitization. *Science* 325:760-764.
- Petrus M, Peier AM, Bandell M, Hwang SW, Huynh T, Olney N, Jegla T, Patapoutian A (2007) A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Mol Pain* 3.
- Pitcher GM, Henry JL (2000) Cellular mechanisms of hyperalgesia and spontaneous pain in a spinalized rat model of peripheral neuropathy: changes in myelinated afferent inputs implicated. *Eur J Neurosci* 12:2006-2020.
- Pitcher GM, Ritchie J, Henry JL (1999) Nerve constriction in the rat: model of neuropathic, surgical and central pain. *Pain* 83:37-46.
- Polgar E, Fowler JH, McGill MM, Todd AJ (1999) The types of neuron which contain protein kinase C gamma in rat spinal cord. *Brain Res* 833:71-80.
- Polgar E, Gray S, Riddell JS, Todd AJ (2004) Lack of evidence for significant neuronal loss in laminae I-III of the spinal dorsal horn of the rat in the chronic constriction injury model. *Pain* 111:144-150.
- Polgar E, Hughes DI, Arham AZ, Todd AJ (2005) Loss of neurons from laminae I-III of the spinal dorsal horn is not required for development of tactile allodynia in the spared nerve injury model of neuropathic pain. *J Neurosci* 25:6658-6666.
- Prescott SA, De Koninck Y (2002) Four cell types with distinctive membrane properties and morphologies in lamina I of the spinal dorsal horn of the adult rat. *J Physiol* 539:817-836.
- Price DD, Mayer DJ (1974) Physiological Laminar Organization of Dorsal Horn of *M. Mulatta*. *Brain Res* 79:321-325.
- Price TJ, Cervero F, De Koninck Y (2005) Role of cation-chloride-cotransporters (CCC) in pain and hyperalgesia. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 5:547-555.
- Price TJ, Cervero F, Gold MS, Hammond DL, Prescott SA (2009) Chloride regulation in the pain pathway. *Brain Res Rev* 60:149-170.

Price TJ, Hargreaves KM, Cervero F (2006) Protein expression and mRNA cellular distribution of the NKCC1 cotransporter in the dorsal root and trigeminal ganglia of the rat. *Brain Res* 1112:146-158.

Rees H, Roberts MHT (1993) The Anterior Pretectal Nucleus - A Proposed Role in Sensory Processing. *Pain* 53:121-135.

Reynolds DV (1969) Surgery in Rat During Electrical Analgesia Induced by Focal Brain Stimulation. *Science* 164:444-&.

Ribeiro-Da-Silva A, De Koninck Y (2008) Morphological and Neurochemical Organization of the Spinal Dorsal Horn. In: *The Senses, Volume 5* pp 280-302.

Ringkamp M, Meyer RA (2008) Physiology of Nociceptors. In: *The Senses, Volume 5* pp 98-113.

Rivat C, Richebe P, Laboureyras E, Laulin J, Havouis R, Noble F, Moulinoux J, Simonnet G (2008) Polyamine deficient diet to relieve pain hypersensitivity. *Pain* 137:125-137.

Rivera C, Li H, Thomas-Crusells J, Lahtinen H, Viitanen T, Nanobashvili A, Kokaia Z, Airaksinen MS, Voipio J, Kaila K, Saarma M (2002) BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl⁻ extrusion. *Journal of Cell Biology* 159:747-752.

Rivera C, Voipio J, Thomas-Crusells J, Li H, Emri Z, Sipila S, Payne JA, Minichiello L, Saarma M, Kaila K (2004b) Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *J Neurosci* 24:4683-4691.

Rivera C, Voipio J, Thomas-Crusells J, Li H, Emri Z, Sipila S, Payne JA, Minichiello L, Saarma M, Kaila K (2004a) Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *J Neurosci* 24:4683-4691.

Robinson DA (1968) Electrical Properties of Metal Microelectrodes. *Proceedings of the Institute of Electrical and Electronics Engineers* 56:1065-&.

Rode F, Jensen DG, Blackburn-Munro G, Bjerrum OJ (2005) Centrally-mediated antinociceptive actions of GABA(A) receptor agonists in the rat spared nerve injury model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 516:131-138.

Rustioni A, Hayes NL, Oneill S (1979) Dorsal Column Nuclei and Ascending Spinal Afferents in Macaques. *Brain* 102:95-125.

Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S, Bonventre JV, Woolf CJ (2001) Interleukin-1 beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature* 410:471-475.

Sandkuhler J (2009) Models and Mechanisms of Hyperalgesia and Allodynia. *Physiol Rev* 89:707-758.

Schlegel T, Sauer SK, Handwerker HO, Reeh PW (2004) Responsiveness of C-fiber nociceptors to punctate force-controlled stimuli in isolated rat skin: lack of modulation by inflammatory mediators and flurbiprofen. *Neurosci Lett* 361:163-167.

Scholz J, Broom DC, Youn DH, Mills CD, Kohno T, Suter MR, Moore KA, Decosterd I, Coggeshall RE, Woolf CJ (2005) Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 25:7317-7323.

Seltzer Z, Dubner R, Shir Y (1990) A Novel Behavioral-Model of Neuropathic Pain Disorders Produced in Rats by Partial Sciatic-Nerve Injury. *Pain* 43:205-218.

Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods* 2:905-909.

Sheeba JH, Stefanovska A, McClintock PVE (2008) Neuronal synchrony during anesthesia: A thalamocortical model. *Biophysical Journal* 95:2722-2727.

Sherman SE, Loomis CW (1994) Morphine Insensitive Allodynia Is Produced by Intrathecal Strychnine in the Lightly Anesthetized Rat. *Pain* 56:17-29.

Sherman SE, Loomis CW (1995) Strychnine-dependent allodynia in the urethane-anesthetized rat is segmentally distributed and prevented by intrathecal glycine and betaine. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 73:1698-1705.

Sherman SE, Loomis CW (1996) Strychnine-sensitive modulation is selective for non-noxious somatosensory input in the spinal cord of the rat. *Pain* 66:321-330.

Sherman SE, Luo L, Dostrovsky JO (1997) Spinal strychnine alters response properties of nociceptive-specific neurons in rat medial thalamus. *J Neurophysiol* 78:628-637.

Shih A, Miletic V, Miletic G, Smith LJ (2008) Midazolam administration reverses thermal hyperalgesia and prevents gamma-aminobutyric acid transporter loss in a rodent model of neuropathic pain. *Anesth Analg* 106:1296-1302.

Shim B, Kim DW, Kim BH, Nam TS, Leem JW, Chung JM (2005) Mechanical and heat sensitization of cutaneous nociceptors in rats with experimental peripheral neuropathy. *Neuroscience* 132:193-201.

Shuen JA, Chen M, Gloss B, Calakos N (2008) Drd1a-tdTomato BAC transgenic mice for simultaneous visualization of medium spiny neurons in the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *J Neurosci* 28:2681-2685.

Simard CF, Bergeron MJ, Frenette-Cotton R, Carpentier GA, Pelchat ME, Caron L, Isenring P (2007) Homooligomeric and heterooligomeric associations between K⁺-Cl⁻ cotransporter isoforms and between K⁺-Cl⁻ and Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporters. *Journal of Biological Chemistry* 282:18083-18093.

Sivilotti L, Woolf CJ (1994) The Contribution of Gaba(A) and Glycine Receptors to Central Sensitization - Disinhibition and Touch-Evoked Allodynia in the Spinal-Cord. *J Neurophysiol* 72:169-179.

Smith B, Torrance N (2012) Epidemiology of Neuropathic Pain and Its Impact on Quality of Life. *Curr Pain Headache Rep* 16:191-198.

Smith HS (2012) Opioids and Neuropathic Pain. *Pain Physician* 15:ES93-ES110.

Somers DL, Clemente FR (2002) Dorsal horn synaptosomal content of aspartate, glutamate, glycine and GABA are differentially altered following chronic constriction injury to the rat sciatic nerve. *Neurosci Lett* 323:171-174.

Sorkin LS, Puig S (1996) Neuronal model of tactile allodynia produced by spinal strychnine: Effects of excitatory amino acid receptor antagonists and a mu-opiate receptor agonist. *Pain* 68:283-292.

Sorkin LS, Puig S, Jones DL (1998) Spinal bicuculline produces hypersensitivity of dorsal horn neurons: effects of excitatory amino acid antagonists. *Pain* 77:181-190.

Spergel DJ, Kruth U, Shimshek DR, Sprengel R, Seeburg PH (2001) Using reporter genes to label selected neuronal populations in transgenic mice for gene promoter, anatomical, and physiological studies. *Prog Neurobiol* 63:673-686.

Spike RC, Puskar Z, Andrew D, Todd AJ (2003) A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord. *Eur J Neurosci* 18:2433-2448.

Spike RC, Todd AJ, Johnston HM (1993) Coexistence of NADPH diaphorase with GABA, Glycine, and Acetylcholine in Rat Spinal-Cord. *J Comp Neurol* 335:320-333.

Stucky CL, Dubin AE, Jeske NA, Malin SA, Mckemy DD, Story GM (2009) Roles of transient receptor potential channels in pain. *Brain Res Rev* 60:2-23.

Swadlow HA (1998) Neocortical efferent neurons with very slowly conducting axons: strategies for reliable antidromic identification. *J Neurosci Methods* 79:131-141.

Szallasi A, Cortright DN, Blum CA, Eid SR (2007) The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov* 6:357-372.

- Tabo E, Jinks SL, Eisele JH, Carstens E (1999) Behavioral manifestations of neuropathic pain and mechanical allodynia, and changes in spinal dorsal horn neurons, following L4-L6 dorsal root constriction in rats. *Pain* 80:503-520.
- Tan EM, Yamaguchi Y, Horwitz GD, Gosgnach S, Lein ES, Goulding M, Albright TD, Callaway EM (2006a) Reversible inactivation of mammalian neurons in vivo using the *Drosophila* allatostatin receptor. *Neuron* 51:157-170.
- Tan EM, Yamaguchi Y, Horwitz GD, Gosgnach S, Lein ES, Goulding M, Albright TD, Callaway EM (2006b) Reversible inactivation of mammalian neurons in vivo using the *Drosophila* allatostatin receptor. *Neuron* 51:157-170.
- Taylor AMW, Osikowicz M, Ribeiro-Da-Silva A (2012) Consequences of the ablation of nonpeptidergic afferents in an animal model of trigeminal neuropathic pain. *Pain* 153:1311-1319.
- Terayama R, Omura S, Fujisawa N, Yamaai T, Ichikawa H, Sugimoto T (2008) Activation of microglia and p38 mitogen-activated protein kinase in the dorsal column nucleus contributes to tactile allodynia following peripheral nerve injury. *Neuroscience* 153:1245-1255.
- Timofeeva E, Merette C, Emond C, Lavalley P, Deschenes M (2003) A map of angular tuning preference in thalamic barreloids. *J Neurosci* 23:10717-10723.
- Todd AJ (2010) Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci* 11:823-836.
- Todd AJ, Mckenzie J (1989) Gaba-Immunoreactive Neurons in the Dorsal Horn of the Rat Spinal-Cord. *Neuroscience* 31:799-806.
- Todd AJ, Spike RC (1993) The Localization of Classical Transmitters and Neuropeptides Within Neurons in Laminae-I-Iii of the Mammalian Spinal Dorsal Horn. *Prog Neurobiol* 41:609-645.
- Todd AJ, Spike RC, Polgar E (1998) A quantitative study of neurons which express NEUROKININ-1 or somatostatin sst(2a) receptor in rat spinal dorsal horn. *Neuroscience* 85:459-473.
- Todd AJ, Sullivan AC (1990) Light-Microscope Study of the Coexistence of Gaba-Like and Glycine-Like Immunoreactivities in the Spinal-Cord of the Rat. *J Comp Neurol* 296:496-505.
- Torebjork HE, Lundberg LER, Lamotte RH (1992) Central Changes in Processing of Mechanoreceptive Input in Capsaicin-Induced Secondary Hyperalgesia in Humans. *J Physiol* 448:765-780.

- Tornberg J, Voikar V, Savilahti H, Rauvala H, Airaksinen MS (2005) Behavioural phenotypes of hypomorphic KCC2-deficient mice. *Eur J Neurosci* 21:1327-1337.
- Torsney C, MacDermott AB (2006) Disinhibition opens the gate to pathological pain signaling in superficial neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord. *J Neurosci* 26:1833-1843.
- Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, Hansson P, Hughes R, Nurmikko T, Serra J (2008) Neuropathic pain - Redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology* 70:1630-1635.
- Treede R (2008) Nociceptive Processing in the Cerebral Cortex. In: *The Senses, Volume 5* pp 670-691.
- Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, Inoue K (2003) P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424:778-783.
- Vargas-Espinosa ML, Sanmarti-Garcia G, Vazquez-Delgado E, Gay-Escoda C (2012) Antiepileptic drugs for the treatment of neuropathic pain: A systematic review. *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal* 17:E786-E793.
- Von Frey M (1896) Untersuchungen ueber die Sinnesfunctionen der Menschlichen Haut. *Abh sächs Ges (Akad) Wiss* 175-266.
- von Hehn CA, Baron R, Woolf CJ (2012) Deconstructing the Neuropathic Pain Phenotype to Reveal Neural Mechanisms. *Neuron* 73:638-652.
- Wagman IH, Price DD (1969) Responses of Dorsal Horn Cells of M Mulatta to Cutaneous and Sural Nerve A and C Fiber Stimuli. *J Neurophysiol* 32:803-&.
- Wall PD (1995) Pain in the Brain and Lower Parts of the Anatomy. *Pain* 62:389-391.
- Wallace VCJ, Norbury TA, Rice ASC (2005) Ultrasound vocalisation by rodents does not correlate with behavioural measures of persistent pain. *Eur J Pain* 9:445-452.
- Wang H, Peca J, Matsuzaki M, Matsuzaki K, Noguchi J, Qiu L, Wang D, Zhangn F, Boyden E, Deisserothl K, Kasai H, Hall WC, Feng G, Augustine GJ (2007) High-speed mapping of synaptic connectivity using photostimulation in Channel rhodopsin-2 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8143-8148.
- Wang T, Molliver DC, Jing XT, Schwartz ES, Yang FC, Samad OA, Ma QF, Davis BM (2011) Phenotypic Switching of Nonpeptidergic Cutaneous Sensory Neurons following Peripheral Nerve Injury. *Plos One* 6.

Wang Y, Wu J, Wu ZG, Lin Q, Yue Y, Fang L (2010) Regulation of AMPA receptors in spinal nociception. *Mol Pain* 6.

Ward JH (1963) Hierarchical Grouping to Optimize An Objective Function. *J Am Stat Assoc* 58:-301.

Watanabe M, Mishina M, Inoue Y (1994) Distinct Spatiotemporal Distributions of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor-Channel Subunit Messenger-Rnas in the Mouse Cervical Cord. *J Comp Neurol* 345:314-319.

Willis WD, Maunz RA, Foreman RD, Coulter JD (1975) Static and Dynamic-Responses of Spinothalamic Tract Neurons to Mechanical Stimuli. *J Neurophysiol* 38:587-600.

Willis WD, Trevino DL, Coulter JD, Maunz RA (1974) Responses of Primate Spinothalamic Tract Neurons to Natural Stimulation of Hindlimb. *J Neurophysiol* 37:358-372.

Willis WD, Westlund KN (1997) Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol* 14:2-31.

Wolstencroft JH (1964) Reticulospinal Neurones. *J Physiol* 174:91-&.

Woolf CJ, Mannion RJ (1999) Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 353:1959-1964.

Woolf CJ, Salter MW (2000) Neuroscience - Neuronal plasticity: Increasing the gain in pain. *Science* 288:1765-1768.

Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE (1992) Peripheral-Nerve Injury Triggers Central Sprouting of Myelinated Afferents. *Nature* 355:75-78.

Wu DF, Chandra D, McMahon T, Wang D, Dadgar J, Kharazia VN, Liang YJ, Waxman SG, Dib-Hajj SD, Messing RO (2012) PKC epsilon phosphorylation of the sodium channel Na(V)1.8 increases channel function and produces mechanical hyperalgesia in mice. *Journal of Clinical Investigation* 122:1306-1315.

Yaksh TL (1989) Behavioral and Autonomic Correlates of the Tactile Evoked Allodynia Produced by Spinal Glycine Inhibition - Effects of Modulatory Receptor Systems and Excitatory Amino-Acid Antagonists. *Pain* 37:111-123.

Yu XH, Da Silva AR, De Koninck Y (2005) Morphology and neurokinin 1 receptor expression of spinothalamic lamina I neurons in the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 491:56-68.

Yuste R (2005) Fluorescence microscopy today. *Nature Methods* 2:902-904.

Zeilhofer HU, Witschi R, Hosl K (2009) Subtype-selective GABA(A) receptor mimetics-novel antihyperalgesic agents? *Journal of Molecular Medicine-Jmm* 87:465-469.

Zeilhofer HU, Wildner H, Yevenes GE (2012) Fast Synaptic Inhibition in Spinal Sensory Processing and Pain Control. *Physiol Rev* 92:193-235.

Zeilhofer H, Benke D, Yevenes G (2011) Chronic Pain States: Pharmacological Strategies to Restore Diminished Inhibitory Spinal Pain Control. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*.

Zhang DX, Carlton SM, Sorkin LS, Willis WD (1990) Collaterals of Primate Spinothalamic Tract Neurons to the Periaqueductal Gray. *J Comp Neurol* 296:277-290.

Zhang ET, Han ZS, Craig AD (1996) Morphological classes of spinothalamic lamina I neurons in the cat. *J Comp Neurol* 367:537-549.

Zhang W, Liu LY, Xu TL (2008) Reduced potassium-chloride co-transporter expression in spinal cord dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity in rats. *Neuroscience* 152:502-510.

Zhang ZW, Burke MW, Calakos N, Beaulieu JM, Vaucher E (2010) Confocal analysis of cholinergic and dopaminergic inputs onto pyramidal cells in the prefrontal cortex of rodents. *Frontiers in Neuroanatomy* 4.

Zhu Y, Lu SG, Gold MS (2012) Persistent Inflammation Increases Gaba-Induced Depolarization of Rat Cutaneous Dorsal Root Ganglion Neurons in Vitro. *Neuroscience* 220:330-340.