

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives

THÈSE présentée par :
Clémence GIERÉ

soutenue le : **23 juin 2023**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Neurosciences**

**Intégration et plasticité de la
thermonociception spinale chez le rat**

THÈSE dirigée par :

Mr. POISBEAU Pierrick

PU, Université de Strasbourg, INCI, CNRS, UPR3212

RAPPORTEURS :

Mme DARNAUDERY Muriel

PU, Université de Bordeaux, NutriNeuro, INRAE1286

M. NOEL Jacques

PU, Université de Côte d'Azur, Institut de Pharmacologie
Moléculaire et Cellulaire, CNRS, UMR 7275

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme. KAUFLING Jennifer

PhD, Université de Strasbourg, INCI, CNRS, UPR3212

“There are some living things that need to pass through fire before they flourish.”

– Patrick Rothfuss

REMERCIEMENTS

Après 4 ans et une pandémie mondiale, la fin de cette thèse est arrivée, et avec celle-ci un certain nombre de personnes à remercier.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mes travaux de thèse : mes rapporteurs Pr. Muriel Darnaudery et au Pr. Jacques Noel. Merci au Dr. Jennifer Kaufling qui a pu suivre l'évolution de cette thèse depuis le début.

Un grand merci au Pr. Pierrick Poisbeau qui m'a donné l'opportunité de faire cette thèse. Depuis mon stage de Master 1, travailler dans votre équipe a toujours été un plaisir. Vous m'avez toujours laissé beaucoup d'indépendance et vous m'avez accordé une grande confiance quant à mes expériences, tout en ayant su me guider pendant les moments cruciaux. Je vous souhaite une bonne continuation dans la nouvelle direction que prend l'équipe !

Je souhaiterais également remercier les autres membres de l'équipe du 4^{ème} étage. Que ce soit pour discuter boulot, ou simplement faire une petite pause-café pour se détendre, ça a toujours été un plaisir d'aller bosser au labo à vos côtés. Merci à Meggane (membre honoraire de l'équipe dans nos cœurs) pour être un pilier de stabilité dès que l'on a une question ou un problème, ainsi qu'une très bonne amie en dehors du travail. Merci à Vincent pour toujours être de bons conseils, et d'une pertinence scientifique qui ne rate jamais. Merci à Yasmine, Hannah, Simon et Lisa, la relève de l'équipe est entre de bonnes mains !

Merci aux anciens membres de l'équipe qui ont fait un bout de voyage avec moi : Géraldine qui a été le meilleur guide qu'on pourrait demander lorsque je suis arrivée dans l'équipe, ainsi qu'une bonne compagne de bar ; Hervé, super compagnon de bureau, merci pour les conversations sur tout et rien (mais surtout rien !) ; Yannick et Guillaume, mes autres compagnons de bureau.

Je tiens également à remercier les membres du Chronobiotron qui s'occupent avec soins de nos animaux, Dom que j'ai appelé un nombre incalculable de fois pour m'aider à réparer mon set-up d'électrophy, Sophie, Stéphane, Edouard, Bruno et Antoine.

Merci à Clémence et Julien pour être de amis formidable sur lesquels je peux toujours compter. Vous êtes toujours dans mon cœur et je compte bien vous garder dans ma vie vous êtes coincés avec moi maintenant.

Un grand merci à tous les ami-es que j'ai pu rencontrer pendant cette thèse, et j'espère n'oublier personne. Je n'ai jamais été très douée pour exprimer mes émotions, donc vous m'excuserez si les remerciements sont concis. Je préfère dire les choses à voix haute, et de préférence avec une bière en main !

Léa et Damien, les deux expats maintenant au US, un grand merci à vous pour des supers moments passés ensemble. Merci à Mathilde et Cynthia pour votre compagnie, et votre compréhension durant ce dernier mois de rédaction. Merci à Louise et Fédérica qui ont toujours été d'un grand soutien, et à nos compagnons d'aventure pour se battre contre les dragons, Gilles, Benjamin et Charlotte. Merci à Camille, Marion et Léa pour ces soirées de danses contemporaines, je pense qu'on devrait être les backups danseurs de Sia. Une pensée pour les ami-es qui sont déjà, ou vont bientôt passer par ce même process : Angel, Sarah, Patrick, Robin, Noémie. Et enfin un énorme merci à Doctoneuro et aux membres du bureau au cours des 3 années passées avec vous.

I am going to switch in English to thank a group of people that will most likely never read this manuscript on the account that it is 1) about neuroscience and 2) in french. Thank you to the Menagerie members for being good friends that I can always count on to play games, watch movies or just be silly in general, and particularly Kodi for those last few months.

Enfin je tiens à remercier chaleureusement ma famille : Monmon et Danielle, Mamou, mes frères et sœurs Thomas, Pierre-Alexandre et Clothilde, mon chat Léonard qui est d'une grande aide au moral sans même le savoir, et surtout mes parents qui m'ont permis de faire le parcours académique que je souhaitais avec un support inébranlable. Vous avez toujours cru en moi, et j'espère vous rendre fiers.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	I
TABLE DES MATIERES	III
Liste des figures et tables	V
Liste des abréviations	VII
Contributions scientifiques	IX
I. INTRODUCTION	0
A. Partie 1 : Nociception et douleur : du codage à la réponse comportementale.....	1
1. Définition	1
2. Les théories de la douleur	3
3. Les neurones afférents primaires.....	8
4. La moelle épinière : premier relais des informations nociceptives	10
5. Intégration sous corticale et corticale.....	17
6. Contrôles descendants.....	19
B. Partie 2 : Evaluation comportementale de la nociception et de la douleur chez l'animal	23
1. Les tests nociceptifs.....	23
2. Les tests de préférence de place.....	27
3. Les modèles animaux	31
C. Partie 3 : Thermonociception.....	39
1. Détection périphérique	39
2. Intégration spinale.....	47
3. Intégration sous-corticale et corticale	48
D. Objectifs de la thèse	52
II. MATERIEL ET METHODES	55
A. Modèles animaux.....	55
1. Stress précoce : La séparation maternelle néonatale	55
2. Induction d'une douleur neuropathique : Construction chronique du nerf sciatique.....	56
3. Induction d'une douleur inflammatoire : injection intraplantaire de CFA.....	58
B. Evaluation comportementale.....	58
1. Mesure de la sensibilité nociceptive somatique	58
2. Test de conditionnement de double-aversion	61
C. Traitements pharmacologiques pour le test du SADAC.....	62
1. Injections sous-cutanée.....	62
2. Molécules injectées.....	63
D. Enregistrements électrophysiologiques	63

1. Chirurgie	63
2. Protocoles de stimulation	64
3. Analyse électrophysiologique	66
E. Mesure de l'expression des gènes par RT-qPCR	68
F. Analyses statistiques	69
III. RESULTATS.....	70
A. Article 1 : L'intégration spinale de stimulations nociceptives chaude des froides par les neurones à large bandes passantes chez le rat anesthésié	71
B. Article 2 : Vers une origine centrale de l'hypersensibilité nociceptive de rats adultes après une séparation maternelle néonatale.....	81
C. Article 3 : Entre Scylla et Charybdis : Une procédure de conditionnement sensori-affective de double aversion pour évaluer les aspects multidimensionnels de la douleur chez le rat	101
IV. DISCUSSION	124
A. Intégration thermique différentielle par les neurones convergents des couches profondes de la CDME	125
B. Impact d'une séparation maternelle néonatale sur l'intégration thermonociceptive des neurones WDR des couches profondes de la CDME.....	131
C. Evaluation multidimensionnelle de la douleur par un test de conditionnement de place thermique.....	135
PAPIERS COMPLEMENTAIRES ET REVUES	131
Références	160

Liste des figures et tables

FIGURES

Figure 1 : Dissociation douleur et nociception.....	2
Figure 2 : Classification des douleurs	3
Figure 3 : Concept des chemins de la douleur de Descartes.....	4
Figure 4 : Les théories de la douleur	6
Figure 5 : Marquage de fibres C peptidergiques et non peptidergiques	10
Figure 6 : Les couches de Rexed de la moelle épinière.....	12
Figure 7 : Organisation des projections cutanées dans la corne dorsale de la moelle	14
Figure 8 : Schéma de l'innervation théorique des neurones WDR	15
Figure 9 : Illustration de la réponse d'un neurone WDR en réponse à des stimulations électriques..	17
Figure 10 : Schéma conceptuel de l'intégration corticale.....	21
Figure 11 : Schéma de l'intégration corticale.....	22
Figure 12 : Tests nociceptifs mécaniques.....	24
Figure 13 : Tests nociceptifs thermique au chaud	26
Figure 14 : Le système de conflit mécanique	29
Figure 15 : Schéma de l'inflammation neurogénique	33
Figure 16 : Représentation de différents modèles de lésion ou compression du nerf.....	35
Figure 17 : Conséquences d'une SMN sur le système nociceptif.....	38
Figure 18 : Structure du canal TRPV1	40
Figure 19 : Les thermorécepteurs de la superfamille des TRP	45
Figure 20 : La transmission thermique cutanée	46
Figure 21 : Intégration différentielles des informations thermiques dans le cortex insulaire.....	49
Figure 22 : Schéma de la détection et de l'intégration des sensations thermiques chez l'Homme	51
Figure 23 : Modèle neuropathique du « cuff »	56
Figure 24 : Hypersensibilités nociceptives des rats « cuff ».....	57
Figure 25 : Modèle inflammatoire au CFA	58
Figure 26 : Test de la pince calibrée	59
Figure 27 : Tests nociceptifs au chaud	60
Figure 28 : Image du « Sensory Affective Double Avoidance Conditioning » test et de la procédure	62

Figure 29 : Dispositif expérimental permettant les enregistrements électrophysiologiques extracellulaires	64
Figure 30 : Thermode de stimulation micropeltier TCSII	65
Figure 31 : Exemple de trace électrophysiologique filtrée par Spike 2.....	67
Figure 32 : Analyse individuelle des deux neurones détectés	67
Figure 33: Illustration de la réponse thermique de fibres dans le nez du chat.....	127
Figure 34 : Schéma hypothétique de la transmission des informations thermiques	130
Figure 35 : Schéma hypothétique de l'impact de la SMN sur la transmission sensorispinale nociceptive	134

TABLES

Table 1 : Protocoles de stimulations thermiques et paramètres mesurés	66
Table 2 : Amorces des gènes d'intérêt	68

Liste des abréviations

ANO1 :	Anoctamine 1
C :	Cold, neurones sensibles au froid
CCA :	Cortex cingulaire antérieur
CCI :	Chronique constriction injury
CDME :	Corne dorsale de de la moelle épinière
CFA :	Adjuvant complet de Freund
CGRP :	Calcitonin Gene Related Peptide
CIDN :	Contrôles Inhibiteurs Diffus Nociceptifs
CPF :	Cortex préfrontal
Cox-2 :	Cyclooxygénase 2
CPM :	Conditioned Pain Modulation
CR :	Champ récepteur
DZP :	Diazépam
ETX :	Etifoxine
FAP :	Fibres afférentes primaires
GABA :	Acide γ -aminobutyrique
GDNF :	Facteur de croissance dérivé des cellules gliales
GRD :	Ganglions rachidiens dorsaux
H :	Heat, neurones sensible au chaud
HPC :	Neurones Heat-Pinch-Cold
HPRT :	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase
IB4 :	Isolectine B4
IL :	Interleukines
K _v 1.2 :	Canal potassium voltage dépendant 1.2
M :	Mechanical, neurones sensibles aux stimulation mécaniques
Na _v 1.8 :	Canal sodium voltage dépendant 1.8
NGF :	Nerve growth Factor
NK1R	Récepteur à la neurokinine 1
NON-S :	Non nociceptif spécifique
NS :	Nociceptif spécifique
NTS :	Noyau du tractus solitaire
OT :	Ocytocine
PA :	Potentiel d'action

PB :	Noyau parabrachial
PPC :	Préférence de Place Conditionnée
PVL :	Noyau postéro-ventro-latéral du thalamus
PVM :	Noyau ventro-postéro-médial du thalamus
RVM :	Medulla rostroventrale
SADAC :	Sensory Affective Double Avoidance Conditioning
SCM :	Système de conflit mécanique
SGPA :	Substance Grise Périaqueducale
SI/SII :	Les cortex somatosensoriels I et II
SMN :	Séparation maternelle néonatale
SP :	Substance P
TGF :	Facteur de croissance tumorale
TNF :	Facteur de nécrose tumorale
TRL :	Toll like receptor
TRPA :	Transient Receptor Potential à Ankyrine
TRPM :	Transient Receptor potential à Melastatine
TRPV :	Transient Receptor Potential Vanilloïd
VMPo :	Noyau ventro-médial postérieur du thalamus
WDR :	Wide Dynamic Range

Contributions scientifiques

Liste des publications

- *Article de recherche dans des journaux à comités de lecture*

Giere, C., Melchior, M., Dufour, A. & Poisbeau, P. (2021) Spinal integration of hot and cold nociceptive stimuli by wide-dynamic-range neurons in anesthetized adult rats. *Pain Rep*, **6**, e983.

Gazzo, G., Melchior, M., Caussaint, A., **Giere, C.**, Lelievre, V. & Poisbeau, P. (2021) Overexpression of chloride importer NKCC1 contributes to the sensory-affective and sociability phenotype of rats following neonatal maternal separation. *Brain Behav Immun*, **92**, 193-202.

- *Article de revue en français dans des journaux à comités de lecture*

Gieré, C., Dutertre, S. & Poisbeau, P. (2019) Les cônes marins, une ressource naturelle d'antalgiques venue du fond des mers : au-delà du ziconotide ? *Douleur et Analgésie*, **32**, 196-204

- *Article en préparation :*

Gieré C., Menger Y., Lelièvre V., Melchior M., Poisbeau P, Towards a central origin of nociceptive hypersensitivity seen in adult rats after a neonatal maternal separation

Gieré C., Caussaint A, Gazzo G, Poisbeau P, Between Scylla and Charybdis: A sensori-affective double avoidance conditioning testing procedure (SADAC) to assess the multidimensional aspects of pain behaviors in rats

Présentation de posters

- **Congrès Neurofrance 2021**, du 19 au 21 mai (colloque virtuel) :

Giere, C., Melchior, M., Dufour, A. & Poisbeau, P, Intégration spinale de la thermonociception chez le rat

- **FENS Forum 2022**, du 9 au 13 juillet à Paris :

Giere, C., Melchior, M., Dufour, A. & Poisbeau, P, Spinal coding of thermonociception in adult Wistar rat

Communications orales

- *Conférences invitées*

31th Ion Channels Meeting, 11-14 Septembre 2022, Domaine du Lazaret, Sète, France

Clémence Gieré (Strasbourg, France) : Towards a central origin of nociceptive hypersensitivity seen in adult rats after a neonatal maternal separation

22^{ème} Congrès National de la SFETD, 16-18 novembre, Grand Palais de Lille, France

Clémence Gieré (Strasbourg, France) : Impact d'une séparation maternelle néonatale sur l'intégration thermonociceptive spinale chez le rat

Prix et distinctions

- **2022 : Prix pour la meilleure présentation orale**

Symposium 3: "Ion channel and pain processing", 31^{ème} Congrès des Canaux Ioniques 2022

I. INTRODUCTION

A. Partie 1 : Nociception et douleur : du codage à la réponse comportementale

Pour revues intégrées → (Bonica, 1990; Millan, 1999)

1. Définition

En 2020, l'International Association for the Study of Pain révisé pour la première fois la définition de la douleur. Ainsi, la douleur anciennement décrite comme :

Une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à une lésion tissulaire réelle, potentielle ou décrite en ces termes par le patient (1979).

Devient :

Une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à, ou ressemblant à celle associée à, une lésion tissulaire réelle ou potentielle (Raja et al., 2020).

Cette révision et mise à jour de la définition douleur, c'est une tentative de **donner un sens à la douleur**. On donne un nom et une définition à quelque chose que l'on connaît. Pouvoir mettre des mots sur un phénomène, c'est déjà rassurant. Il est ainsi intéressant de noter à quel point le concept de « douleur » a pu évoluer au cours du temps en parallèle de notre compréhension de ses mécanismes sous-jacents.

La douleur est une sensation et émotion complexe issue de l'intégration corticale de stimulations potentiellement dangereuses pour l'organisme. La capacité d'un organisme à détecter des stimulations menaçant son intégrité est donc essentielle à sa survie et à son adaptation face à son environnement. Souvent qualifiée de « **sonnette d'alarme** », la douleur a un rôle utile de protection, du moins lorsque celle-ci est aiguë et de courte durée (< trois mois). On parle également de **douleur physiologique**.

A l'inverse, la **douleur chronique**, se distingue par une persistance pendant plus de trois mois, une pharmacorésistance aux traitements antalgiques classiques et est souvent accompagnée de comorbidités psychiatriques débilantes. Pouvant découler d'une lésion tissulaire (douleur chronique nociceptive), d'une atteinte du système nerveux (douleur neuropathique) ou d'une étiologie encore aujourd'hui indéfinie (douleur nociplastique), elle est considérée depuis 2019 comme une maladie à part entière dans Classification Internationale des Maladies (CIM-11) de l'Organisation Mondiale de la Santé.

La douleur, dans sa perception et son expression, est placée sous le contrôle d'un système nerveux spécifique appelé **système nociceptif** (du latin *nocere*, « nuire » et *capere* « recevoir »). Il est responsable de la détection et de l'encodage d'un grand nombre de stimulations internes (innervation viscérale) et externes (innervation cutanée) comme la déformation mécanique, les changements thermiques ou encore l'irritation par des produits chimiques. Cependant, si nociception et douleur sont étroitement liées, elles peuvent être dissociées : une douleur peut être ressentie sans nociception au préalable et inversement le système nociceptif peut être activé sans l'apparition de douleur.

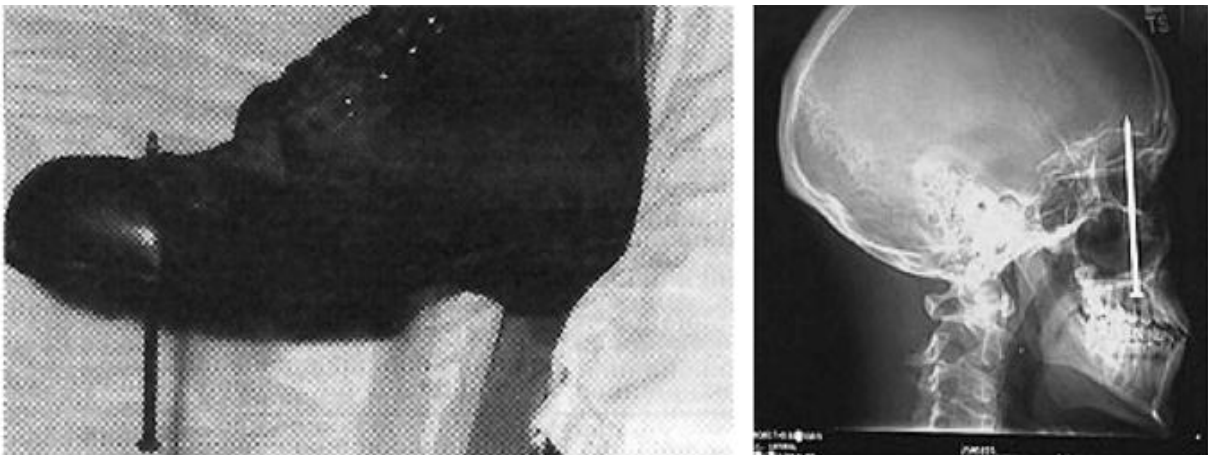


Figure 1 : Dissociation douleur et nociception (Dimsdale & Dantzer, 2007)

La photo de gauche est issue d'un cas clinique reporté par (Fisher *et al.*, 1995) dans lequel un homme a reporté ressentir une douleur immense après être tombé sur un clou qui a percé sa botte, nécessitant une sédation dans la salle des urgences. Lorsque la botte a été retirée, il s'est avéré que le clou était miraculeusement passé entre les doigts de pieds de cet homme.

La photo de droite vient d'un article de *USA Today* qui décrit un ouvrier du bâtiment qui s'est accidentellement tiré dessus avec un pistolet à clou sans le remarquer. Il est allé consulter le dentiste 6 jours plus tard en se plaignant d'une douleur au dents.

La douleur est classiquement identifiée selon ses différentes composantes i) la composante sensori-discriminatrice qui encode un stimulus de forte intensité selon sa qualité, durée, localisation et intensité (i.e **nociception**), ii) la composante **affective** sous-jacente à l'aspect émotionnel désagréable de l'expérience douloureuse, iii) la composante **cognitive** qui réfère à la mémorisation de l'expérience et de l'importance qu'elle lui est donnée et enfin iv) **la réponse comportementale** en réponse à la douleur, qui peut être consciente ou inconsciente.

La prise en compte de ces différentes composantes est donc indispensable pour tenter d'établir une définition exhaustive de la douleur, ainsi que dans les démarches qui visent à la traiter.

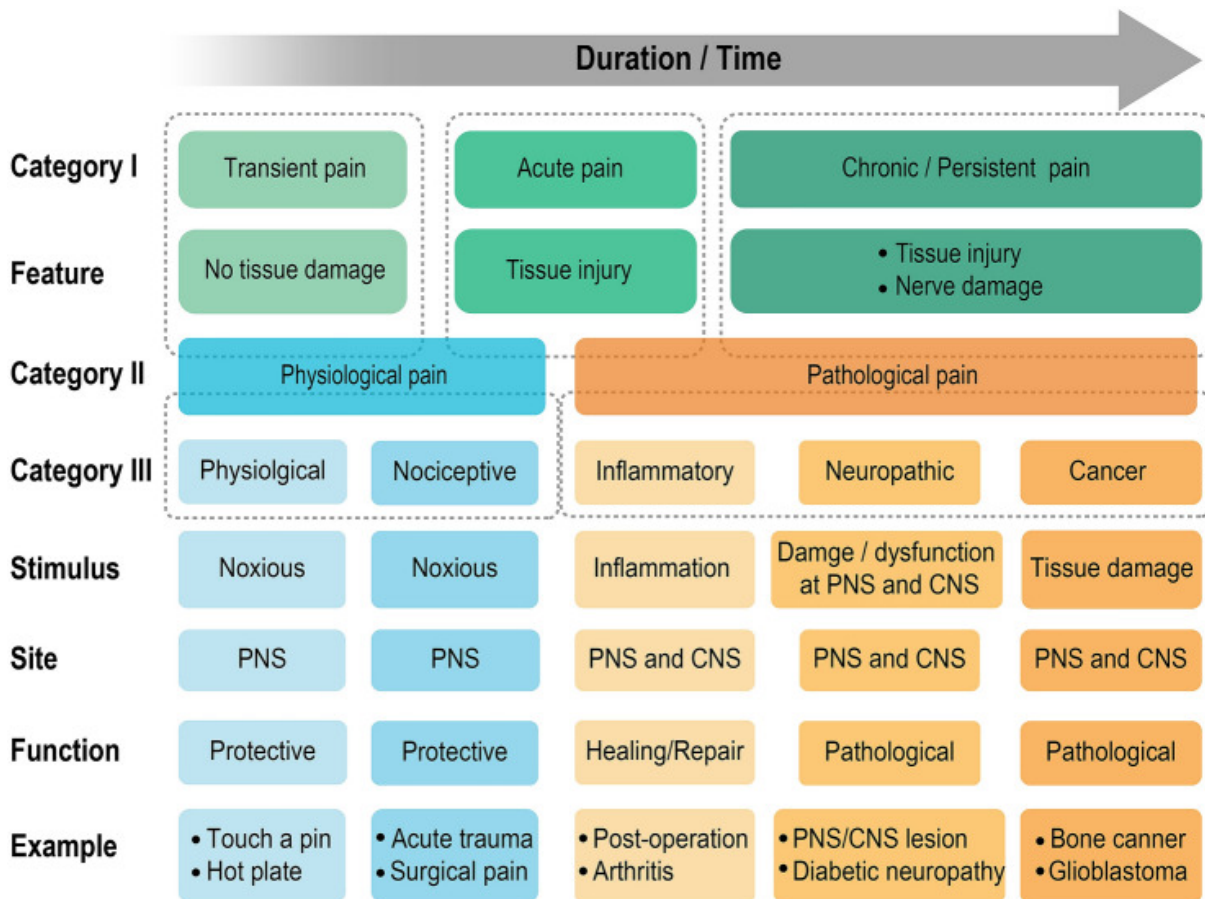


Figure 2 : Classification des douleurs (Xiao et al., 2021)

Classification des douleurs et de leurs caractéristiques principales. La catégorie I est caractérisée par sa durée (transitoire, aiguë, chronique/persistante). La catégorie II est fondée sur la nature et fonction du stimulus initiateur. La douleur physiologique est associée à un rôle protecteur, est subdivisée en douleur physiologique et nociceptive et est prise en charge par le système nerveux périphérique (PNS). La douleur pathologique inclut les douleurs inflammatoires, neuropathiques et cancéreuses, et est prise en charge à la fois par le PNS et le système nerveux central (CNS).

2. Les théories de la douleur

Depuis la naissance de la Civilisation, la douleur a fait l'objet d'un effort ubiquitaire pour la comprendre et la contrôler. La volonté de trouver une origine à cette affliction est d'un intérêt majeur tout au long de l'Histoire. En Ancienne Egypte, la douleur a une origine divine et spirituelle, en Ancienne Inde, la douleur est une sensation universelle, inhérente à la vie qui prend naissance dans le cœur, en Chine, c'est la perturbation des 14 méridiens où coule l'énergie vitale qui provoque la maladie et la douleur. En Grèce Antique déjà, elle englobe la composante sensorielle, où par exemple pour Aristote, la douleur est la sensation de toucher exacerbée, ainsi qu'une composante émotionnelle, une expérience de l'âme qui réside dans le cœur (Bonica, 1990).

C'est Descartes au courant du 17^{ème} siècle qui défend l'idée que le siège des sensations et des capacités motrice est le cerveau et non le cœur, et propose la théorie de « tubes nerveux » qui conduisent les informations des tissus et de la peau jusqu'au cerveau.



Figure 3 : Concept des chemins de la douleur de Descartes (Descartes, 1664)

Illustration du chemin de la douleur. Le feu (A) est capable de stimuler les nerfs du pied (B) par l'intermédiaire de « petit filets » (C) qui tire l'autre bout de la cloche (D) au niveau de l'entrée du pore (E). L'esprit (F) de l'organisme est ensuite capable de commander les muscles du pied pour s'éloigner du feu.

a) *Théorie de la spécificité*

Dans la continuité du courant de pensée de Descartes, la **Théorie de la Spécificité** est formulée par Moritz Schiff (Schiff, 1858). D'après celle-ci, le système sensoriel se spécifie selon les modalités sensorielles. Ainsi, les récepteurs au chaud, au froid, sensibles aux agents chimiques, aux informations tactiles et à la douleur sont individuellement identifiables et sont responsables de la transmission de cette information au travers le système nerveux par des **chemins spécifiques**. La douleur, détectée par un système spécialisé, est proportionnelle à l'intensité du stimulus qui l'a provoquée. Si cette théorie est basée sur des observations physiologiques qui se sont avérées plus tard suite à des études moléculaire et électrophysiologiques (existence de récepteurs thermiques dont certains sont spécifiques, système nociceptif qui passe par une transmission des fibres spécialisées), elle n'est pas capable d'expliquer certains phénomènes, notamment le syndrome du « membre fantôme » où la douleur existe alors que le membre supposé la causer a été amputé. Ainsi, l'origine de la douleur ne résiderait pas dans l'endroit lésé, mais serait formée dans un autre endroit du corps.

b) *Théorie des patrons de décharges*

Vers la fin du 19^{ème} siècle, une autre théorie soutenue par Alfred Goldscheider, **la Théorie des patrons de décharges ou « Pattern Theory »**, émerge et propose qu'un même récepteur sensoriel pourrait provoquer une sensation douloureuse ou non selon le **profil de décharge émis** par les neurones. Ce profil changerait selon l'intensité, la durée ou simplement la répétition (i.e sommation temporelle) de la stimulation. Par exemple, une stimulation chaude non douloureuse peut le devenir si elle est répétée sur le même champ récepteur (CR) provoquant ainsi une sensation de brûlure. Les mêmes neurones sont activés, mais la fréquence de décharge qui augmente change la nature de la sensation perçue (Moayed & Davis, 2013). Cette théorie propose également que les récepteurs de la douleur ne sont pas spécifiques mais partagés avec d'autres systèmes. Par exemple le récepteur Transient Receptor Potential Vanilloid de type 1 (TRPV1) est un acteur majeur de la détection du chaud nociceptif dont le ligand naturel, la capsaïcine, est responsable de la sensation de brûlure provoquée par le piment.

La douleur serait donc un résultat non seulement de l'intensité de la stimulation mais également de la sommation centrale des informations détectées par les fibres sensorielles (Marchand, 2020).

c) *Théorie du portillon*

En 1965, Melzack et Wall introduisent la théorie du portillon, ou « **Gate Control Theory** » qui révolutionne la communauté de la recherche sur la douleur. Prenant appui sur les théories de Spécificité et des « *Pattern* », ils suggèrent que la couche II de Rexed (Rexed, 1954), au sein de la substance grise dorsale (i.e *substantia gelatinosa*) de la moelle épinière, constitue **une porte de contrôle pour la transmission des informations nociceptives**. L'activité électrique des fibres de gros diamètre A β fermerait l'entrée et bloquerait la transmission des informations nociceptives, à la différence des fibres nociceptives de petit diamètre A δ et C qui l'ouvriraient.

Lorsque l'activité des fibres nociceptives de petit diamètre prennent le dessus sur l'activité inhibitrice, la « porte s'ouvre » et la transmission douloureuse est activée. Ils introduisent également la notion de **contrôles descendants** qui moduleraient l'activité de cette « porte de contrôle » (Melzack & Wall, 1965). Selon cette théorie, la stimulation des fibres non nociceptives pourrait ainsi inhiber la transmission nociceptive à l'entrée de la moelle épinière et a été la base de développement de plusieurs techniques à visée antalgique reposant sur la stimulation de voies non-nociceptives par neurostimulation électrique transcutanée, ou par stimulation trans-crânienne à courant direct (Marchand, 2020).

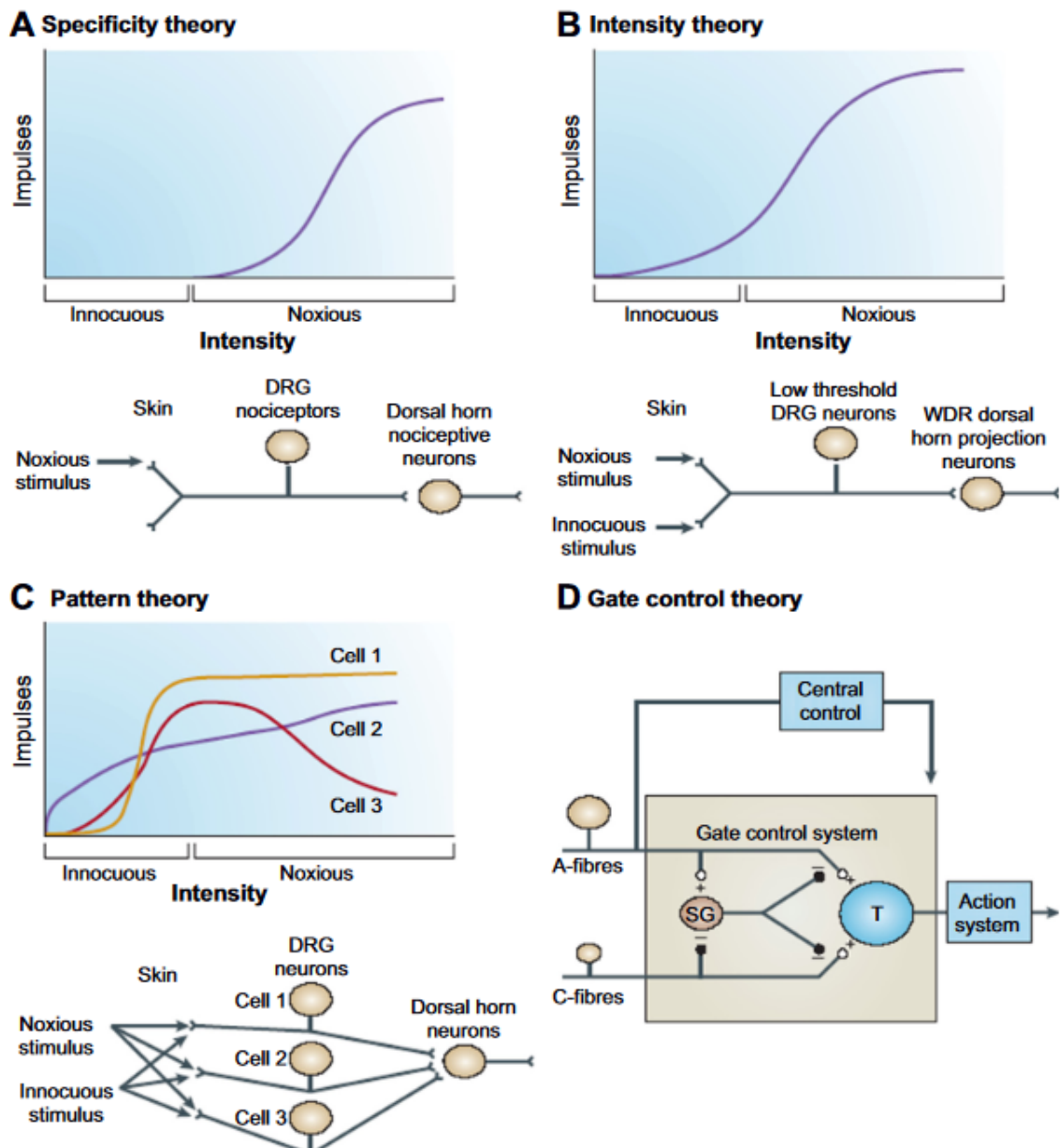


Figure 4 : Les théories de la douleur (Moayedi & Davis, 2013)

Schéma des différentes théories de la douleur. (A) Théorie de la spécificité, avec la modalité nociceptive encodée de manière séparée des sensations non nociceptives. (B) Théorie de l'intensité sans voies spécifiques pour la nociception, basée uniquement sur des stimulations à bas et haut seuil d'activation. (C) La théorie des patrons de décharge, où les neurones sensoriels répondent à des *stimulus* d'intensité variable. La modalité et localisation du *stimulus* sont encodées par la résultante de l'activité des neurones. (D) Théorie du portillon ou les fibres sensorielles nociceptives et non nociceptives font synapse au niveau de la substance gélatineuse (SG) de la ME. La stimulation des fibres A augmente l'activité inhibitrice sur les cellules de la SG et réduit l'activité des cellules T recevant les informations nociceptives.

d) *Les Contrôles Inhibiteurs Diffus Nociceptifs*

Dans la continuité de ces concepts, à la fin des années 60, Reynolds met en évidence la présence de **contrôles descendants** précédemment théorisés. Sur animaux non anesthésiés, la stimulation électrique de la Substance Grise Périaqueducule (SGPA) permet une anesthésie et analgésie suffisante pour effectuer une laparotomie sans provoquer de réflexes nociceptifs (Reynolds, 1969). Cette découverte ouvre la voie de la caractérisation des contrôles de la douleur, **permettant de moduler l'information nociceptive** afférente.

Basé sur l'aphorisme d'Hypocrate en 450 av JC, « *Si deux douleurs éclatent à la fois dans des lieux différents, la plus forte obscurcit la plus faible* », Daniel LeBars introduit ainsi le concept des **Contrôles Inhibiteurs Diffus Nociceptifs (CIDN)** en montrant que durant une stimulation nociceptive, l'application d'une seconde stimulation de forte intensité sur un CR distant du premier bloque l'activité initiale en recrutant des contrôles inhibiteurs pour produire une hypoalgésie diffuse locale (Le Bars *et al.*, 1979)

e) *La Pain Matrix*

De nos jours, notre compréhension des mécanismes sous-jacents à la douleur ne cesse d'évoluer et d'être mise à jour. Parmi les énigmes encore insolubles, il y a la question de la **neuromatrice de la douleur** ou « *Pain Matrix* ». Ce concept propose qu'il existe une « signature » spécifique de la douleur au sein des structures du système nerveux central. Il vise par exemple à identifier les différentes régions corticales et sous corticales impliquées dans l'intégration de la douleur. Initialement, la neuromatrice n'est pas spécifique à la douleur mais décrit un réseau fonctionnel de neurones dans tout le cerveau qui serait le substrat anatomique de « la sensation physique du Soi » (Melzack, 1990).

Le développement de techniques d'imagerie a plus tard permis l'identification de **zones cérébrales impliquées dans l'intégration des différentes composantes de la douleur** (Marchand, 2020), comprenant un grand nombre de structures décrites plus loin dans ce manuscrit. **La définition exacte de la « Pain Matrix » ne fait cependant pas consensus** : pour certains la douleur serait la résultante émergente de son activation, pour d'autres, ses différentes structures seraient sub-spécialisées pour chaque composante de la douleur où par exemple les voies latérales sont responsables de la composante sensori-discriminative tandis que les voies médiales prennent en charge la composante émotionnelle et affective. De plus, si les structures cérébrales qui la composent sont indéniablement impliquées dans l'intégration de la douleur, elles ne lui sont pas spécifiques (Iannetti & Mouraux, 2010).

Les courants de pensées relatifs à la douleur et les tentatives de lui donner une définition évoluent donc de concert avec les avancées biotechnologiques qui permettent d'affiner notre compréhension des mécanismes sous-jacent à l'élaboration de la sensation et de l'émotion douloureuse. L'étude de ces mécanismes et la compréhension des structures clés dans le processus douloureux est d'autant plus importante quand ceux-ci dysfonctionnent, et que la douleur devient maladie.

3. Les neurones afférents primaires

En périphérie, les axones des neurones sensoriels ou « **fibres afférentes primaires** » (**FAP**), ou encore « nocicepteurs », sont les premiers acteurs de la détection des **stimulations potentiellement dangereuses pour l'organisme**. Décrites pour la première fois en 1903 par Sherrington (Sherrington, 1903), ces nocicepteurs sont caractérisés par un **haut seuil d'activation** nécessaire pour évoquer une activité électrique après stimulation des FAP ou des corps cellulaires. A l'exception du cartilage, de la plèvre viscérale, des poumons, du péricarde et du cerveau, ces fibres sensorielles innervent tous les tissus et organes. Le système nociceptif étant remarquablement bien conservé au cours de l'évolution, la morphologie des terminaisons nerveuses nociceptives sont comparables entre l'Homme et le rongeur (Andrew & Greenspan, 1999).

Les neurones sensoriels, également dits « pseudo-unipolaires », dont le corps cellulaire se trouve dans les **ganglions rachidiens dorsaux (GRD)**, ont historiquement été classés selon leur propriétés morphologiques (diamètre du corps cellulaire et de l'axone, myélinisation), selon des critères neurochimiques (expression de protéines spécifiques, neurotransmetteurs et neuropeptides produits, sensibilité vis-à-vis de facteurs de croissance) ou encore selon leurs propriétés fonctionnelles (patrons de décharge, excitabilité, vitesse de conduction, ...) dont la sensibilité aux stimulations mécaniques (M), thermiques chaud (H, heat) ou froid (C, cold) et polymodales, ou chimiques.

a) Les fibres A β

Les fibres axonales issues des neurones sensoriels A β sont de gros diamètre (5-12 μ m) et **fortement myélinisées**. Elles véhiculent les potentiels d'action (PA) avec une haute vitesse de conduction (30-90m/s). À bas seuil d'activation, elles prennent en charge les informations non nociceptives. Cependant, les études princeps qui se sont intéressées aux fibres nociceptives et à leur vitesse de conduction révèlent tout de même l'existence de fibre de types A répondant à des stimuli de forte intensité dont la vitesse de conduction pourrait correspondre à des fibres A β (chez le chat 8% (Burgess & Perl, 1967; Burgess *et al.*, 1968) et 20 % chez le rat (Djoughri & Lawson, 2004)). La confusion découle du fait que les vitesses de conduction des fibres A β les plus lentes chevauchent le spectre des vitesses de conduction les plus hautes des fibres A δ , sans possibilité claire de pouvoir différencier les deux. Il

est donc possible que **le rôle des fibres Aβ dans la transmission nociceptive a été sous-estimé** (Djouhri & Lawson, 2004).

Il est en effet notable que ces fibres sont soupçonnées d'être impliquées dans les allodynies (douleur provoquée par un *stimulus* qui ne l'est pas en condition normale) mécaniques dans les cas de pathologiques comme les douleurs neuropathiques suite à une sensibilisation centrale (Devor, 2006).

b) Les fibres Aδ

Les fibres Aδ sont **moyennement myélinisées** (diamètre de 1 à 5μm) et conduisent à la fois des informations nociceptives et non nociceptives. De par leur rapide vitesse de conduction (12 à 40m/s), ces fibres sont responsables de la détection et transmission de la **douleur « rapide »** ou la douleur « première ». Ces fibres sont sensibles à toutes les modalités et sont distinguées en deux catégories électrophysiologiques (Basbaum *et al.*, 2009) :

- Les fibres **Aδ de type I** sont activées par des stimulations mécaniques, chimiques et thermiques et possèdent un seuil d'activation mécanique bas. Ces fibres sont responsables de la douleur « rapide » mécanique. Si leur seuil thermique chaud est relativement haut (>50°C), suite à une stimulation prolongée, les fibres vont devenir plus sensibles comme l'atteste la baisse de leur seuil d'activation (autour de 47°C). Elles sont donc partiellement responsables de l'hyperalgésie (sensation de douleur exacerbée) au chaud causée par une exposition thermique prolongée.
- Les fibres **Aδ de type II**, à l'inverse, ont un seuil thermique chaud plus bas (43°C) ainsi qu'un seuil mécanique élevé, et conduisent donc la douleur rapide chaude.

Les fibres Aδ sont majoritairement sensibles aux stimulations mécaniques et thermiques chaudes (A-M, A-H et A-MH) mais certaines sont également répondantes au froid nociceptif (Dubin & Patapoutian, 2010).

c) Les fibres C

La majorité des petites fibres C **amyéliniques** (0.02-1.5μm) transmettent des informations nociceptives avec une faible vitesse de conduction (0.5-2m/s) et sont responsables de la sensation de **douleur « secondaire »** ou **douleur « lente »**. Les fibres C les plus communes sont des fibres **polymodales** (C-MH, C-MC, C-MHC), bien qu'il existe des fibres spécifiques pour la détection du chaud nociceptif (C-H, 10%). Il existe également une sous population de fibres normalement non répondantes aux stimulations mécaniques et chaudes, dites « **fibres silencieuses** » (C-M_iH_i) qui deviennent excitables dans le cas d'une lésion ou d'inflammation (Schmidt *et al.*, 1995).

Les fibres C sont divisées en **deux sous-catégories** selon leurs propriétés neurochimiques (Snider & McMahon, 1998): i) les fibres **C peptidergiques** qui produisent de la Substance P (SP) et le Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP), expriment le récepteur kinase A de la tropomyosine et qui répondent au facteur de croissance nerveux (NGF, Nerve Growth Factor) (Verge *et al.*, 1989) et ii) les fibres **C non peptidergiques** caractérisées par leur expression de l'isolectine B4 (IB4), expriment la neutrophine c-Ret et le récepteur α du facteur de croissance dérivé des cellules gliales (GDNF) ainsi que le récepteur purinergique P2X₃ (Molliver *et al.*, 1997).

Il est également intéressant de noter que, si par simplicité ou abus de langage, les fibres C sont considérées comme étant toutes nociceptives, il existe tout de même une sous population de ces fibres (environ 10%) qui possèdent un **seuil mécanique d'activation bas**, et sont impliquées dans le toucher dit « plaisant » (Hazard *et al.*, 2022)

D'anciennes études de marquages et d'électrophysiologie, estiment qu'environ **70% des neurones** situés dans les GRD sont des neurones de petits diamètres faiblement ou non myélinisés (i.e fibres A δ ou C), et sont considérés comme des nocicepteurs (Davis *et al.*, 2000).

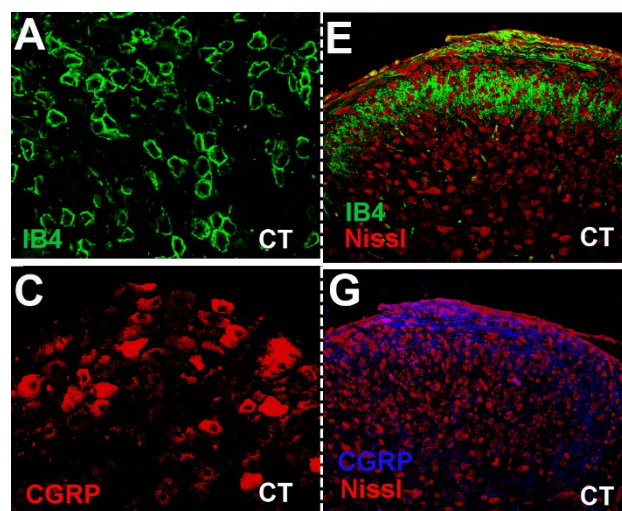


Figure 5 : Marquage de fibres C peptidergiques et non peptidergiques adapté de (Juif *et al.*, 2016)
 Marquage de neurones non peptidergiques (IB4) dans le GRD (A) et cornue dorsale de la moelle épinière (E) de rats. Marquage de neurones peptidergiques (CGRP) dans les GRD (C) et cornue dorsale de la moelle épinière (G) de rat.

4. La moelle épinière : premier relais des informations nociceptives

Les afférences primaires provenant de la périphérie font synapse dans la substance grise de la cornue dorsale de la moelle épinière (CDME) selon une **somatotopie spécifique** dans le cas de l'innervation cutanée. La CDME forme un réseau complexe d'intégration qui encore à ce jour reste mal défini, et joue un rôle essentiel dans l'intégration première des informations venant des FAP ainsi qu'un rôle de

transmission de l'intégration *via* des **neurones secondaires de projection** qui envoient les informations dans les régions supraspinales (Todd, 2010). Au sein de ce réseau, la balance inhibition/excitation est cruciale au bon fonctionnement de l'intégration nociceptive qui donnera naissance, après intégration corticale, à la **sensation douloureuse**.

a) Organisation de la corne dorsale moelle épinière

Chez l'homme comme chez le rongeur, **la moelle épinière est segmentée** selon la partie du corps innervée avec des segments cervicaux, thoraciques, lombaires et sacrés. Les corps cellulaires des neurones forment la substance grise, reconnaissable en coupes histologiques transversales par la forme caractéristique de papillon. Leurs axones forment la substance blanche. Les neurones situés dans la **partie dorsale** reçoivent les **informations sensorielles** tandis que les neurones de la partie ventrale sont principalement les motoneurones qui innervent les muscles. Ces deux parties, bien que fonctionnellement différentes, restent liées par des interneurones qui sont notamment responsables des boucles de reflexes qui ne passent par les zones supraspinales pour déclencher une contraction musculaire (i.e interneurones de Renshaw).

La substance grise est subdivisée en **couches longitudinales** décrites initialement chez le chat par Bror Rexed (Rexed, 1954) en fonction des différents types de neurones identifiés. Il proposa un système de classification de **10 couches** numérotées de I à X encore utilisé à ce jour. La corne dorsale s'étend des couches I à VI et la corne ventrale comprend les couches VII et à IX, avec la couche X située autour du canal de l'épendyme.

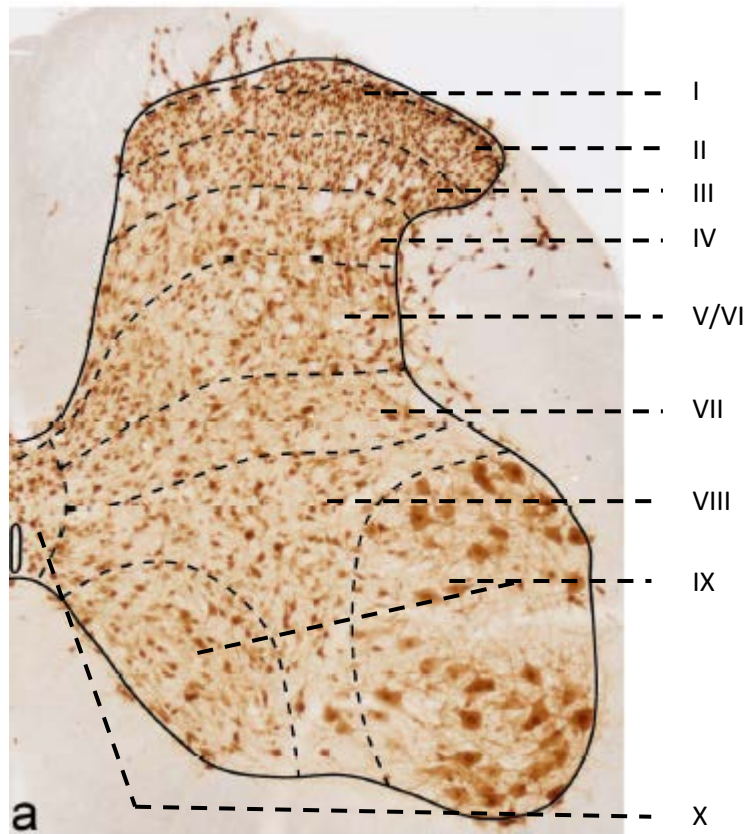


Figure 6 : Les couches de Rexed de la moelle épinière *adapté de (Todd, 2010)*

Cette coupe histologique d'un segment lombaire de rat. Les zones annotées en pointillé représentent les délimitations des couches décrites par Rexed.

b) La nociception dans les couches de la corne dorsale de la moelle épinière

Au sein de la moelle épinière, deux types de neurones répondent aux stimulations nociceptives : i) les neurones avec un haut seuil d'activation, normalement silencieux, ne répondant qu'aux stimulations potentiellement dommageables pour l'organisme, dit **nociceptif spécifique (NS)** retrouvés en majorité dans les couches superficielles I et II et minoritairement dans la couche V et ii) des neurones spinaux répondant à tous types de stimulations, à la fois nociceptives ou non, qualifiés de neurones « à large bande passante » (**Wide Dynamic Range, WDR**), majoritairement situés dans la couche V mais présents également dans les couches plus superficielles. La troisième population neuronale retrouvée dans la CDME sont les neurones non nociceptifs spécifiques (NON-S) (Mendell, 1966; Millan, 1999).

La **couche I** est une couche très fine qui reçoit des afférences directes des fibres nociceptives A δ et C peptidergiques. Morphologiquement, trois types de cellules y sont retrouvées : des cellules fusiformes, multipolaires et pyramidales (Zhang & Craig, 1997). Ces types neuronaux morphologiques sont corrélés aux différentes sous-populations neuronales fonctionnelles, à savoir les neurones répondant à des stimulations nociceptives (i.e neurones NS fusiformes), des neurones répondant au froid (neurones

COLD pyramidaux) et des neurones multimodaux répondant à la fois au chaud, au froid et à des stimulations mécaniques de forte intensité (neurones HPC pour Heat-Pinch-Cold, neurones multipolaires). Ces neurones diffèrent également par leur vitesse de conduction (Han *et al.*, 1998). Environ la moitié des neurones de la couche I expriment le récepteur à la neurokinine 1 (NK1R), cible principale de la SP libérée lors de la transmission nociceptive, et 6% de ces neurones sont considérés comme étant des neurones de projection vers le tractus spinothalamique (Polgar *et al.*, 2008). Les autres neurones sont des interneurons dont l'arbre dendritique s'étend ventralement dans la couche II voire même parfois jusque dans les couches V/VI.

La **couche II**, également appelée substance gélatineuse de Rolando, est subdivisée en deux parties : la **couche II externe** (Ile, située plus dorsalement) et **interne** (Ili, située plus ventralement). Elle reçoit des afférences des fibres C non peptidergiques. Quatre types neuronaux composent cette couche. Les **neurones en îlots** sont des interneurons inhibiteurs libérant de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) principalement localisés dans la couche Ili avec une arborisation dendritique rostrocaudale étendue. **Les neurones centraux**, également dans la couche Ile, ont une arborisation rostrocaudale plus courte et peuvent être à la fois inhibiteurs ou excitateurs. **Les neurones radiaux** se trouvent au niveau des deux zones de la couche II et possèdent une arborisation en étoile avec une transmission à la fois inhibitrice et excitatrice. Enfin, **les neurones verticaux** ont leurs corps cellulaires dans la couche Ile avec une arborisation dorsoventrale, pouvant même atteindre les couches supérieures et inférieures, et présentent une transmission excitatrice glutamatergique (Maxwell *et al.*, 2007; Todd, 2010). Cette couche d'interneurones est une **zone cruciale dans la transmission nociceptive** avec un rôle d'intégration et de modulation de l'information provenant des FAP périphériques (Lorenzo *et al.*, 2008).

Les couches III-IV reçoivent des afférences des fibres A β et ont donc été historiquement classifiées comme des couches traitant les **informations non-nociceptives**. Cependant, il a été démontré que près de la moitié des neurones de cette couche ont un rôle dans le traitement de stimulations nociceptives. Suite à une application de capsaïcine sur la moelle épinière, les neurones de la couche II recrutent des neurones des couches inférieures III-V, et la couche V exerce un rétrocontrôle négatif sur la couche III-IV *via* une augmentation de la transmission inhibitrice (Petitjean *et al.*, 2012; Seibt & Schlichter, 2015). Parallèlement, les neurones des couches III-IV recevant des informations non-nociceptives contactent des neurones de la couche II. Cette voie, en situation basale, est inhibée de manière tonique par des interneurons locaux. En situation pathologique, cette inhibition est levée et participerait au développement d'allodynies mécaniques (Hugel *et al.*, 2022).

Les **couches V/VI** contiennent une sous population de neurones WDR à gros diamètre exprimant NK1R dont 25% sont des neurones de projection (Juif *et al.*, 2013). Cette couche reçoit des informations non-nociceptives des fibres A β et A δ , des informations nociceptives directement des fibres A δ ainsi que des projections des informations des fibres C provenant des couches superficielles I et II. Cette couche reçoit également une grande proportion d'informations viscérales, notamment des informations nociceptives *via* la libération de SP (Sharkey *et al.*, 1987)

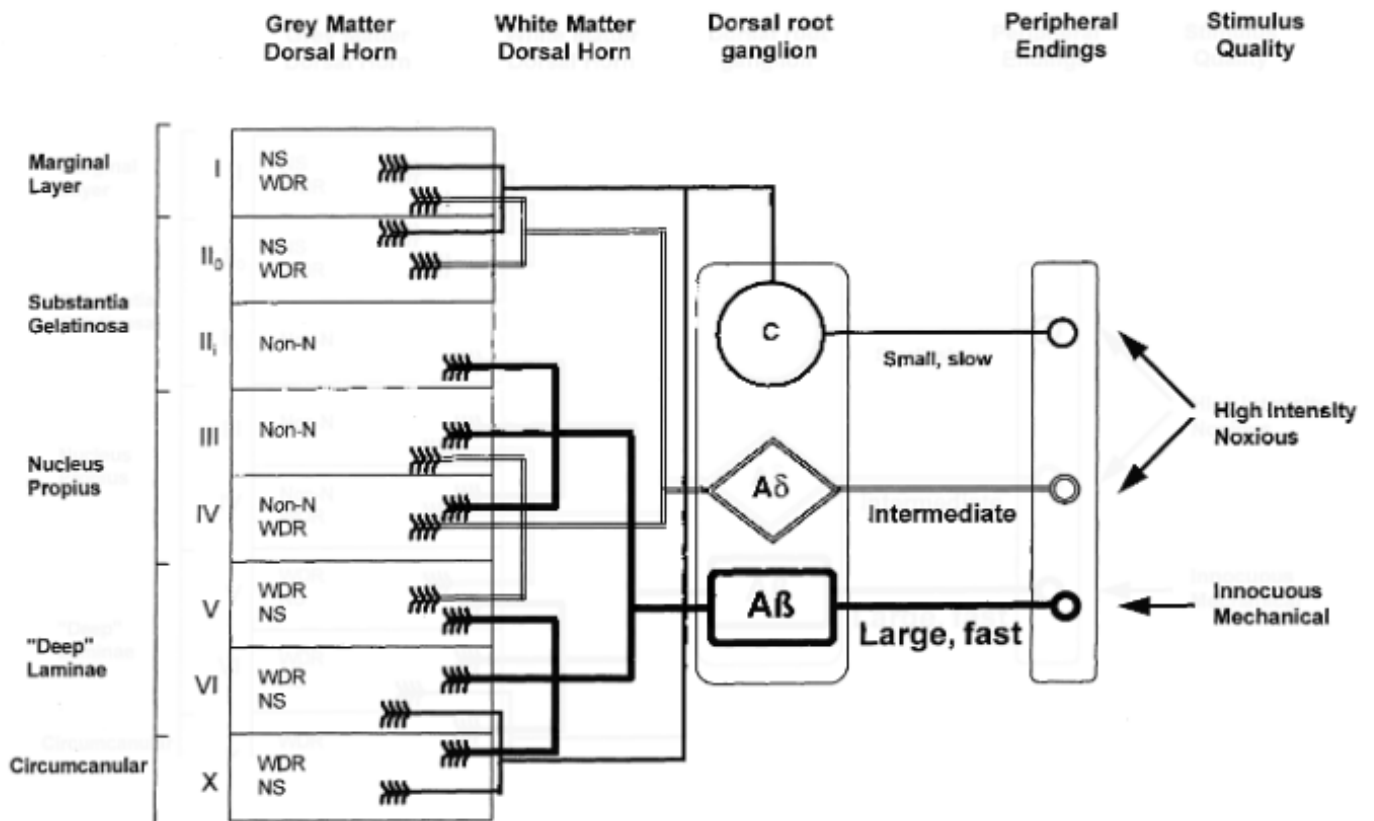


Figure 7 : Organisation des projections cutanées dans la corne dorsale de la moelle épinière

(Millan, 1999)

Schéma représentant de manière qualitative l'innervation des FAP dans les différentes couches de la CDME.

L'acteur principal au cœur de mon travail de thèse a donc été le neurone spinal WDR, receveur d'informations non nociceptives et nociceptives dans la couche V de la CDME.

c) *La place des neurones WDR des couches profondes dans l'intégration de l'information nociceptive*

Recevant des informations de **tous les types de fibres sensorielles** ($A\beta$, $A\delta$ et C) ainsi que des **projections des contrôles descendants**, les neurones WDR ont une place centrale dans l'intégration et la modulation de l'information nociceptive au sein de la moelle épinière.

Ils présentent des CR excitateurs plus élargis que ceux des neurones NS, avec un gradient de sensibilité : une stimulation très légère au centre du CR provoque une forte activation tandis qu'en périphérie du centre, il faut des stimulations plus fortes pour l'activer (Menetrey *et al.*, 1977). De manière notable, leurs CR se chevauchent et ainsi, une unique stimulation peut activer plusieurs neurones WDR à la fois. Ils possèdent également des CR inhibiteurs proximaux aux CR excitateurs qui induisent la diminution ou l'arrêt d'activité des neurones WDR adjacents (Le Bars & Cadden, 2010).

Une unique stimulation peut donc provoquer excitation et l'inhibition concomitante d'une population de neurones WDR qui innervent une même région du corps, et c'est la **résultante de l'activité de ce réseau** qui donnera lieu à la transmission d'une information nociceptive ou non.

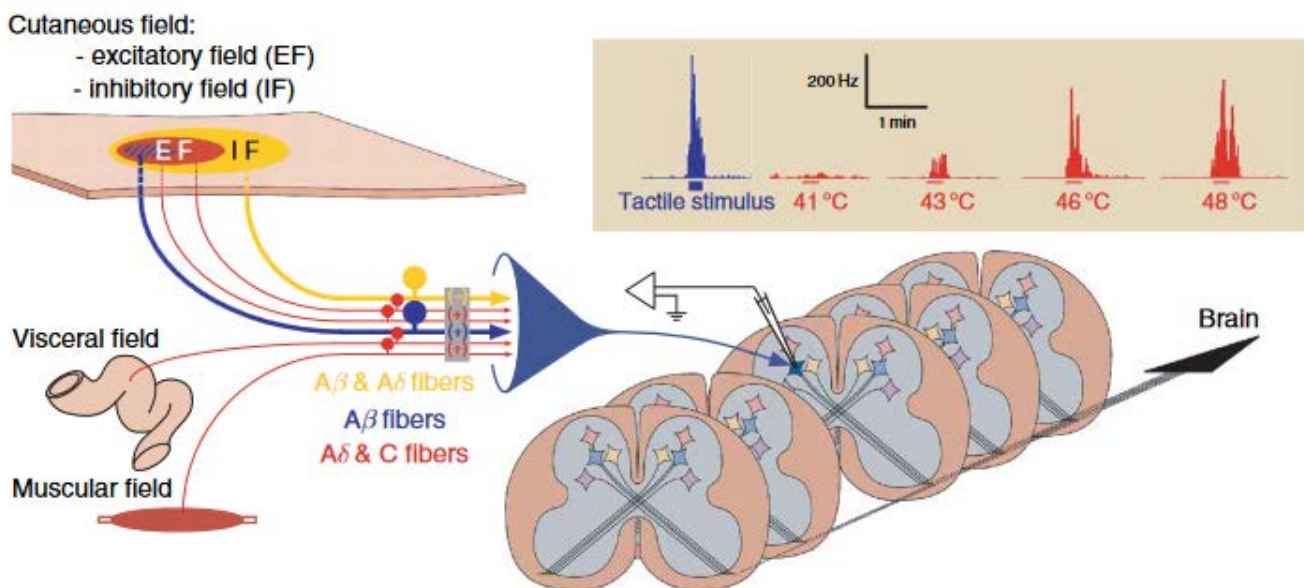


Figure 8 : Schéma de l'innervation théorique des neurones WDR (Le Bars & Cadden, 2010)

La partie innervée de la peau présente un CR excitateur (EF) et inhibiteur (IF). Le centre de l'EF est activé par des stimulations non nociceptive (bleu) et nociceptive (rouge). La périphérie de l'EF est iniquement activée par des stimulations nociceptives. L'IF est majoritairement activé par des stimulations non nociceptives. Le neurone en question reçoit une convergence d'information excitatrice (+) et inhibitrice (-) provenant de la peau, des viscères et des muscles. Les histogrammes représentent l'activité du neurones lorsque des stimulations non nociceptives et nociceptives mécaniques et thermiques sont appliquées au centre de son CR.

Dans une étude électrophysiologique caractérisant le profil de décharge des neurones NS superficiels et des neurones WDR profonds, Coghill et collaborateurs décrivent une **différence de codage** des informations nociceptives par ces deux populations de neurones. Lors d'une stimulation thermique chaude nociceptive prolongée (45 minutes), les neurones WDR ne présentent pas d'adaptation contrairement aux neurones NS (i.e diminution de l'activité après 2 minutes) et continuent d'émettre des PA tout le long de la stimulation (Coghill *et al.*, 1993). De plus, ils sont capables d'encoder l'intensité de *stimuli* douloureux thermiques plus précisément que les neurones NS, et ce de manière corrélée aux seuils de détections comportementaux chez des singes vigiles (Maixner *et al.*, 1986).

Similairement, chez l'Homme, les scores d'évaluation de l'intensité de la douleur et du caractère aversif de la douleur ne sont pas adaptatifs lors d'une stimulation prolongée, avec une expression de douleur pendant une période où les neurones NS ne sont plus actifs, mais où les neurones WDR le sont. Ces résultats sous-tendent que **leur activité seule est nécessaire et suffisante pour transduire la composante sensori-discriminative et affective de la douleur** (Coghill *et al.*, 1993).

Une propriété intéressante de ces neurones est leur capacité à reproduire fidèlement l'activité des FAP dont ils reçoivent les projections directes (fibres A β et A δ) ou indirectes (fibres C). L'analyse de la latence des PA émis par un neurone WDR suite à une dépolarisation électrique périphérique permet de discriminer avec précision l'activité de ces différentes fibres. Ces neurones sont également capables de reproduire le phénomène de « wind-up », propriété électrophysiologique spécifique des fibres C : suite à une activation répétée de ces fibres, leur fréquence de décharge va progressivement augmenter au cours du temps. Ce phénomène est notamment impliqué dans la sensibilisation centrale (i.e l'augmentation de l'excitabilité des neurones de la moelle épinière) dans des situations pathologiques, qui résultent en des décharges spontanées, une augmentation de la taille des CR et une activité exacerbée des FAP (Li *et al.*, 1999).

Il est estimé que 25% des neurones WDR situés dans les couches profondes de la CDME sont à projection supraspinale (Juif *et al.*, 2013).

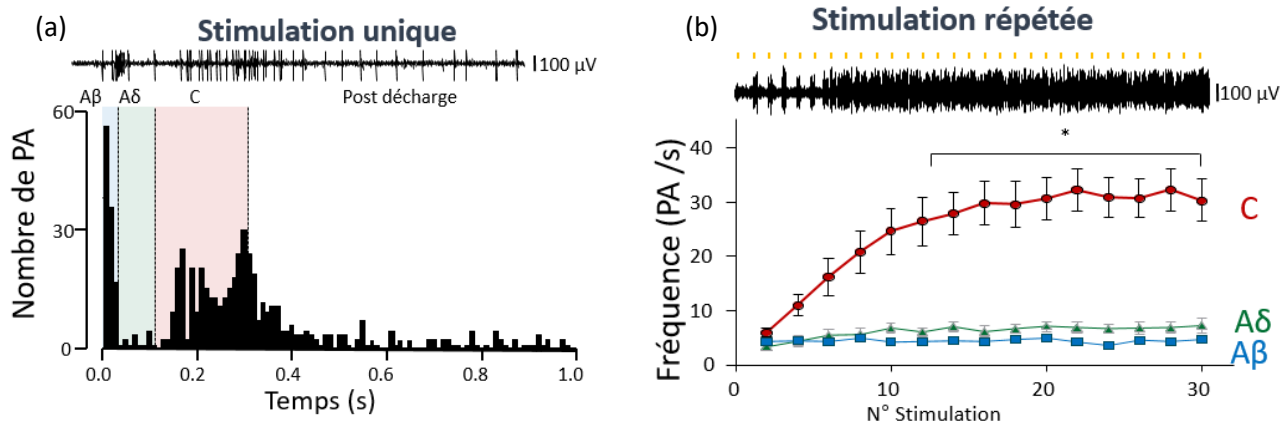


Figure 9 : Illustration de la réponse d'un neurone WDR en réponse à des stimulations électriques (Melchior, non publié)
 Exemple de trace électrophysiologique et de représentation en histogramme du nombre de potentiel d'action suite à une stimulation unique (a) électrique nociceptive permettant la distinction des informations transmises par les fibres Aβ, Aδ et C au neurone WDR, et d'une stimulation répétée (b) avec un exemple de trace électrophysiologique et de la représentation graphique des décharges de chaque fibre en fonction du temps. Un phénomène de « wind-up » est observé chez les fibres C mais pas chez les fibres A

5. Intégration sous corticale et corticale

Les neurones spinaux de projection empruntent différentes voies ascendantes telles que i) le **tractus spinothalamique** (ou the ganglion trigeminal pour l'innervation faciale), voie ascendante principale des informations nociceptives, ii) le **tractus spinoreticulaire**, iii) le tractus **spino-parabrachio amygdaloïde** et iv) en moindre mesure, le **tractus spinomesencéphalique** (Bonica, 1990), pour faire synapse dans un grand nombre de régions cérébrales où aura lieu l'intégration des informations, puis la mise en place d'une réponse comportementale adaptée et de contrôles descendants endogènes de la douleur. Ces zones sont parfois référées comme « la neuromatrice de la douleur » ou « *Pain Matrix* ».

Les neurones de la **formation réticulée**, notamment dans le noyau gigantocellulaire, montrent une importante activité suite à des stimulations mécaniques, thermiques ou chimiques nociceptives avec des champs périphériques très larges allant même jusqu'à la moitié du corps (Casey, 1980). Ils jouent un rôle dans l'aspect affectif et motivationnel à s'échapper à un stimulus douloureux.

Le **noyau gigantocellulaire bulbaire** et la **SGPA** relayent les informations nociceptives aux centres émotionnels ainsi que les centres qui mettent en place la réponse comportementale adaptative.

Le **noyau accubens** qui reçoit des projections dopaminergiques de l'**aire tegmentale ventrale** joue un rôle prééminent dans la composante motivationnelle de la douleur. L'application de stimulations nociceptives réduit l'activité dopaminergique dans ces régions, et impacte le système de récompense

des comportements motivés. L'innervation GABAergique de ces régions par les noyaux de la base est donc une voie modulatrice la réponse comportementale de la douleur (Markovic *et al.*, 2021).

Une grande cible des neurones de projection des couches I et V de la CDME est le noyau **postéro-ventro-latéral du thalamus (PVL)**, qui lui-même projette dans les cortex somatosensoriels SI et SII, **et le noyau ventro-postéro-médial (PVM)**. Ces deux noyaux intègrent la composante sensorio-discriminative de la douleur. Un groupe de neurones thalamiques dans la zone **ventro-médial postérieur (VMPO)** ont également un rôle d'intégration de la douleur, démontré par des expériences chez le chat, singe et chez l'homme (Bonica, 1990). Avec les **noyaux intralaminaires**, Le VMPO est impliqué dans l'intégration émotionnelle de la douleur (Ab Aziz & Ahmad, 2006). Ces noyaux sont organisés de manière somatotopique et certains neurones, notamment dans le PVL sont spécifiques à une seule modalité de stimulation.

L'hypothalamus reçoit des projections du faisceau spino-hypothalamique et du faisceau spino-parabrachio-hypothalamique impliqué dans la réponse végétative à la douleur, dans la réponse émotionnelle et la mise en place d'un comportement motivé. Les cellules hypothalamiques répondent à la fois à des informations somatiques et viscérales sans organisation spatiale ou modalité spécifique.

L'hippocampe a depuis longtemps été reconnu comme élément central des processus cognitifs sous-tendant l'apprentissage et la mémoire. Un nombre grandissant de données place également cette région dans le circuit de la douleur. Chez l'animal comme chez l'Homme, la stimulation de l'hippocampe induit un effet pronociceptif aversif, et des études ont montré que l'application d'une stimulation nociceptive module l'activité neuronale dans l'hippocampe. Son rôle précis dans l'intégration de la douleur reste encore sous investigation. (Liu & Chen, 2009).

L'amygdale, reçoit des projections des neurones de la couche I *via* le relais du **noyau parabrachial** et intègre les composantes affectives et émotionnelles de la douleur en lui donnant notamment sa valence aversive (Allen *et al.*, 2021).

Le cortex cingulaire antérieur (CCA) reçoit des projections des noyaux thalamiques médians, et est une région corticale impliquée dans un grand nombre de processus cognitifs (processus attentionnel et détection d'erreurs, récompense liée à l'anticipation et l'accomplissement d'une tâche, attraction sexuelle...). L'ACC joue un rôle majeur dans la composante affective de la douleur, à la fois en situation physiologique et pathologique (Bliss *et al.*, 2016; Xiao *et al.*, 2021). L'ACC exerce également un double rôle facilitateur (Chen *et al.*, 2018) et inhibiteur (Ma *et al.*, 2011) dans la transmission nociceptive spinale.

Le **cortex insulaire antérieur** est une région impliquée dans la composante cognitive et émotionnelle de la douleur. Elle est capable de produire une sensation de douleur lorsque stimulée, et des lésions de cette région induisent des altérations de la sensation douloureuse (Labrakakis, 2023).

Le **cortex préfrontal (CPF)**, outre son rôle dans les fonctions exécutives, reçoit des informations de la SPGA, du thalamus, de l'amygdale et des noyaux basaux. Il joue un double rôle à la fois inhibiteur de la douleur *via* ses connexions à la SPGA, et participe également à la chronicisation de la douleur dans des cas pathologiques (Ong *et al.*, 2019).

Les cortex somatosensoriels (SI et SII) jouent quant à eux un rôle évident dans la sensoridiscrimination des informations douloureuses selon l'homonculus cortical de Penfield (Cazala *et al.*, 2015).

6. Contrôles descendants

L'intégration des messages nociceptifs au niveau cortical permet à la sensation douloureuse de naître. Parallèlement, l'aspect désagréable de la douleur est codé par des aires spécialisées (insula, ACC, amygdale, certaines régions thalamiques...). Dans des boucles réflexes sur le trajet ascendant de la nociception et après intégration corticale, une réponse comportementale adaptative est mise en forme. Cette réponse va également être régulée par des contrôles descendants issus de l'encéphale et du tronc cérébral. Ces contrôles sont facilitateurs ou inhibiteurs sur l'intégration des messages nociceptifs et la réponse physiologique à la douleur.

La **SGPA** est une structure très importante parmi les contrôles descendants. Les neurones qui la composent expriment de nombreux récepteurs aux opioïdes endogènes (endorphines, enképhalines, dynorphines, nociceptines/orphanines P/Q) et elle est donc une cible majeure des traitements aux opiacés. Elle est également un centre de relais vers des structures intégratrices qui elles-mêmes projettent et régulent les réseaux nociceptifs de la moelle épinière.

La SGPA joue un rôle inhibiteur analgésique endogène *via* des projections spinales passant par le funiculus latéral dorsal, contactant les neurones sérotoninergiques du **noyau raphé magnus** qui projettent vers les neurones inhibiteurs spinaux de la couche II. Ces neurones inhibent de manière présynaptique la libération de SP par les fibres A δ et C, empêchant ainsi l'activation des neurones spinaux de second ordre et coupent court à la transmission nociceptive (Basbaum & Fields, 1984). Cependant, en cas pathologique comme dans la douleur chronique, cette voie normalement inhibitrice peut devenir excitatrice et proalgésique (Aby *et al.*, 2022). Comme mentionné précédemment, la stimulation électrique seule de la SGPA engendre une analgésie suffisante pour effectuer une laparotomie sur animal non anesthésié, prouvant la puissance de ces contrôles descendants

endogènes (Reynolds, 1969). Le noyau du raphé magnus est notamment impliqué dans le développement d'hyperalgésie secondaire suite à une lésion tissulaire (Zhuo & Gebhart, 1997)

La **medulla rostroventrale (RVM)**, également placée sous contrôle de la SPGA, joue un double rôle inhibiteur et facilitateur dans la transmission nociceptive (Urban & Gebhart, 1999). Trois types de neurones ont été caractérisés selon leur réponse à des stimulations nociceptives: a) les neurones 'OFF', à effet inhibiteur, sont actifs à l'état basal (i.e. produisent des PA sans douleur) et deviennent « silencieux » lorsqu'une stimulation nociceptive est appliquée en périphérie. Leur activation neurochimique par les opioïdes produit en un effet antinociceptif ; b) les neurones 'ON' s'activent à la suite d'une stimulation nociceptive, et ceci, juste avant l'apparition d'un réflexe nociceptif. Ils ont donc un rôle excitateur sur la réponse douloureuse ; et c) les neurones « neutres » qui ne présentent pas de modification de leur activité en réponse aux stimulations nociceptives.

Les **noyaux hypothalamiques** participent à la modulation de l'information nociceptive. Le noyau pré-optique a un grand nombre de projections vers la SPGA et la RVM qui résulte en une inhibition des neurones nociceptifs spinaux (Millan, 2002). Parallèlement, le noyau paraventriculaire contacte directement la CDME et l'activité des neurones ocytocinergiques (OT) exerce une action inhibitrice *via* la modulation de la transmission GABAergique (Breton *et al.*, 2008).

Le **noyau parabrachial (PB)** joue un rôle intégrateur dans les composantes émotionnelles et cognitives de la douleur. Il reçoit des informations (notamment des informations viscérales) de moelle épinière, et projette en retour vers le **noyau du tractus solitaire (NTS)**, la RVM et dans la couche superficielle de la CDME. La stimulation du PB inhibe l'activité des neurones spinaux en réponse à des stimulations nociceptives et non nociceptives (Millan, 2002).

Le **NTS** reçoit des afférences du nerf vagal et est impliqué dans l'intégration des informations nociceptives viscérales. A l'instar du PB, il a un rôle d'interface entre le système autonome et somatosensoriel. Connecté à la SPGA et par l'hypothalamus, le NTS projette directement vers la CDME et sa stimulation résulte en un effet antinociceptif (Millan, 2002).

Le **Locus Coeruleus**, cœur de la transmission noradrénergique du système nerveux, reçoit des afférences de la moelle épinière et projette vers un certain nombre de régions cérébrales impliquées dans la douleur (thalamus, amygdale, CPF). Il exerce un rôle inhibiteur antinociceptif *via* des projections directes noradrénergiques dans la CDME avec effet analgésique de par l'activation des récepteurs adrénérgiques spinaux α_2 (Jones & Gebhart, 1986; Suarez-Pereira *et al.*, 2022).

Mis en évidence par Daniel LeBars (Le Bars *et al.*, 1979), les **CIDN** provoquent un effet antinociceptif local suite à l'application d'un second *stimulus* nociceptif sur CR distant du premier CR stimulé, *via* l'inhibition de l'activité des neurones secondaires spinaux. Ils impliquent des composantes sérotoninergiques, monoaminergiques (Bannister *et al.*, 2017) et opioïdiques (Patel & Dickenson, 2020). Les CIDN, démontrés chez l'animal, sont également présents chez l'Homme. Ils ont pris le nom de CPM (pour Conditioned Pain Modulation). Chez le rongeur comme chez l'homme, les CIDN/CPM peuvent être altérés et déficients en cas pathologique comme les douleurs neuropathiques (Bannister & Dickenson, 2017).

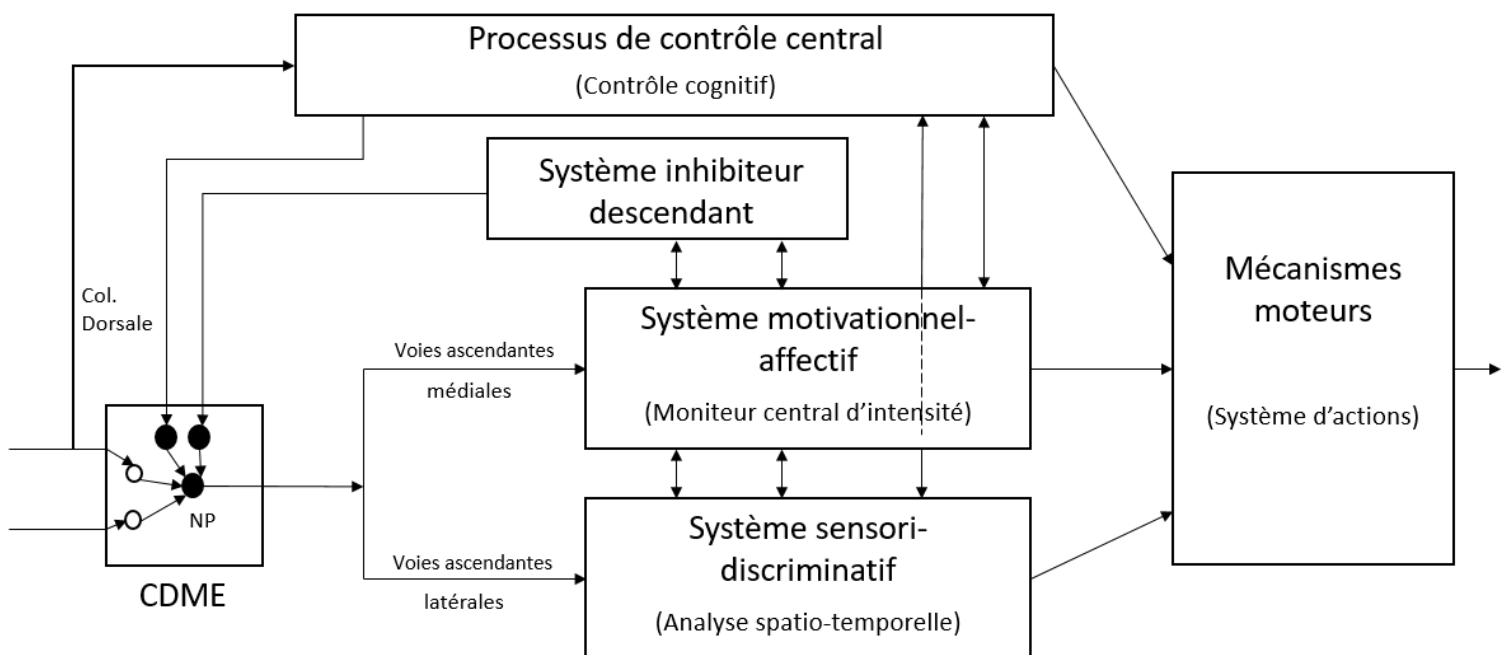


Figure 10 : Schéma conceptuel de l'intégration corticale *adapté de (Bonica, 1990)*

Les neurones de projection de la CDME (NP) projettent vers les régions intégratrices de la composante sensori-discriminatrice de la douleur *via* les voies ascendante latérales, et vers les régions émotionnelles et affectives *via* les voies médiales. Ces deux systèmes communiquent l'un avec l'autre. Les projections dorsolatérales arrivent au centres de processus de contrôles centraux *via* la colonne dorsale. En retour, ces centres contactent la CDME, ainsi que les systèmes motivationnels affectifs et sensori-discriminatif. Parallèlement, le système inhibiteur descendant module l'activité au niveau de la CDME. La résultante de l'activité de ce réseau interconnecté agit ensuite sur le système moteur.

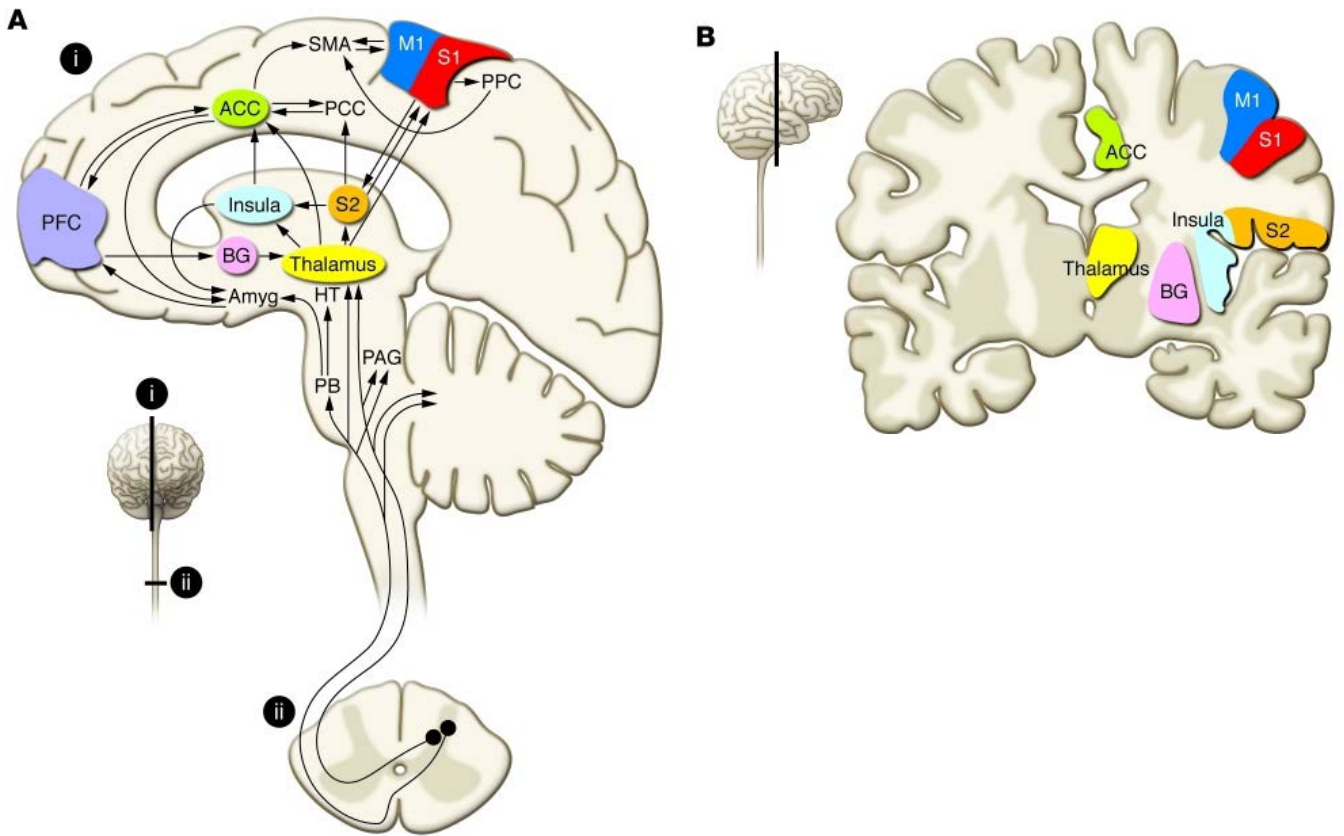


Figure 11 : Schéma de l'intégration corticale (Schweinhart & Bushnell, 2010)

(A) Schéma des voies ascendantes de la douleur et des différentes régions supraspinales impliquées son intégration (B).

PB : noyau parabrachial, PAG : substance grise périaqueducale, HT : hypothalamus, Amyg : amygdale, BG : ganglions basaux, S2 : cortex somatosensorielle secondaire, PFC : cortex préfrontal, ACC : cortex cingulaire antérieur, PCC : cortex cingulaire postérieur, SMA : cortex moteur associée, M1 : cortex moteur primaire, S1 : cortex somatosensoriel primaire, PPC : cortex pariétal postérieur

Derrière le mot « douleur », nous voyons qu'il y a un processus complexe qui pourra rendre compte de la sensation perçue (localisation, intensité, durée, modalité), de l'émotion produite, de l'encodage cognitif (mémoire, attention, catastrophisme) et bien évidemment de la diversité des réponses comportementales et motrices observées.

Les études sur la douleur chez l'Homme reposent principalement sur une auto-évaluation subjective de la douleur *via* des échelles et questionnaires remplis par les patients, mais restent limitées quant au décryptage des mécanismes sous-jacents à la douleur, ou l'existence de biomarqueurs objectifs et universels (Mogil, 2009). C'est pourquoi la recherche, depuis des décennies, s'appuie sur des études précliniques utilisant des modèles animaux.

B. Partie 2 : Evaluation comportementale de la nociception et de la douleur chez l'animal

Pour revues intégrées → (Barrot, 2012; Modi et al., 2023)

Dans le cadre d'études précliniques chez l'animal, il est important de **distinguer nociception et douleur**.

Chez l'Homme, la douleur est mesurée et quantifiée selon l'expression subjective des patients, verbalement, à l'aide d'échelles visuelles (score), de questionnaires ou encore par un examen clinique. Cette évaluation étant difficile chez l'animal, les études comportementales précliniques portent souvent sur l'analyse des mécanismes de nociception produisant des **réflexes d'évitement** vis-à-vis de stimulations nociceptives. Ces reflexes permettent de mesurer différents paramètres comme le temps de latence jusqu'à l'apparition d'un comportement aversif, le seuil (en gramme, en température, en pH) nécessaire pour provoquer un évitement ou encore le score associé à ces comportements spécifiques, lié à une intensité de stimulation (Barrot, 2012).

1. Les tests nociceptifs

a) Mécanique

Utilisé en clinique humaine, le test des **filaments de von Frey** est largement utilisé chez les souris autant que chez les rats. Les filaments de nylon de 5 cm dont l'extrémité est plate sont appliqués sur le CR à stimuler. Généralement, ce test est utilisé sur la face plantaire des pattes arrières afin d'évaluer le seuil mécanique général de l'animal, mais il peut être utilisé pour évaluer la sensibilité dans des régions spécifiques, par exemple sur l'abdomen après une laparotomie (Charlet *et al.*, 2011). Les diamètres des filaments sont tels que, lorsque que le filament est appliqué jusqu'à avoir une légère courbure, la pression exercée est calibrée de manière précise (de 0.008 g à 300 g). Si le comportement du retrait de la patte découle de l'activation du système nociceptif ou simplement une réponse réflexe à une sensation sensorielle désagréable reste sujet à débat étant donné que ce réflexe moteur peut être provoqué par des stimulations non-nociceptives. Cependant, ce test reste très efficace dans des modèles de douleur pour mettre en évidence des hypersensibilités mécaniques où l'application d'un filament typiquement non-nociceptif provoque une réaction de retrait (i.e allodynie) (Barrot, 2012). Après une habituation des animaux au dispositif, le test de von Frey donne des résultats stables et **permet de différencier les pattes droites et gauches des animaux**, ce qui présente un avantage lors de l'utilisation de modèle animaux de douleurs avec des lésions ou inflammations unilatérales.

Étant une procédure dépendante du protocole utilisé, ou tout simplement de l'expérimentateur, les données publiées dans la littérature présentent une forte variabilité, avec un seuil mécanique chez la souris naïve allant de 0.3g à 10g (Barrot, 2012). Afin de limiter ces biais, une **version automatisée** de

ce test a été développée (Vivancos *et al.*, 2004). Ce test utilise un filament unique qui ne se courbe pas et la force appliquée est mesurée par une jauge de contrainte calibrée pour une valeur en gramme.

Chez le rat, le **test de Randall-Selitto** (Randall & Selitto, 1957) consiste à placer la patte arrière de l'animal sur une surface plate fixe avec une pointe mobile qui est appliquée progressivement avec un système de contrepoids, jusqu'à l'apparition d'un comportement nociceptif (retrait de la patte ou vocalisation). Si ce test produit des résultats stables et reproductibles, il requiert une expertise de l'expérimentateur ainsi qu'un certain nombre animaux (Barrot, 2012). De plus, le rat est placé dans une position verticale non naturelle et doit être restreint par le manipulateur, ce qui requiert une longue période d'habituation de l'animal à la procédure.

Une alternative à ce test est celui de la **pince calibrée** (Luis-Delgado *et al.*, 2006). L'animal est légèrement maintenu dans une position naturelle avec un chiffon qui lui couvre les yeux pour limiter le stress induit par des stimulations extérieures. La patte arrière de l'animal est pincée à l'aide d'un forceps et la pression exercée est mesurée par le dispositif. Lorsque l'animal présente un réflexe nociceptif (généralement retrait de la patte), la pince est retirée et la pression mesurée est considéré comme le seuil nociceptif mécanique. Cette mesure est répétée trois fois sur les deux pattes, et permet d'obtenir une moyenne générale de seuil mécanique. Si la pression n'est pas automatisée et dépendante de l'expérimentateur, ce test permet des mesures rapides, requérant peu d'habituation et est une procédure peu stressante pour les animaux.

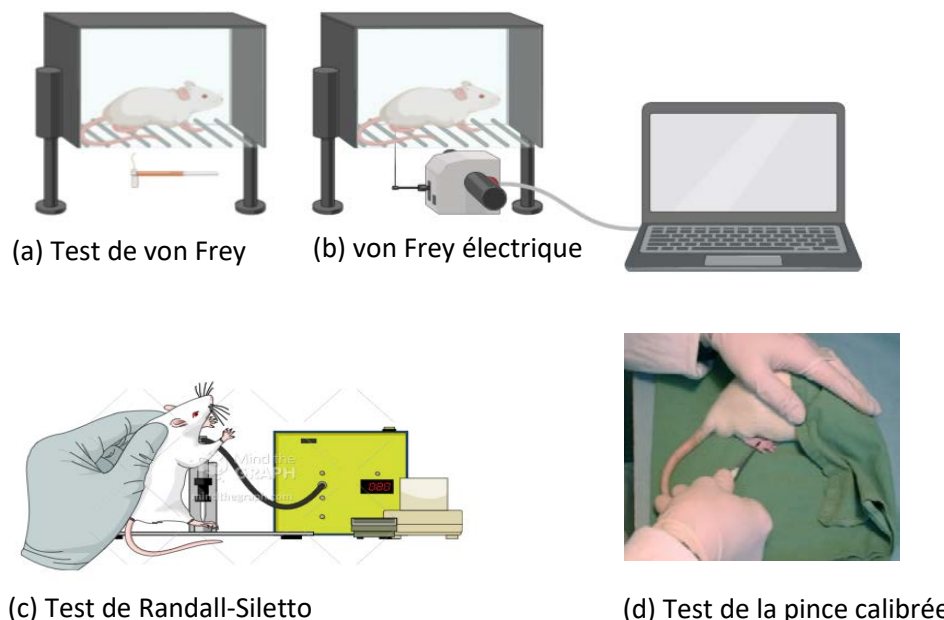


Figure 12 : Tests nociceptifs mécaniques

Représentation schématique des tests nociceptifs mécaniques des filaments de von Frey (a), von Frey électrique (b), test de Randall-Selitto (c) et test de la pince calibrée (d). Images de Biorender.com et Mindthegraph.com

b) Thermique chaud

La chaleur est produite par un transfert d'énergie qui s'effectue hors d'un équilibre thermodynamique. On distingue trois types de transfert thermique :

- **Conduction** : provoquée par la différence de température dans un même milieu, ou entre deux milieux sans déplacement global de matière.
- **Convection** : provoquée par la différence de température entre une surface et un fluide mobile à son contact, ou le déplacement de chaleur au sein d'un même fluide.
- Le **rayonnement**, ou chaleur radiante, provoqué par l'agitation de photons.

Ainsi, les propriétés des tests nociceptifs thermiques chauds vont dépendre du type de transfert de chaleur utilisée. Un autre élément à prendre en compte sera l'intensité (de température ou de durée d'exposition) choisie afin de ne pas provoquer de dommages tissulaires chez l'animal.

L'un des premiers tests nociceptifs thermiques développé par D'Amour et Smith, **le test d'immersion de la queue** ou « *tail flick* » (D'Amour & Smith, 1941) consiste à plonger la queue d'un animal dans de l'eau chaude à température contrôlée (> à 42°C). Une variante utilise une source de chaleur radiante. La **latence de retrait de la queue** est considérée comme la valeur de seuil nociceptif au chaud. Ce test, très sensible aux opioïdes, repose largement sur les réseaux spinaux mais reste influencé par les centres supraspinaux (Millan, 2002). L'un des inconvénients de ce test est que l'animal doit être restreint.

Le test de la **plaque chaude** est largement répandu et utilisé dans le milieu de la recherche animal. L'animal est placé sur une plaque à température fixe (Woolfe & Macdonald, 1944; O'Callaghan & Holtzman, 1975) ou dynamique (Hunnskaar *et al.*, 1986; Yalcin *et al.*, 2009). La latence d'apparition d'un réflexe nociceptif (retrait de la patte, saut, vocalisation) est considérée comme la valeur de seuil thermique au chaud. Ce réflexe est placé sous modulation supraspinale. Si ce test est simple et rapide (pas d'habituation), il sera influencé par la structure métallique de la plaque. Si l'utilisation de mesures répétées ne cause pas d'inflammation (Gunn *et al.*, 2011), cela peut mener à un apprentissage ou anticipation chez les animaux qui cause un biais dans les résultats (Barrot, 2012).

The **test de Hargreaves**, communément appelé test du Plantar[®], utilise une source de chaleur radiante pour chauffer la surface plantaire des pattes (Hargreaves *et al.*, 1988). Les animaux sont placés sur un support transparent conduisant la chaleur, la source de chaleur est placée sous la patte à tester et un chronomètre automatique est déclenché. Lorsque l'animal retire sa patte du faisceau, la latence de retrait est utilisée comme seuil nociceptif. Le test est réitéré plusieurs fois afin de moyennner les latences obtenues. Ce test requiert une habituation des animaux au dispositif, mais permet de tester

plusieurs animaux à la fois et de **tester les différentes pattes de manière indépendante**. Ce comportement est également d'origine supraspinale. Il présente néanmoins quelques limitations à prendre en compte dont la température exacte du faisceau de chaleur radiante qui n'est pas connu (Modi *et al.*, 2023)

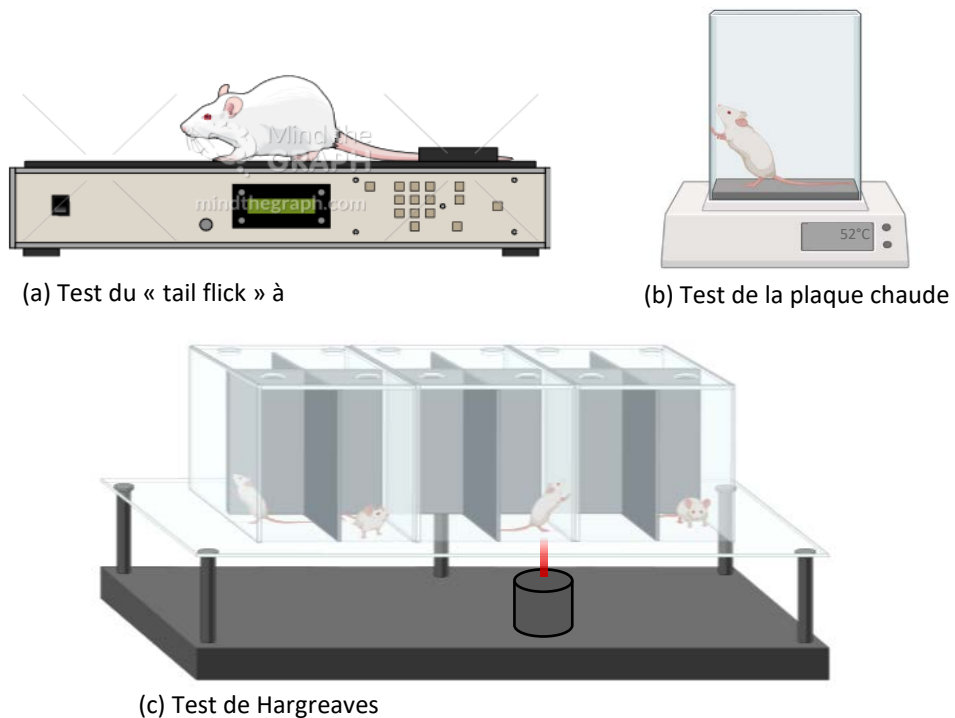


Figure 13 : Tests nociceptifs thermique au chaud

Représentation schématique des tests nociceptifs mécaniques du « tail flick » à chaleur radiante (a), de la plaque chaude (b), et du test de Hargreaves (c). Images de Biorender.com et Mindthegraph.com

c) Thermique froid

Il a toujours été plus complexe d'évaluer la réponse comportementale au froid comparé au chaud, notamment chez des animaux naïfs ne présentant aucune hypersensibilité thermique.

Pour mesurer une allodynie au froid, un test consiste à **déposer une goutte d'acétone** sur la patte arrière d'un animal (Yoon *et al.*, 1994). **L'évaporation de l'acétone induit une sensation de froid** (environ 21°C à 15°C) non douloureux car les animaux naïfs ne montrent peu ou pas de comportement aversif. Au contraire, ces comportements sont nombreux et intenses chez des animaux hypersensibles ou douloureux. Les paramètres mesurés sont la durée totale des comportements provoqués par la goutte d'acétone, ou un score des différents comportements observés selon un niveau d'intensité (reniflement de la patte, léchage, secouage, saut). Il est à noter que chez la souris, l'acétone provoque

des réactions même chez des souris non hypersensibles, et limite donc l'utilisation de ce test chez cette espèce.

Le test de la **plaque froide** (Bennett & Xie, 1988) à température fixe variant de -5°C à 15°C selon les études, ou dynamique (Yalcin *et al.*, 2009), peut également être utilisé bien que ce test donne généralement des résultats moins concluants par rapport au test de la plaque chaude, du fait de la plus grande variabilité des comportements induits par le froid (Barrot, 2012). Pour ce test, la latence à présenter un réflexe nociceptif est prise en compte, ou encore le nombre de comportement nociceptifs scorés pendant une période de temps fixée. Il est estimé qu'un animal naïf commence à présenter des comportements nociceptifs à partir d'une température inférieure à 3°C pour un test d'une durée de 5 minutes (Jasmin *et al.*, 1998).

Un autre test, similaire au test de Hargreaves, consiste à placer les animaux, après habituation au dispositif, sur une surface conductrice au changement thermique (verre ou métal) et à **appliquer de la glace carbonique** en dessous de la patte arrière de l'animal jusqu'à un réflexe nociceptif (Brenner *et al.*, 2012). Ce test étant extrêmement dépendant de l'observateur, les résultats sont difficilement comparables entre différents expérimentateurs et la température au niveau de la surface cutanée est inconnue et mal contrôlée, mais présente tout de même l'avantage de pouvoir tester les pattes de manière indépendantes.

2. Les tests de préférence de place

L'utilisation répandue de tests nociceptifs en tant qu'outil pour mesurer des symptômes douloureux a indéniablement permis de grandes avancées dans notre compréhension des mécanismes sous-jacents à la douleur aiguë et chronique. Cependant, ces tests reposent sur des réflexes comportementaux évoqués qui n'évaluent pas la douleur à proprement dit, mais des **hypersensibilités nociceptives**. Ces comportements réflexes ou adaptatifs (aversifs/nocifensifs) d'origine spinale (réflexe de retrait face à un stimulus appliqué), sont influencés plus ou moins par des structures supraspinales donnant lieu à des comportements associés tels que les vocalisations, le grattage, le léchage ou la protection de la patte. Ils ne sont **pas représentatifs de l'expérience douloureuse dans toutes ses composantes** sensorielles, cognitives, et affectivo-émotionnelles. Ces réflexes peuvent en effet être provoqués chez des animaux décérébrés ou anesthésiés (Baliki *et al.*, 2005). Ils reposent sur l'intégrité du système nerveux moteur et présentent des limites quant à la pertinence par rapport aux pathologies retrouvées en clinique humaine (Mogil, 2009). De manière générale, les conséquences émotionnelles dans les modèles animaux de douleurs sont étudiées de manière séparée par des tests visant à mesurer souvent des comportements anxieux ou dépressifs (Dantzer *et al.*, 2008; Fischer *et al.*, 2015; Kremer *et al.*, 2021)

L'utilisation des tests nociceptifs en recherche préclinique, où les composantes corticales sont peu présentes, a été mise avant pour expliquer certains échecs translationnels vers l'application en clinique (Vierck *et al.*, 2008b). De plus, les études animales montrent une énorme variabilité des résultats selon la souche d'animaux utilisée, l'environnement de laboratoire où ces tests sont réalisés, ainsi qu'une influence énorme de l'expérimentateur effectuant l'expérience (Chesler *et al.*, 2002; Sorge *et al.*, 2014).

C'est pourquoi il a été proposé d'ajouter à la boîte d'outils de la recherche préclinique des tests d'évaluation non pas basés sur un comportement nociceptif induit par une stimulation intense, **mais sur des comportements spontanés, des suppressions de comportement spontanés, ou encore sur l'apprentissage d'un comportement face à un stimulus** (i.e tests opérants) qui pourraient mieux appréhender les différentes composantes de la douleur (Fuchs & McNabb, 2012; Mao, 2012; Vierck & Yezierski, 2015).

a) Le test du conditionnement de préférence de place

Basé sur un conditionnement pavlovien, le test de **Préférence de Place Conditionnée (PPC)** est de plus en plus utilisé pour mesurer l'effet d'un traitement ou d'une absence de traitement sur le comportement d'un animal.

Ce test repose sur un dispositif à deux compartiments rendus distincts par des indices visuels, reliés par une ouverture qui permet à l'animal d'évoluer librement dans les deux espaces. Après une période d'habituation où l'animal est libre d'explorer les deux compartiments, un des compartiments est bloqué et le *stimulus* est appliqué. Lors de la phase de test, les deux compartiments sont de nouveau accessibles, et le temps passé dans chaque est mesuré. Si l'animal présente une préférence d'un compartiment par rapport à l'autre, le traitement aura donc eu un effet, dépendant de la nature plaisante ou aversive du *stimulus* appliqué. Il existe donc un grand nombre de variantes à ce test qui dépendent du type de comportement conditionné (induction, extinction, rétablissement) ou de la nature du stimulus (Tzschentke, 2007).

Dans les études sur la douleur, l'efficacité d'un traitement analgésique sur **des douleurs spontanées** (King *et al.*, 2009) peut par exemple être évaluée (Davoody *et al.*, 2011; Navratilova *et al.*, 2013; Dalm *et al.*, 2015).

b) Préférence de place face à un stimulus mécanique

Le **système de conflit mécanique (SCM)** repose sur l'évaluation non pas d'un réflexe comme les tests nociceptifs mécaniques classiques mais sur un **comportement d'échappement motivé** (Harte *et al.*, 2016). Le dispositif est composé de trois parties : un compartiment contenant une LED qui permet de

l'éclairer, un couloir dont le sol est couvert d'épingles pointues à hauteur ajustable, et un compartiment sombre. L'entièreté du dispositif est constituée d'un plastique rouge, perçu comme noir pour les animaux mais permettant l'observation de leurs comportements par l'expérimentateur.

L'animal est placé dans le compartiment avec la LED éteinte. Après une période d'habituation de 15s, la LED est enclenchée pour produire une lumière aversive (> 4700 lux). L'animal doit donc prendre la décision d'échapper au compartiment aversif lumineux non-nociceptif en se soumettant à des stimulations nociceptives mécaniques pour rejoindre le compartiment noir (Harte *et al.*, 2016). Ce test, sensible aux anxiolytiques et aux antalgiques, permet donc de prendre en compte les **dimensions affectives et motivationnelles** du comportement nociceptif chez le rat.

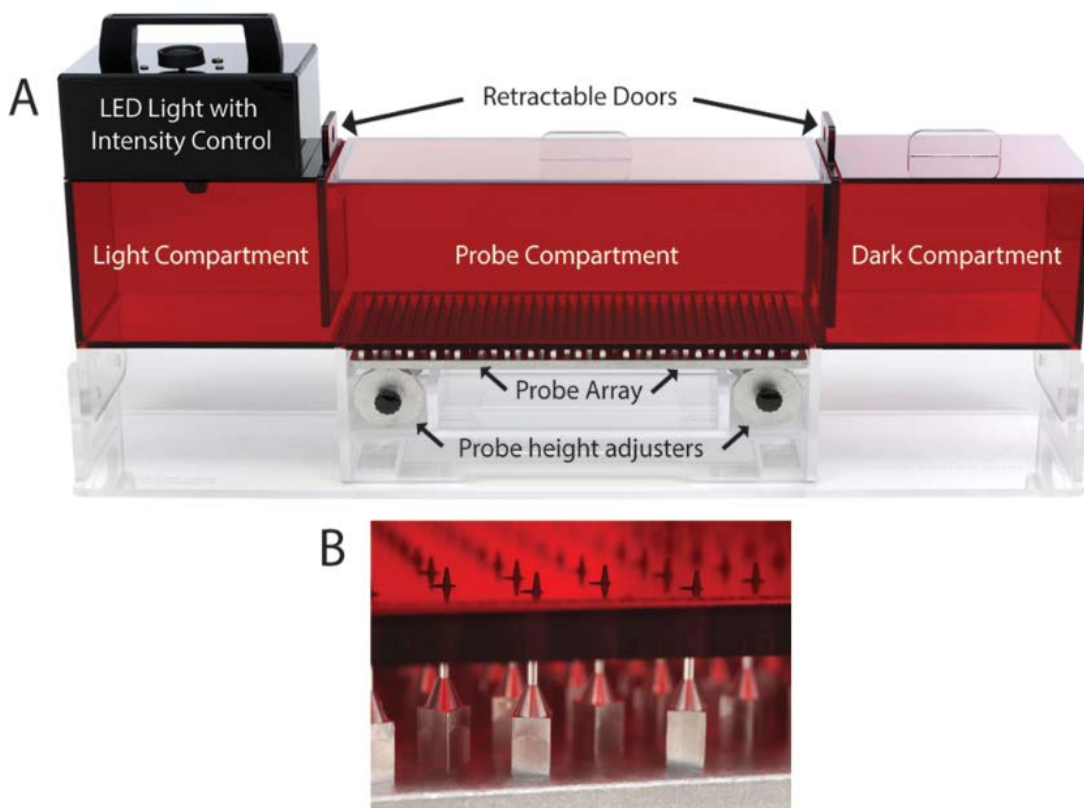


Figure 14 : Le système de conflit mécanique (Harte *et al.*, 2016)

Le dispositif (A), couvert d'une résine rouge, contient un compartiment illuminé par une LED, un couloir dont le sol est constitué d'épingles pointues à hauteur ajustable (B), et d'un compartiment sombre. Ces compartiments sont séparés par des portes rétractables.

Le **paradigme d'échappement/évitement de place** fait écho au SCM. L'animal est placé dans un compartiment noir où il reçoit des stimulations mécaniques (filament de von Frey élicitant un retrait de la patte) et a la possibilité d'échapper au *stimulus* en se plaçant dans un compartiment lumineux

aversif. Le temps que met l'animal à s'échapper est mesuré. Ce test présente l'avantage de pouvoir stimuler les pattes de manière différentielle (Fuchs & McNabb, 2012).

c) *Le test thermique de préférence de place*

Ce test consiste à placer les animaux dans un compartiment contenant **deux plaques de températures différentes** (la température neutre et la température test) ; le temps passé sur chaque plaque et le nombre de passages d'une plaque à l'autre sont mesurés (Balayssac *et al.*, 2014). Ce test permet ainsi d'évaluer chez un animal libre de ses mouvements une préférence ou une aversion à certaines températures, qu'elles soient nociceptives ou non. Des études chez les rats mâles et femelles ont par exemple mis en évidence que les femelles ont une plus grande tolérance aux températures non neutres (i.e différentes de la température ambiante soit environ 25°C) par rapport aux mâles (Bourgeois *et al.*, 2022), et que **les femelles ont une préférence générale pour les températures plus chaudes** comparativement aux **mâles qui préfèrent les températures froides** (Modi *et al.*, 2023).

Différentes variantes de ce test ont été développées, incluant un dispositif permettant de tester jusqu'à 16 animaux différents (Caporoso *et al.*, 2020), un dispositif mettant en conflit un stimulus lumineux aversif contre un stimulus thermique (Vierck *et al.*, 2008a), ou encore l'utilisation d'un gradient continu linéaire ou circulaire (Moqrich *et al.*, 2005).

d) *Les tests opérants thermiques*

Certains tests vont au-delà d'un comportement inné, et reposent sur l'apprentissage des animaux à effectuer une tâche lorsqu'ils sont mis en conditions de test.

Une variante du test de préférence de place thermique repose sur la **motivation à aller chercher une récompense** (i.e eau sucrée) sur une plaque à température aversive, contre l'absence de *stimulus* plaisant (biberon vide ou contenant de l'eau simple) sur une plaque à température ambiante (Reker *et al.*, 2020).

D'autres tests, à l'instar du SCM, cherchent à **mettre en conflit deux types de stimulus aversifs** afin de pousser l'animal à faire un choix.

« **L'Escapetest** », développé par Mauderli et collaborateurs, place un animal dans un compartiment chauffé à différentes températures (43°C, 45°C, 47°C et 49°C). Afin d'échapper au stimulus nociceptif chaud, l'animal est entraîné à monter sur une plateforme éclairée (85 lux) et inclinée à 12°. La latence que met l'animal à monter sur la plateforme éclairée dans une position désagréable rend compte de la motivation à échapper au stimulus nociceptif chaud (Mauderli *et al.*, 2000).

« **L'AlgoTrack** » mis en place par Baliki et collaborateurs est constitué de deux plaques chauffantes séparées, équipées d'un détecteur de mouvement permettant de savoir sur quelle plaque l'animal est positionné. La plaque en question est ensuite chauffée à 5°C/s jusqu'à ce que l'animal s'échappe et se place sur l'autre plaque, et l'opération est répétée après 5 minutes. La température élicitant l'échappement de l'animal est mesurée (Baliki *et al.*, 2005).

3. Les modèles animaux

Les tests nociceptifs, par des *stimulus* évoqués ou basés sur des choix comportementaux, sont donc des outils efficaces en recherche préclinique, avec des avantages et limitations à prendre en compte. Cependant, l'évaluation de la composante sensorielle nociceptive de la douleur aigüe n'est pas suffisante pour le développement de traitements antalgiques qui pourraient avoir un intérêt en clinique humaine. Afin de mieux s'apparenter au contexte des douleurs pathologiques chez l'Homme, l'utilisation de **modèles animaux de douleur** est donc nécessaire et cruciale.

La pertinence d'un modèle animal repose sur trois critères de validité : i) **l'isomorphie**, le modèle doit présenter des symptômes similaires à ceux observés en clinique, ii) **l'homologie**, le modèle doit avoir la même étiologie (i.e la cause de la pathologie) et iii) **la prédictibilité**, la réponse au traitement du modèle doit être comparable à celle de la pathologie humaine.

a) *Modèles de douleurs inflammatoires*

Dans des conditions normales, le système immunitaire déclenche une réponse inflammatoire dans le but **de protéger l'organisme contre des pathogènes** et promeut la **réparation tissulaire**. Des médiateurs de l'inflammation tels que les prostaglandines, cytokines, chimiokines, neuropeptides et facteurs de croissances sont libérés au site de lésion (ou de contamination) et ont la capacité de sensibiliser les nocicepteurs (Kidd & Urban, 2001). L'implication du système nerveux sensoriel dans la mise en place de l'inflammation s'appelle **l'inflammation neurogénique**.

En conditions pathologiques, l'inflammation perdure au-delà de son utilité physiologique, devient chronique (durée > 3 mois) et provoque des lésions tissulaires ainsi que de la douleur. L'utilisation de modèles de douleur inflammatoire a donc permis d'étudier et de décrypter les mécanismes sous-jacents à ce phénomène, à identifier les molécules endogènes responsables, et à tester des potentiels traitements pour y remédier (Muley *et al.*, 2016).

Le **test de la formaline** est une procédure largement utilisée, considéré comme un **modèle inflammatoire à court-terme** (Dubuisson & Dennis, 1977). L'injection de formaline induit des comportements nociceptifs tels que des soulèvements de la patte, tressaillements, léchage et vocalisation (McNamara *et al.*, 2007). Injectée de manière intradermale dans la surface plantaire (ou

dorsale) d'une patte avant ou arrière, la formaline agit sur le récepteur de la superfamille « transient receptor potential » à ankyrine 1 (TRPA1) et induit un comportement qui se divise en deux phases : i) la phase I (5-10min), sensible aux anesthésiques locaux est associée à la stimulation directe des fibres afférentes C par la formaline, et ii) la phase II (10-40min) implique à la fois une réponse inflammatoire et une sensibilisation centrale des neurones de la CDME. Par l'utilisation de drogues anti-inflammatoires non-stéroïdiennes, certains acteurs participant à cette phase inflammatoire ont été identifiés comme les prostaglandines (Hunskar & Hole, 1987), la cyclooxygénase 2 (Cox-2) (Yamamoto & Nozaki-Taguchi, 2002) et l'interleukine 33 (Han *et al.*, 2013).

L'application topique d'agents tels que la **capsaïcine** ou **l'huile de moutarde** (Inoue *et al.*, 1997) induit des inflammations locales cutanées qui sensibilisent les nocicepteurs en abaissant leur seuil d'activation mécanique et thermique. Ils provoquent non seulement une hyperalgésie sur la région où ils ont été appliqués (hyperalgésie primaire) mais également sur les zones autour de l'inflammation initiale (hyperalgésie secondaire) (Muley *et al.*, 2016).

Ces composés, ainsi que des agents chimiques acides comme le **phenylbenzoquinone** ou **l'acide acétique** sont également utilisés dans des modèles de **douleurs viscérales** (i.e modélisation du syndrome de l'intestin irritable ou maladie de Crohn) par des injections intracoliques ou intrapéritonéales. Ils provoquent des comportements de douleurs spontanées (contorsions, étirement et léchage de l'abdomen, diminution du toilettage) ainsi qu'une hyperalgésie mécanique de l'abdomen et une inflammation du colon (Muley *et al.*, 2016).

D'autres modèles reposent sur des agents plus puissants afin d'engendrer une réponse inflammatoire plus longue et marquée. Ces modèles incluent l'injection de **l'adjuvant complet de Freund (CFA)**, une suspension de *Mycobacterium butyricum* ou *Mycobacterium tuberculosis* ou de **carraghénanes de type λ**, des polysaccharides sulfatés extraits d'algues de mer, qui provoquent des hypersensibilités mécaniques et thermiques pouvant durer de quelques jours à plusieurs semaines (Barrot, 2012).

L'injection de **carraghénane seule**, d'un mélange de **carraghénanes et kaolin** (minéral de silicate d'aluminium hydraté), de **zymozan** (complexe protéique isolé de la paroi membranaire de levure *Saccharomyces cerevisiae*), de **collagène** ou de **CFA**, dans les articulations du genou ou de la cheville, est utilisée pour modéliser les **inflammations articulaires** comme la **monoarthrite** (Neugebauer *et al.*, 2007).

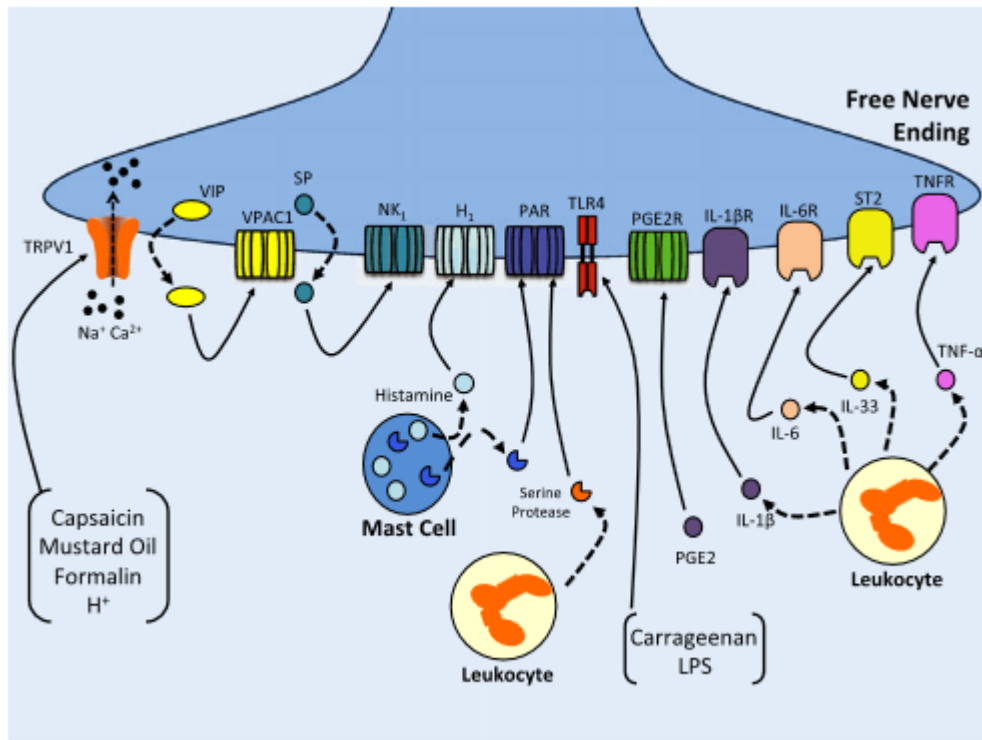


Figure 15 : Schéma de l'inflammation neurogénique (Muley *et al.*, 2016)

Les agents inflammatoires (capsaïcine, huile de moutarde, formoline, acide) active les récepteurs du nocicepteur (TRPV1, TRPA1 non figurés), qui induit une libération de neuropeptides comme la SP ou le peptide vasoactif intestinal (VIP). Ils se lient à leur récepteurs respectifs (NK1 et VPAC1). L'histamine libérée par les mastocytes active le récepteur H1. Les mastocytes et leucocytes libère de la sérine protéase qui clive divers récepteurs activés par protéines (PAR), et module l'activité du nocicepteur. Le récepteur toll-like receptor 4 (TLR4) est activé par des substances exogènes comme les carraghénanes ou les liposaccharides (LPS). La prostagandine E2 (PGE2) active principalement son récepteur PEG2R. Les cytokines pro-inflammatoire comme les interleukines (IL-1β, IL-6, IL-33), le facteur de nécrose tumoral α (TNFα), sécrétées par les leucocytes, se lient à leurs récepteurs respectifs pour exacerbé la transmission nociceptive.

b) Modèles de douleur neuropathique

Les douleurs neuropathiques proviennent de **lésions ou d'une maladie affectant le système nerveux somatosensoriel**. Elles se manifestent par des anomalies sensorielles (dysesthésie ou paresthésie), des douleurs spontanées continues ou paroxystiques, et des hyperalgésies et allodynies à la fois mécaniques et thermiques. Souvent, les douleurs neuropathiques apparaissent dans des maladies comme le cancer, le SIDA, le diabète, le syndrome radiculaire lombaire, l'herpès, la sclérose en plaque, les lésions de la moelle épinière, des maladies auto-immunes, des canalopathies ou encore à la suite de crise cardiaque. On parle alors de douleurs chroniques secondaires comparativement à la douleur chronique primaire qui est une maladie à part entière (Treede *et al.*, 2019). Il est également courant de développer des douleurs neuropathiques à la suite de chirurgies (Jaggi *et al.*, 2011). En clinique, les

douleurs chroniques neuropathiques, primaires ou secondaires, sont généralement pharmacorésistantes aux traitements analgésiques classiques, et sont souvent accompagnées de **comorbidités anxiodépressives** comprenant une sensibilité accrue aux troubles anxio-dépressifs, un isolement social et des troubles du sommeil (Colloca *et al.*, 2017).

Un grand nombre de modèles animaux ont été développés sur la base de ce qui est connu de l'étiologie des pathologies humaines, visant à reproduire les lésions nerveuses (spinales, trigéminales,...), les neuropathies diabétiques ou induites par les traitement anticancéreux, ou encore les douleurs postopératoires [pour une revue détaillée : (Jaggi *et al.*, 2011)].

Dans ce manuscrit, j'ai fait le choix de ne présenter que les modèles qui reposent sur une lésion ou une compression du nerf sciatique, innervant les pattes arrières de l'animal.

Initialement développé par Bennett et Xie, le modèle de « **chronique constriction injury (CCI)** » consiste à effectuer trois à quatre ligatures lâches autour du nerf sciatique (Bennett & Xie, 1988). Ce modèle induit des **hyperalgésies et allodynies mécaniques et thermiques**, notablement vis-à-vis du froid, pendant au moins 7 semaines (De Vry *et al.*, 2004). Chez les animaux CCI, des comportements de **douleurs spontanées** sont observés : outre un léchage excessif, ils tendent à ne pas placer leur poids sur la patte blessée, ce jusqu'à boiter afin de ne pas poser la patte sur le sol. Des études électrophysiologiques ont également mis en évidence une **diminution de la vitesse de conduction du nerf**, associée à une altération de la myélinisation des FAP (Carlton *et al.*, 1991) ainsi qu'une sensibilisation des fibres A et C (Gabay & Tal, 2004).

Des variantes de ce modèle ont ensuite été développées : la constriction chronique du nerf par un manchon de polyéthylène ou « **cuff** » (Benbouzid *et al.*, 2008), une ligature serrée qui recouvre un tiers ou la moitié du nerf sciatique, appelée **ligature partielle du nerf sciatique** (Seltzer *et al.*, 1990), **une ligature des nerfs spinaux L5 et L6** (Ho Kim & Mo Chung, 1992), le modèle de lésion partielle du nerf sciatique ou « **spared nerve injury** » qui consiste à sectionner deux des trois branches terminales du nerf sciatique, les branches du péroné et du tibia (Decosterd & Woolf, 2000).

Ces modèles ont ainsi permis d'élargir notre compréhension des mécanismes sous-jacents à l'établissement de douleurs chronique de type neuropathique, bien que beaucoup reste encore à décrypter. **Un certain nombre d'hypothèses ont ainsi pu être mises en avant afin d'expliquer l'origine de ces douleurs** : une altération des FAP lésées résultant en une sensibilisation et une activité spontanée liées à des altérations de fonction des canaux ioniques, une altération des fibres sensorielles non lésées qui participent à l'établissement de douleurs persistantes, l'implication du système nerveux sympathique, une altération des facteurs de croissances, des mécanismes de désinhibition du système nerveux central (i.e sensibilisation centrale), une altération de la communication des nocicepteurs, une

altération des contrôles descendants de la douleur ou encore une augmentation de la neuroinflammation périphérique et centrale. Les détails de ces mécanismes ne font pas l'objet de ce manuscrit, mais sont repris en détail dans la revue suivante : (Campbell & Meyer, 2006).

Si ces modèles sont efficaces pour reproduire les symptômes douloureux et certaines conséquences émotionnelles observées en clinique, il reste important de noter que la translation de l'animal à l'Homme reste limitée. Chez l'animal, la **composante « chronique » est en effet rarement étudiée**. Si certains modèles présentent des symptômes jusqu'à 12 semaines après établissement de la neuropathie (Yalcin *et al.*, 2014), ils sont loin de refléter la réalité clinique de patients qui vivent avec des douleurs chroniques pendant des années. Ces modèles sont donc plus utiles dans la compréhension de l'établissement et la mise en place des douleurs chroniques ainsi que pour l'évaluation de l'efficacité de certains traitements, plutôt que dans le maintien à long terme et la prise en charge de ces douleurs longtemps après le début de la pathologie.

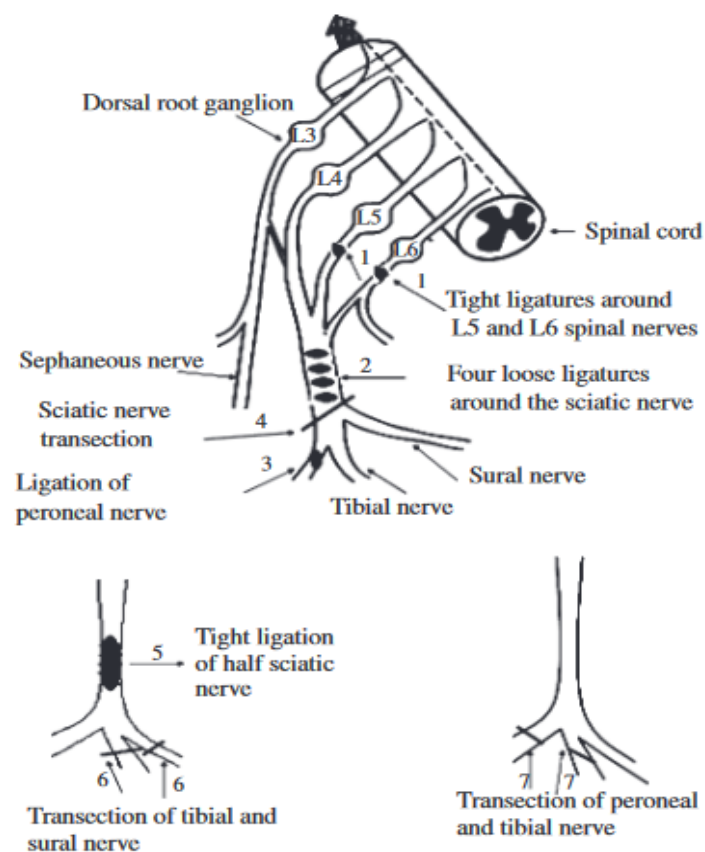


Figure 16 : Représentation de différents modèles de lésion ou compression du nerf sciatique (Jaggi *et al.*, 2011)

(1) ligature des nerfs spinaux, (2) constriction chronique du nerf spinal par ligatures (manchon de polyéthylène ou cuff non figuré), (3) ligature du nerf péroné, (4) axotomie par transection du nerf sciatique, (5) ligature partielle du nerf sciatique, (6) transection des nerfs tibial et sural, (7) lésion partielle du nerf sciatique par transection des nerfs du péroné et du tibia

c) *Hypersensibilités nociceptives dans le modèle de séparation maternelle néonatale*

Dans le cadre de ma thèse, je me suis également intéressée aux hypersensibilités nociceptives induites par un stress néonatal non douloureux : la séparation maternelle néonatale (SMN).

Il est maintenant bien connu que des **expériences stressantes durant la période néonatale** ont des conséquences à long terme sur le bon développement des fonctions cérébrales, et notamment du système nociceptif (Fitzgerald, 2005). C'est le cas d'un excès de stimulations douloureuses pendant la période néonatale. Notre laboratoire a montré que la séparation maternelle néonatale, un stress non douloureux, avait des conséquences similaires (Juif *et al.*, 2016; Melchior *et al.*, 2018; Gazzo *et al.*, 2021). Utilisés pour mimer certaines conséquences de la prématurité chez l'Homme, il existe un grand nombre de modèles animaux de stress néonatal visant à décrypter les mécanismes sous-jacents aux **effets délétères affectant la maturation du système nociceptif** (Melchior *et al.*, 2021). Les rongeurs ont à la naissance un système nerveux d'une maturité similaire à celle retrouvée chez les bébés prématurés, ce qui permet de mesurer l'impact de divers stressseurs de l'environnement néonatal ainsi que les conséquences à long terme chez l'individu adulte. Dans ces modèles, on retrouve à la fois **des hyposensibilités et des hypersensibilités nociceptives** somatiques et viscérales, des déficits des contrôles descendants de la douleur, une augmentation de la neuroinflammation, une augmentation des risques de développer des douleurs chroniques et des troubles anxiodépressifs (Plotsky & Meaney, 1993; Taddio & Katz, 2005; Grunau *et al.*, 2006; Aisa *et al.*, 2007; Schwaller & Fitzgerald, 2014).

Parmi les nombreux modèles de stress néonatal existants, le modèle de SMN le plus utilisé sépare les petits de la cage de leur mère 3h par jour du 2^{ème} au 12^{ème} jour post-natal (P2-P12). A l'âge adulte, les conséquences sur le système nociceptif sont de plus en plus documentées.

L'hypersensibilité viscérale (Coutinho *et al.*, 2002) a été la première à être décrite. Cette hypersensibilité semble liée à i) des altérations morphologiques des couches musculaires et muqueuses du tube digestif, ii) une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale, iii) une augmentation de l'activité des neurones entériques iv) une augmentation de la motilité colonique induite par le stress, v) une inflammation locale médiée par la dégranulation des mastocytes et sécrétion d'IL-6 ainsi que vi) une altération du microbiote intestinal. Ces résultats ont donc placé le modèle de SMN comme potentiel modèle du syndrome de l'intestin irritable ou maladie de Crohn (Melchior *et al.*, 2021).

Au niveau somatique, une **hypersensibilité mécanique et thermique au chaud** a été décrite (Melchior *et al.*, 2018), corrélée à une **hyperexcitabilité des FAP**, à une augmentation de **l'expression du canal sodium voltage dépendant Na_v1.8** (Hu *et al.*, 2013; Juif *et al.*, 2016) et à une diminution de **l'expression**

du canal potassium voltage dépendant $K_v1.2$ dans les GRD (Luo *et al.*, 2011). Dans la moelle épinière d'animaux SMN, une **augmentation de l'activité des neurones nociceptifs des couches superficielles et profondes** a été décrite, corrélée à un déficit de recapture du glutamate par les astrocytes (Chung *et al.*, 2007b; Gosselin *et al.*, 2010) ainsi que des **modification dans l'expression de facteurs de croissance** durant la période néonatale jusqu'à l'âge adulte (Juif *et al.*, 2016).

Au niveau supraspinal, les animaux SMN présentent une **altération de l'activité des structures et circuits de la « Pain Matrix »** dont i) une augmentation de l'activité glutamatergique dans l'hippocampe (Chen *et al.*, 2017), ii) une augmentation de l'activité du CCA (Chung *et al.*, 2007a), iii) une altération de la plasticité du cortex somatosensoriel (Chung *et al.*, 2007a) et préfrontal (Monroy *et al.*, 2010; Chocyk *et al.*, 2013) et iv) une hypertrophie de l'amygdale (Koe *et al.*, 2016).

Parallèlement, il également été montré un certain nombre **d'altérations des contrôles descendants de la douleur** dans le modèle NMS. Ces animaux ont ainsi une **augmentation de l'activité excitatrice dans l'amygdale**, associée à une augmentation de l'expression de TRPV1, qui joue un rôle dans l'hypersensibilité viscérale (Xiao *et al.*, 2016). Les animaux SMN ont également un **déficit des contrôles Otergiques** hypothalamiques, notamment impliqués dans l'analgésie liée au stress (Melchior *et al.*, 2018), et un **déficit des contrôles opioïdériques** (Kalinichev *et al.*, 2001) corrélé à une diminution des récepteurs opioïdériques mu, delta et kappa dans la SPGA, la RVM et l'amygdale (Nakamoto *et al.*, 2020).

Une hypothèse récente visant à expliquer les hypersensibilités nociceptives dans le modèle SMN se concentre sur l'influence du système immunitaire et de **la réponse inflammatoire** sur le développement des douleurs persistantes (Ji *et al.*, 2018). Dans ce contexte, il a été montré dans le modèle SMN que l'expression du récepteur TLR4 dans la microglie de l'hypothalamus est augmentée ainsi que la sécrétion des cytokines proinflammatoires IL-1 β et du facteur de nécrose tumorale TNF- α chez la souris ou de TNF- α et IL-6 chez le rat (Roque *et al.*, 2016). Une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-6, TNF α , et de Cox-2 est également observée ce qui induit une plus grande libération de prostaglandines 2, ainsi qu'une diminution de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 dans la moelle épinière (Gazzo *et al.*, 2021). Enfin, une augmentation de l'expression de l'importeur chlorure NKCC1, impliqué dans la douleur inflammatoire est observée (Price *et al.*, 2005; Gazzo *et al.*, 2021). Ces résultats sous-tendent que le système nerveux des animaux avec une histoire de SMN serait dans **un état « subinflammatoire »** se traduisant par une hypersensibilité nociceptive comportementale.

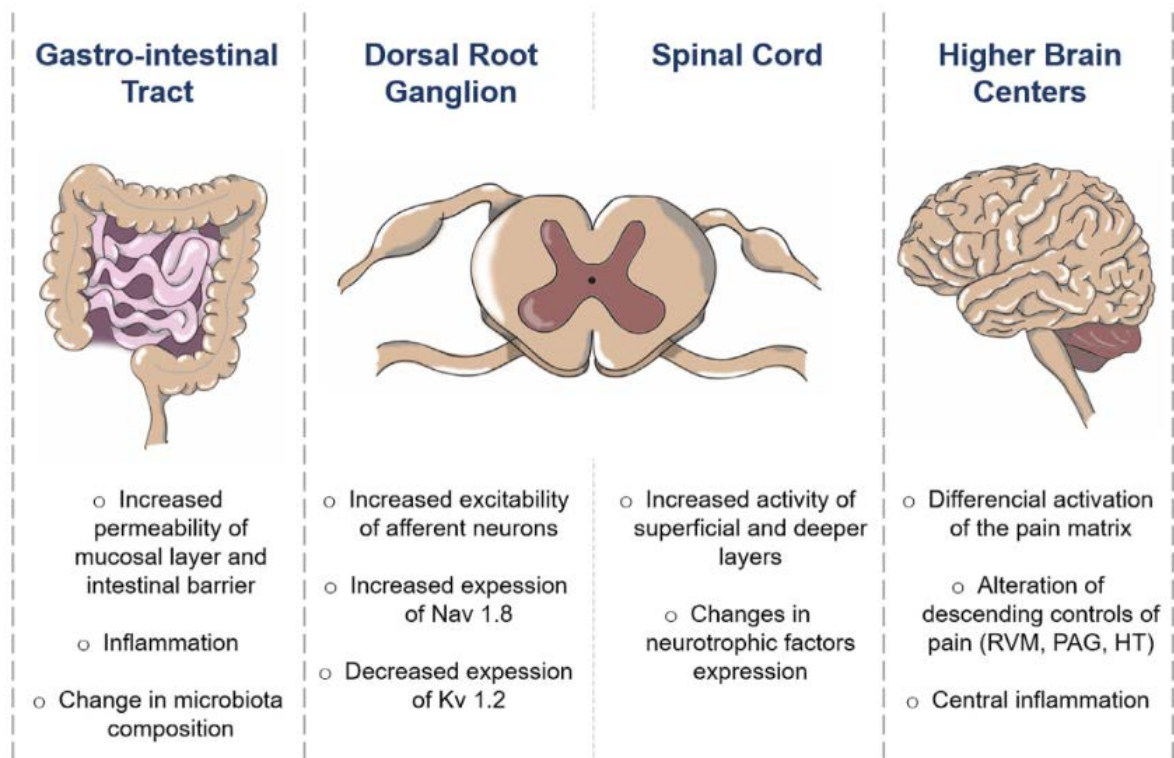


Figure 17 : Conséquences d'une SMN sur le système nociceptif (Melchior et al., 2021)

Ainsi, dans nombre de ces pathologies, la perception douloureuse des informations thermiques est altérée. Dans le but d'affiner la compréhension des mécanismes responsables de ces anomalies sensorielles, il est donc nécessaire de comprendre comment les informations thermiques, notamment nociceptives, sont détectées et intégrées par l'organisme.

C. Partie 3 : Thermonociception

Pour revue intégrée → (Filingeri, 2016)

La peau, et les cellules qui la composent, est adaptée à des températures variant de 30 à 34°C sans provoquer de ressenti particulier. Toute variation, augmentation ou diminution, est ainsi intégrée et perçue comme sensation de refroidissement ou chauffage. Il est à noter que la sensibilité thermique n'est pas homogène sur toute la surface cutanée et que le ressenti d'une température dépend de la région de la peau qui perçoit le *stimulus* (Hensel, 1981) ; par exemple le front et les joues sont plus sensibles au chaud que les bras et les jambes.

1. Détection périphérique

Les changements de températures sont majoritairement détectés en périphérie par les FAP sensorielles innervant la surface cutanée. Zotterman fût le premier à identifier ces fibres sensorielles thermosensibles dans la langue du chat (Zotterman, 1936).

Historiquement, il a été décrit que les fibres de type A étaient seules responsables de la transduction de l'information froide (Iggo, 1969). Ces fibres sont de type A δ et A β d'après leurs diamètres (1.5 à 3 μ m) et leur vitesse de conduction (3.6 à 15m/s) (Hensel & Zotterman, 1951; Hensel & Boman, 1960). Cependant, une sous-population de fibres C amyéliniques est également capable de détecter le refroidissement de la peau avec un profil différent que celui des fibres A. Elles jouent donc un rôle complémentaire dans la thermosensibilité au froid en étant notamment responsables des sensations paradoxales telles que l'impression de brûlure provoquée par un froid intense (Filingeri, 2016).

Inversement, la prise en charge des informations chaudes a longtemps été attribuée aux fibres C (Hallin *et al.*, 1982) avant la mise en évidence de deux sous-types de fibres A δ possédant des seuils d'activation au chaud différents (fibre A δ de type I et A δ de type II) (Treede *et al.*, 1995).

Les avancées en biologie moléculaire ont ensuite permis d'affiner la compréhension des mécanismes sous-jacents à l'intégration et la perception des informations thermiques.

C'est l'identification du récepteur au chaud nociceptif **TRPV1** (initialement nommé VR1 pour « Vallinoid Receptor type 1) qui a ouvert la voie de la compréhension des mécanismes moléculaires responsables de la perception thermique (Caterina *et al.*, 1997). La superfamille de récepteur TRP contient à ce jour plus d'une trentaine de membres. De nombreux TRP présentent une thermosensibilité qui collectivement couvrent l'intégralité du spectre de température. Les membres de cette famille sont donc considérés comme les **détecteurs moléculaire primaires des informations thermiques** (Clapham *et al.*, 2001; Vriens *et al.*, 2014). Bien que les mécanismes spécifiques sous-jacents à l'activation de ces récepteurs par la température sont encore largement inconnus (Gees *et*

al., 2012), leur structure générale est celle d'un canal composé de six domaines transmembranaires avec un pore de perméabilité défini par les 5^{ème} et le 6^{ème} domaines transmembranaires. Leur région C-terminale est divisée en deux « boîtes TRP » : une région contenant un motif de 25 acides aminés, et une région riche en proline, qui ensemble détermineraient la sensibilité thermique du récepteur (Liao *et al.*, 2013). Cette sensibilité semble également dépendant du voltage (Voets *et al.*, 2004).

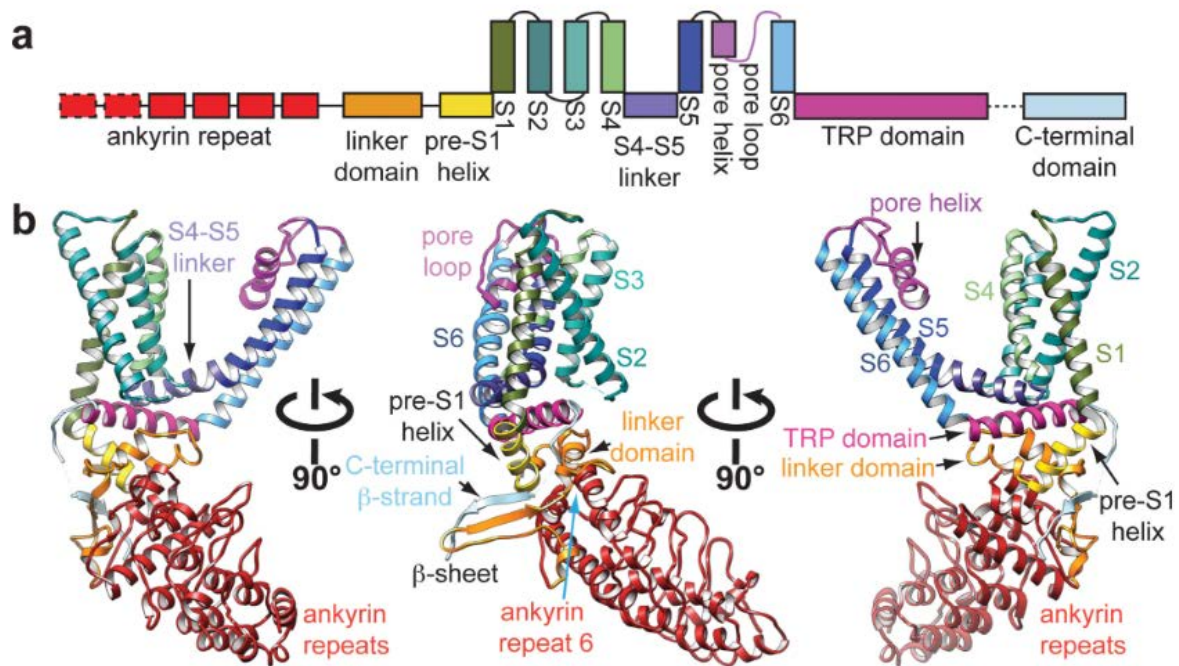


Figure 18 : Structure du canal TRPV1 (Liao *et al.*, 2013)

(a) Représentation linéaire des domaines identifiés dans un canal TRV1 avec un code couleur correspondant à la représentation 3d du canal (b)

a) Récepteurs au chaud

(1) Canaux TRP

Le récepteur TRPV1 est activé par la capsaïcine, un principe actif trouvé dans le piment qui provoque une sensation de brûlure et par des températures chaudes nociceptives supérieures à 42-43°C. Cette température d'activation a déterminé le seuil nociceptif au chaud chez les organismes vivants. Son activation entraîne un changement de conformation de la protéine qui forme un canal perméable aux cations de manière non sélective. Dans les modèles animaux, une inactivation génétique du site de liaison de la capsaïcine entraîne une insensibilité quasi-totale à des températures nociceptives supérieures à 42-43°C, ainsi d'une absence d'hypersensibilité au chaud dans les états douloureux inflammatoires. La découverte de ces propriétés du TRPV1 ont été essentielles à la compréhension de

la thermonociception au chaud (Caterina *et al.*, 1997; Caterina *et al.*, 2000; Clapham *et al.*, 2001). En bon accord avec ces résultats, TRPV1 est exprimé par 75% des neurones de petits diamètres des ganglions rachidiens dorsaux, soit les fibres nociceptives A δ et C (Davis *et al.*, 2000), ainsi que par les neurones de la couche I et II de la CDME (Clapham *et al.*, 2001).

Néanmoins, d'autres récepteurs semblent également impliqués dans la détection du chaud comme l'indique la sensibilité thermique au chaud résiduelle après inactivation ou ablation de TRPV1 (Pogorzala *et al.*, 2013).

Le récepteur **TRPV2**, exprimé par les fibres A δ de type I présente 50% d'homologie avec TRPV1 et est activé par des **températures supérieures à 52°C** mais est insensible à la capsaïcine. Initialement pensé comme second récepteur au chaud nociceptif, cette hypothèse a été réfutée par le fait que l'inactivation de ce récepteur n'affecte ni la sensibilité, ni la réponse comportementale au chaud nociceptif (Park *et al.*, 2011). Suite à des stimulations nociceptives prolongées, le récepteur TRPV2 voit son seuil d'activation baisser ce qui suggère qu'il **participerait au phénomène d'hyperalgésie au chaud** bien qu'il ne semble pas nécessaire à leur développement (Vriens *et al.*, 2014).

Deux autres candidats dans la détection du chaud nociceptifs sont les canaux **TRPM3** (de la sous famille des TRP à Melastatine) **et TRPA1**. Activé à partir de 40°C, TRPM3 est exprimé, seul ou parfois avec TRPV1, par les nocicepteurs du GRD ou du ganglion trigéminal. Sa délétion génétique mène à sensibilité thermique au chaud réduite, ainsi qu'à un déficit dans le développement de l'hyperalgésie au chaud provoquée par une inflammation (Vriens *et al.*, 2011).

Le rôle du récepteur TRPA1 dans la sensibilité au chaud a souvent été mis de côté car il a d'abord été suspecté de jouer un rôle pour la détection du froid nociceptif. Pourtant, il reste impliqué dans la détection du chaud et tout particulièrement lors du développement de douleurs inflammatoires (Bautista *et al.*, 2006; Hoffmann *et al.*, 2013; Moparthi *et al.*, 2016; Nozadze *et al.*, 2016). A l'instar de TRPM3, TRPA1 est co-exprimé avec TRPV1, ce qui a poussé Vandewauw et collaborateurs à proposer que la **triade TRPV1-TRPM3-TRPA1** sert de complexe moléculaire détectrice du chaud nociceptif. Leur inactivation concomitante résulte en une perte quasi-complète de toute sensibilité à la chaleur chez les souris (Vandewauw *et al.*, 2018).

Les récepteurs **TRPV3 et TRPV4** quant à eux sont les candidats principaux pour la perception des **informations chaudes non nociceptives** avec une activation autour de 25 et 35°C. Ils sont exprimés fortement par les **cellules de l'épiderme et kératinocytes** et également (mais plus faiblement) par les neurones sensoriels. Ceci suggère que les kératinocytes seraient responsables de la transmission des informations chaudes non nociceptives vers les neurones sensoriels *via* la libération de messagers tels

que l'Adénosine triphosphate ou l'oxyde nitrique (Vriens *et al.*, 2014). L'inactivation génétique des TRPV3/TRPV4 résulte en une perte de préférence thermique à des températures non nociceptives. Si ces récepteurs peuvent présenter une activité dans la gamme des températures nociceptives, il est peu probable que leur rôle soit déterminant dans la transduction du chaud nociceptif (Filingeri, 2016).

Les canaux **TRPM2, TRPM4 et TRPM5** peuvent également être activés par des températures chaudes non nociceptives mais ne sont pas exprimés dans la peau (Lumpkin & Caterina, 2007).

(2) Canaux potassiques

En dehors de la superfamille des TRP, nombre d'évidences suggèrent que le **voltage membranaire et les canaux impliqués dans sa régulation** jouent un rôle crucial dans la transmission nociceptive (McCleskey & Gold, 1999; Julius & Basbaum, 2001; Bourinet *et al.*, 2005).

Dans ce contexte, le canal **TREK-1** fait partie de la famille des canaux potassium à deux pores K₂P qui ont un rôle de frein de l'excitabilité neuronale. TREK-1 est exprimé par les nocicepteurs des GRD et notamment par les fibres C peptidergiques et non peptidergiques où il est co-exprimé avec TRPV1, respectivement dans 60% à 90% de ces fibres. L'activité du canal augmente drastiquement sur une gamme de température entre 17°C et 42°C, apportant un frein à l'activité des fibres thermosensibles, et disparaît complètement au-delà de 42°C. La délétion génétique de TREK-1 provoque donc chez la souris une augmentation de la réponse au chaud des fibres C, corrélée à une hypersensibilité au chaud lors du test d'immersion de la queue, mais pas lors de celui de la plaque chaude à des température supérieure à 50°C (Alloui *et al.*, 2006). Similairement, l'inactivation concomitante de **TREK-1 et de TRAAK**, un autre canal K₂P, provoque une hypersensibilité à des températures de transition entre chaud non nociceptif et nociceptif (Noel *et al.*, 2009).

(3) Canaux calcium-dépendant

Le canal chlorure calcium-dépendant **Anoctamine 1 (ANO1)** est exprimé dans les nocicepteurs de type C, peptidergiques (CGRP positifs) et non peptidergiques (IB4 positifs). L'activation de ANO1 induit une dépolarisation de ces neurones à des températures supérieures à 44°C, suffisante pour provoquer l'émission de PA. Chez des souris où ANO1 a été génétiquement supprimé, la sensibilité thermique au chaud est diminuée (Cho *et al.*, 2012). ANO1 serait donc un détecteur additionnel participant à la transmission du chaud nociceptif.

b) Récepteurs au froid

Le premier récepteur au froid identifié a été **TRPM8**, TRP à la mélastatine 8, initialement nommé CMR1 pour « cold-menthol-receptor type 1 ».

Ce récepteur est activé par un refroidissement de la peau à une température inférieure à 25°C. Il est également activé par des agents chimiques provoquant une sensation de froid comme le menthol ou l'iciline (McKemy *et al.*, 2002; Peier *et al.*, 2002). Son activation ouvre le canal cationique non sélectif et se traduit par une augmentation du calcium libre intracellulaire. Des études d'inactivation génétique montrent une insensibilité partielle de la sensation du froid (Dhaka *et al.*, 2007; Milenkovic *et al.*, 2014), ainsi qu'une altération de la réponse comportementale provoquée par le froid nociceptif (Colburn *et al.*, 2007) sans altération des modalités mécaniques et thermiques au chaud (Knowlton *et al.*, 2013). Le TRPM8 joue donc un **rôle essentiel dans le codage du froid** ainsi que dans la détection du froid nociceptif et du développement d'hypersensibilité au froid dans des conditions pathologiques. Cette hypothèse est soutenue par le fait qu'il existe deux populations de neurones sensoriels exprimant TRPM8 : la plus grande population (80%) n'exprime aucun marqueur des nocicepteurs (comme TRPV1, CGRP ou IB4). L'autre population (12%) semble être des nocicepteurs de type C exprimant également TRPV1 (Dhaka *et al.*, 2008). Il existerait donc des voies spécifiques et différentielles pour la détection du froid non nociceptif et du froid nociceptif, médiés par des neurones TRPM8 différents.

Compte tenu du rôle non nociceptif spécifique de TRPM8 dans la transmission du froid nociceptif, le récepteur **TRPA1** s'est démarqué comme le candidat préférentiel dans la détection du froid nociceptif. Ce récepteur est exprimé par une sous population de neurones exprimant TRPV1, et est **activé à des températures inférieures à 17°C** (Story *et al.*, 2003). Il reste cependant inactif à des températures non nociceptives (28°C-23°C). TRPA1 est également activé par des agents chimiques piquants tels que l'huile de cannelle, l'huile gaulthérie, l'huile de trèfle, l'huile de moutarde, le gingembre ainsi que la bradykinine. Co-exprimé avec TRPV1 dans les neurones de type C, ce récepteur a donc été proposé **comme responsable de la sensation paradoxale de brûlure induite par le froid nociceptif** (Bandell *et al.*, 2004). Dans les viscères, il semblerait que TRPA1 soit le médiateur majoritaire de la sensation au froid par rapport à TRPM8 (Fajardo *et al.*, 2008).

Le rôle de TRPA1 en tant que détecteur du froid nociceptif reste tout de même **sujet à controverse** (Bautista *et al.*, 2006), notamment lorsque la différence génétique des canaux TRPA1 homologues est prise en compte. En effet, si les études chez les rongeurs semblent concluantes quant à son rôle dans l'intégration thermique, il n'en est pas de même chez les primates et chez l'Homme (Chen *et al.*, 2013;

Chen, 2015). Cette étude comparative entre différentes espèces (rat, souris, singe et Homme) montre en effet que si chez les rongeurs, TRPA1 est bien activé par des stimulations thermiques, ce canal semble insensible aux températures chez le singe et chez l'Homme. Ces résultats sont cependant contrastés par une récente étude sur le récepteur TRPA1 humain qui montre, *in vitro*, une sensibilité à la fois dans le froid et dans le chaud (Moparthi *et al.*, 2016).

Les rôles confondants des récepteurs TRPM8 et TRPA1 dans la transmission du froid ont donc ouvert la possibilité que d'autres canaux (i.e. en dehors de la superfamille des TRP) puissent être impliqués. Le canal sodium voltage-dépendant « résistant » à la tétrodothine **Nav1.8**, exprimé spécifiquement par les fibres nociceptives, a ainsi été mis en avant. Dans une étude électrophysiologique de préparation nerf-peau chez le rat, ce canal présente ainsi une activation à des températures nociceptives (refroidissement de 30°C à 10°C) et une totale perte d'activité des nocicepteurs en réponse au froid nociceptif lorsque Nav1.8 est inactivé. Cette propriété est corrélée par une réduction de la réponse comportementale au froid nociceptif chez les souris (Zimmermann *et al.*, 2007).

En accord avec cette observation et la sensibilité thermique au voltage membranaire, il a été montré que l'inhibition de certains **canaux potassium voltage-dépendant** (K_v) affecte la sensibilité thermique : i) l'inhibition de **Kv1** augmente le seuil d'activation des neurones sensibles au froid et réduit la réponse comportementale au froid nociceptif des rongeurs sans affecter les modalités mécaniques et thermiques chaudes (Madrid *et al.*, 2009) et ii) la suppression des canaux **TREK-1 et TRAAK** provoque des anomalies de sensibilités sur les modalités sensorielles mécaniques, thermiques au chaud et au froid (Noel *et al.*, 2009) en jouant sur l'excitabilité neuronale des nocicepteurs. Le rôle modulateur de ces canaux pourrait ainsi participer à la mise en place d'hyperalgésie ou d'allodynie au froid en conditions pathologiques (Viana *et al.*, 2002).

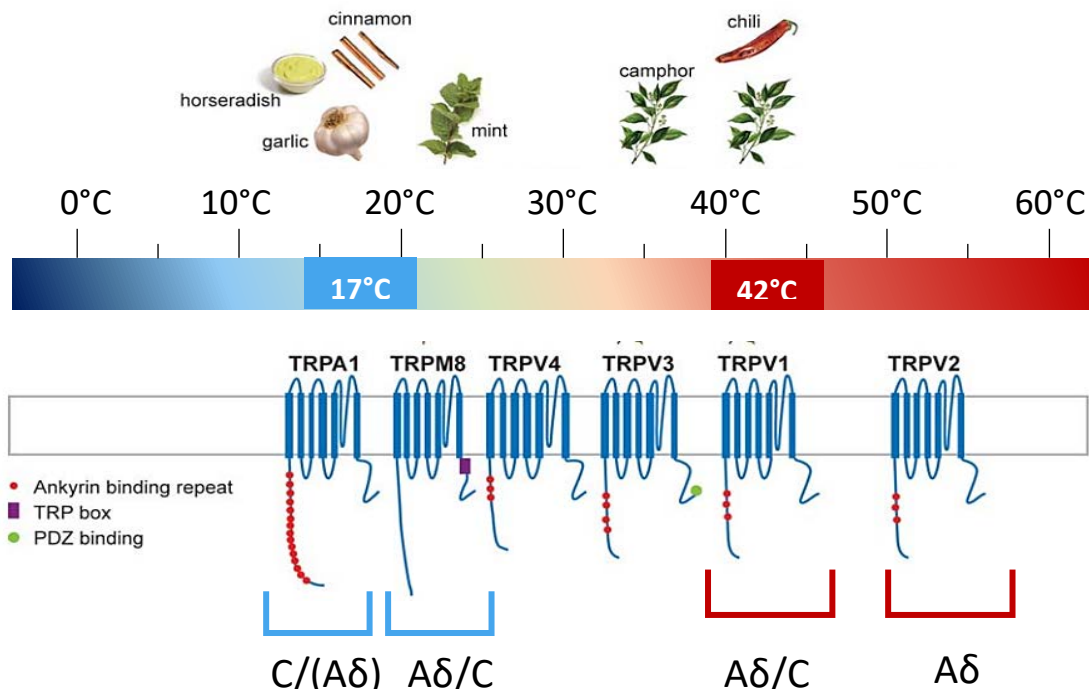


Figure 19 : Les thermorécepteurs de la superfamille des TRP adapté de (Dhaka et al., 2006)

Représentation de la sensibilité thermique de certains canaux TRP dans une gamme du non-nociceptif au nociceptif. Les seuils nociceptifs au froid (17°C) et au chaud (42°C) sont figurés. La structure schématique des canaux TRP inclut la présence de 6 domaines transmembranaire dont le pore se situe entre les domaines S5 et S6. Les régions N et C-terminales sont intracellulaire et présentent différents domaines d'interaction tels que la répétition d'ankyrine, la boîte TRP ou la zone de liaison PDZ. Les nocicepteurs exprimant les récepteurs au chaud et au froid nociceptif sont représentés, ainsi que certains composés chimiques naturel qui activent les récepteurs TRP tels que le piment (TRPV1), le camphre (TRPV3), la menthe (TRPM8), l'ail, la cannelle ou le raifort (TRPA1).

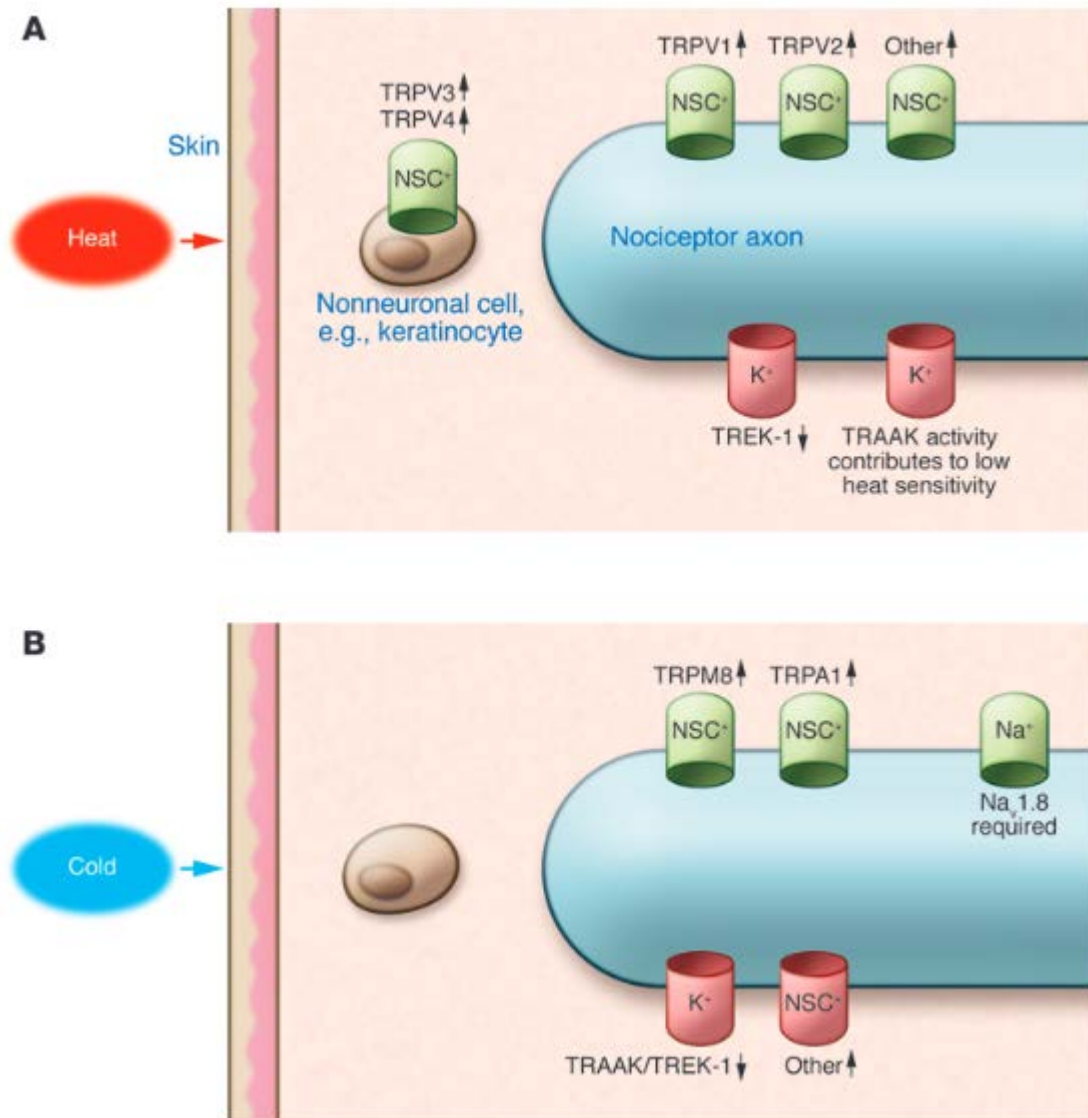


Figure 20 : La transmission thermique cutanée (Dubin & Patapoutian, 2010)

Mécanismes de transduction connus ou supposés de l'information thermique chaude (A) et froide (B). Le chaud non nociceptif est pris en charge par les cellules du derme (e.g keratinocyte) exprimant TRPV3 et TRPV4 tandis que le chaud nociceptif active les canaux cationiques non sélectifs (NSC) de la superfamille des TRP (TRPV1, TRPV2, TRPM8, TRPA1) ainsi que certains canaux calciques voltage-dépendant (TREK-1 et TRAAK), exprimés dans les terminaisons libres des nocicepteurs. Le froid met en jeu les canaux TRPM8 et TRPA1, le canal sodique voltage-dépendant Nav1.8 des nocicepteurs ainsi que d'autres canaux voltage dépendants comme TREK-1 et TRAAK.

2. Intégration spinale

La première identification de neurones spinaux de second ordre thermosensibles a été faite par Christensen et Perl chez le chat (Christensen & Perl, 1970). Dans la couche I, **certaines neurones répondent sélectivement** à une modalité ou l'autre (Khasabov *et al.*, 2001) et sont inactivés par la modalité inverse (i.e un refroidissement de la peau provoquant une inhibition des neurones sensibles au chaud). Une autre population de **neurones polymodaux** répond à la fois au froid et au chaud de forte intensité (>45°C). Ces neurones, recevant à la fois une innervation excitatrice et inhibitrice des FAP (Willis *et al.*, 1974), seraient donc le premier relais de l'intégration des informations thermiques dans la moelle épinière.

Dans la couche I, une interaction entre les **neurones COLD pyramidaux** et **neurones HPC multipolaires** a été montrée. L'étude d'un phénomène de sensation thermique paradoxale appelé « **L'illusion du gril** » ou « l'illusion de Thunberg » a permis de démontrer une balance fonctionnelle entre ces deux sous populations neuronales. Si des barres en métal maintenues alternativement à des températures non nociceptives de 40°C et 20°C sont touchées de manière simultanée, le sujet rapporte une sensation de brûlure (Craig & Bushnell, 1994). En condition basale, l'activité des neurones non nociceptifs COLD l'emporte sur celle des neurones HPC, il en résulte une sensation froide non douloureuse. Par contre, lorsque ces neurones sont inactivés (par exemple par une seconde stimulation non nociceptive chaude), l'activité seule des neurones HPC provoque l'apparition d'une sensation douloureuse chaude.

Une étude récente d'imagerie à deux-photons effectuée dans la moelle épinière de souris *in vivo* a permis d'affiner la compréhension de l'intégration spinale des informations thermiques dans la ME, en montrant notamment une **intégration différentielle entre le chaud et le froid**. A la suite d'un refroidissement de la patte plongée dans un bain à température contrôlée, les neurones répondant au froid (i.e. les fibres TRPM8⁺ et les fibres TRPV1⁺ pour les températures froides les plus intenses) montrent une augmentation d'activité au début du refroidissement suivi d'une adaptation au cours de la stimulation (i.e diminution de fréquence de décharge). Inversement, les neurones activés par le chaud (i.e. *via* les FAP TRPV1⁺) maintiennent une activité constante tout le long de la stimulation de façon proportionnelle à l'intensité (Ran *et al.*, 2016). Il n'est cependant pas encore déterminé si cette adaptation au froid découle de l'adaptation des FAP périphériques, où est une propriété intrinsèque des neurones spinaux.

3. Intégration sous-corticale et corticale

a) *Les régions sous-corticales*

Les informations thermiques détectées par les neurones de la couche I remontent *via* le tractus spinothalamique en passant par la colonne antérolatérale pour arriver dans les noyaux thalamiques, *a priori* avec une intégration différentielle : **le noyau thalamique VMPO serait le lieu d'intégration principal des informations thermiques**. Les neurones du VMPO présentent des CR réduits, topographiquement organisés de manière antéropostérieure, et répondent à des stimulations thermiques nociceptives (Craig *et al.*, 1994), tandis que les neurones des noyaux latéraux et médians (PVL et PVM) jouent un **rôle intégrateur complémentaire** (Filingeri, 2016). Des lésions au niveau de ces noyaux thalamiques provoquent une perte de sensations thermiques, tandis que leur stimulation induit des sensations douloureuses.

Le PB, le NTS et l'hypothalamus sont des régions impliquées dans la balance homéostatique et thermodynamique de l'organisme. Ils ont également un rôle supposé dans le traitement de l'information thermique (Norrzell & Craig, 1999; Morrison & Nakamura, 2019). Le PB reçoit des informations à la fois chaudes et froides, contacte l'aire pré-optique thalamique et participe à la régulation de la température corporelle (Xue *et al.*, 2016). Le NTS, recevant des projections de fibres TRPV1⁺ des nerfs faciaux (Fenwick *et al.*, 2014), présente deux types de neurones répondant à des stimulations de la cavité buccale : des neurones répondant au toucher et au chaud, et des neurones répondant au froid. Une large proportion de ces neurones participe également à la transmission du goût. Il a été proposé par Ogawa et collaborateurs que ces neurones sont responsables des sensations thermiques lors de la prise alimentaire (Ogawa *et al.*, 1988). La région latérale de l'hypothalamus contient des neurones activés par des stimulations chaudes et froides qui **contactent les neurones anti-nociceptif glutamatergique de la SGPA**. Leur activation optogénétique induit par exemple des effets anti-nociceptifs dans des modèles animaux inflammatoires et neuropathiques (Siemian *et al.*, 2021).

b) *Le cortex insulaire*

Recevant des projections des neurones de troisième ordre du VMPO, la **partie dorsale de l'insula** constitue une zone spécialisée du traitement des informations thermiques dans leur composante discriminative (Hua *et al.*, 2005) et affective (Craig *et al.*, 2000). Dans une étude d'imagerie cérébrale chez l'Homme, Craig et collaborateurs ont mis en évidence **le rôle discriminatif du cortex insulaire postérieur** dans l'intégration thermosensorielle, non observé dans le cortex somatosensoriel. Ce résultat suggère que le cortex insulaire serait le cœur d'intégration corticale des informations thermiques (Craig *et al.*, 2000). Dans ce contexte, des patients présentant des lésions au cortex

insulaire (pariétale et postérieur) développent des anomalies de sensations thermiques et douloureuses (Veldhuijzen *et al.*, 2010).

L'analyse de l'organisation spatiale des neurones insulaires thermosensibles montre une répartition homogène des neurones répondant au froid et au chaud selon deux profils : des neurones spécifiques à chaque modalité et des neurones polymodaux. Seule une petite fraction de ces neurones (3%) est également mécano-sensible (Vestergaard *et al.*, 2023).

De manière intéressante, similairement à ce qui est observé dans la moelle épinière, le cortex insulaire semble présenter une **intégration différentielle entre le chaud et le froid** : les stimulations froides provoquent une réponse rapide (80ms) et transitoire des neurones insulaires tandis que les stimulations chaudes induisent une réponse plus longue (latence de 320ms) et plus soutenue, à la fois chez les neurones spécifiques et polymodaux.

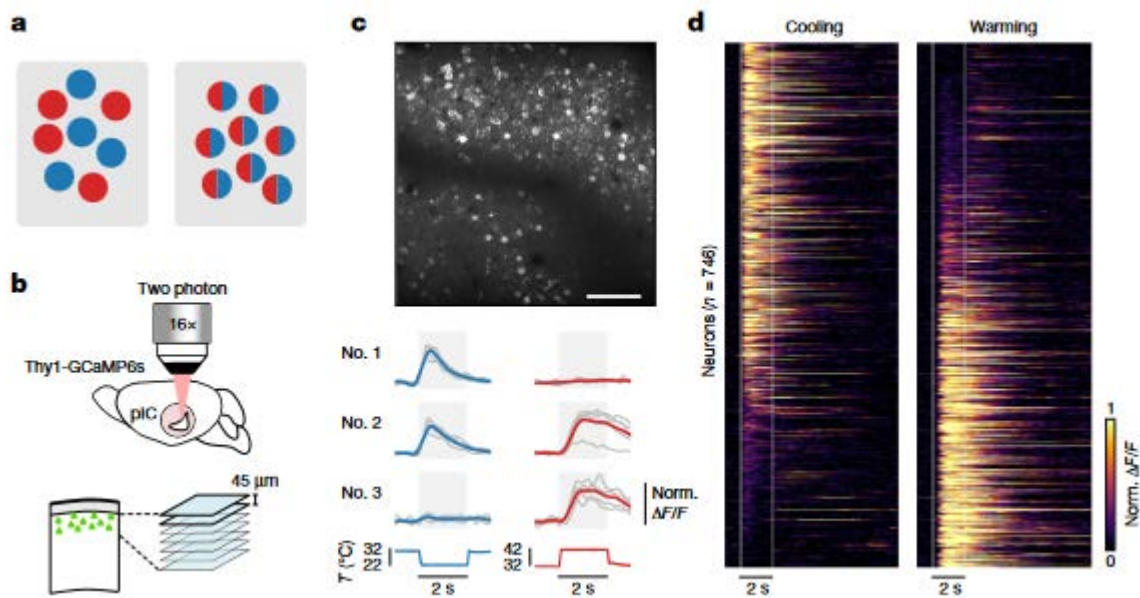


Figure 21 : Intégration différentielle des informations thermiques dans le cortex insulaire

(Vestergaard *et al.*, 2023)

(a) Représentation schématique des neurones corticaux de l'insula à modalité spécifique (à gauche) et polymodaux (à droite). (b) Représentation schématique du dispositif d'imagerie calcique à deux photons. (c) Exemple de représentation de l'imagerie calcique à deux photons dans l'insula (au-dessus), barre d'échelle 100µm ; exemple de tracé de l'activité de neurones suite à un refroidissement (en bleu) ou réchauffement (en rouge) de 10°C. (d) Réponse unitaire de neurones du cortex insulaire en réponse à un refroidissement (à gauche) et à un réchauffement (à droite). Chaque ligne correspond à un neurone.

c) *Le cortex somatosensoriel*

Si l'importance du cortex somatosensoriel dans le traitement des informations thermiques a été longuement débattu, un certain nombre de neurones thermosensibles ont été identifiés et étudiés : ils présentent une réponse avec une courte latence au refroidissement de la langue, du scrotum ou de la patte arrière, et sont inhibés par une stimulation chaude. **Ces neurones multimodaux répondent à la fois au froid et aux stimulations tactiles.** Ils semblent essentiels à l'intégration du froid non nociceptif médié par les récepteurs périphériques TRPM8 car leur inhibition pharmacologique induit une déficience de sensibilité thermique (Hellon *et al.*, 1973; Milenkovic *et al.*, 2014).

Dans un deuxième temps, chez l'homme, l'application de stimulations froides chaudes sur la peau provoque des potentiels évoqués localisés dans le cortex SI controlatéral selon **une représentation corticale des champs périphériques similaire à celle du toucher** (Chatt & Kenshalo, 1977). Une hypothèse propose un lien entre la sensation tactile et la sensation thermique, particulièrement au froid. Ces sensations seraient intégrées dans le cortex somatosensoriel dans un but d'identification des objets, tandis que les informations thermiques de manière générale seraient plutôt prises en charge par la partie dorsale du cortex insulaire (Vestergaard *et al.*, 2023).

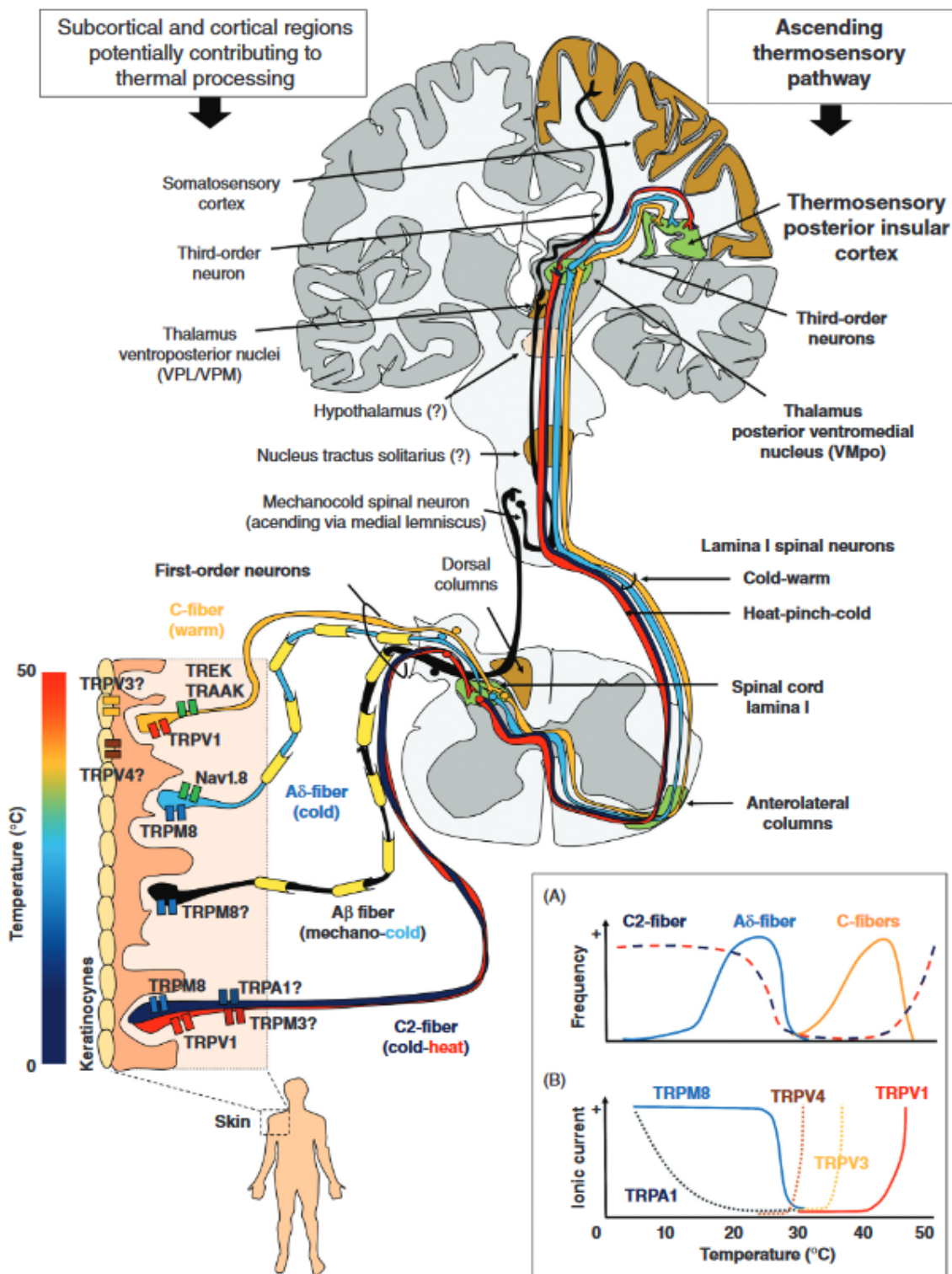


Figure 22 : Schéma de la détection et de l'intégration des sensations thermiques chez l'Homme (Filingeri, 2016)

La surface cutanée est innervée par les fibres sensorielles afférentes primaires Aβ, Aδ et C. Le chaud non nociceptif est transduit par les récepteurs TRPV3 et TRPV4 dans les cellules épidermiques qui libère de l'ATP et de l'oxyde nitrique, tandis que le chaud nociceptif active TRPV1 exprimé par les fibres C dont l'activité est possiblement médiée par les canaux potassique TREK-1 et TRAAK qui influent sur le potentiel de membrane. Le froid de manière générale est détecté par les récepteurs TRPM8 et TRPA1 exprimé par les fibres Aδ et potentiellement Aβ, et le froid nociceptif est également médié par les canaux sodiques voltage-dépendant Nav1.8.

Les FAP thermosensibles font ensuite synapse dans la CDME au niveau i) des neurones de second ordre de la couche I (neurones thermiques spécifiques et HPC), ii) des neurones WDR des couches profondes. Les neurones spinaux de projection remontent dans les voies ascendantes, majoritairement par la voie spinothalamique pour arriver dans le noyau thalamique de PoVM pour intégration sensori-discriminative et affective ainsi dans les noyaux du PMV et PVL qui participent à cette intégration. D'autres régions sous-corticales (noyau du tractus solitaire, hypothalamus) et corticales (somatosensoriel) reçoivent également des informations thermiques et contribuent à la modulation du traitement de sensations thermiques.

Note : les fibres Aδ exprimant TRPV1 et TRPV2 ne sont pas figurées sur le schéma.

D. Objectifs de la thèse

D'un point de vue évolutif, la capacité d'un organisme à détecter et s'adapter à des changements de température est cruciale pour sa survie et son évolution. Depuis l'identification du récepteur TRPV1, récepteur principal de la détection du chaud nociceptif, qui a ensuite donné lieu à la caractérisation de la famille des récepteurs thermiques TRP, notre compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent la détection des changements de température, nociceptives ou non, a grandement évolué au cours des vingt dernières années. *A contrario*, beaucoup reste à découvrir concernant les processus impliqués dans la détection et à la mise en forme de la réponse neurophysiologique et comportementale au froid. La situation est encore plus floue en conditions pathologiques. Dans nombres de pathologies, le système nociceptif est fortement modifié dans son fonctionnement ce qui donne naissance à des anomalies sensorielles (hyperalgésies, allodynies, paresthésies ou dysesthésies), émotionnelles, cognitives et comportementales.

Dans ce contexte, **la première partie de ma thèse** a eu pour but de décrypter les mécanismes d'intégration des informations nociceptives chaudes et froides par les réseaux neuronaux de la moelle épinière, et en particulier par les neurones « Wide-Dynamic Range » (WDR), situés dans les couches profondes de la CDME, qui relaient les informations nociceptives et non nociceptives. Ce travail a donné lieu à une publication parue en 2021.

- **Article 1 : Spinal integration of hot and cold nociceptive stimuli by Wide Dynamic Range neurons in anesthetized adult rats**

Le deuxième objectif, dans la continuité de cette première étude, a été d'effectuer cette caractérisation électrophysiologique dans le modèle de séparation néonatal maternelle, pour décrypter les mécanismes spinaux sous-jacents qui seraient responsables de l'hyper-sensibilité mécanique et thermique nociceptive observée chez ces animaux. Cette étude électrophysiologique a été complétée par une analyse de biologie moléculaire pour mesurer l'expression de certains détecteurs périphériques médiant la nociception, ainsi que des cotransporteurs chlorure impliqués dans une désinhibition centrale possiblement entretenue par un état « subinflammatoire » chez les rats avec une histoire de séparation maternelle. Un article qui reprend ces travaux est actuellement prêt à être soumis.

- **Article 2 (*en preparation*) : Toward a central origin of nociceptive hypersensitivity seen in adult rats after neonatal maternal separation**

La troisième partie de ma thèse met en relation le codage de l'information thermique et la réponse comportementale spontanée des rats dans différentes conditions expérimentales. La réponse comportementale à la douleur est complexe, elle met en jeu de nombreuses structures cérébrales (« pain matrix ») qui déterminent l'expression sensori-discriminative (i.e intensité, localisation) émotionnelle et cognitive de celle-ci. A l'aide d'un nouveau test comportemental, qui consiste à obliger les animaux libres de leurs mouvements à faire un choix entre deux environnements aversifs (douleur thermique et lumière vive), nous avons pu mesurer les comportements nociceptifs et d'adaptation tout en identifiant l'influence de l'état émotionnel sur ces comportements. Il a été effectué sur des rats sains, dans un modèle de douleur inflammatoire et dans un modèle de douleur neuropathique. Ce travail est repris dans un article en préparation de soumission.

- **Article 3 (*en preparation*) : Between Scylla and Charybdis: A sensory-affective double avoidance conditioning procedure (SADAC) to assess the multidimensional aspects of pain behaviors in rats**

En résumé, mes travaux de thèse ont porté sur la compréhension fine des mécanismes de codage de l'information thermique par les neurones WDR de la moelle épinière. Cette analyse a été effectuée chez des animaux sains et hypersensibles à la douleur suite à une SMN. L'utilisation d'un test comportemental développé au sien du laboratoire m'a permis de mesurer l'impact émotionnel et cognitif des douleurs au-delà de l'aspect sensori-discriminatif. Cette approche montre que les informations ascendantes codées par les neurones WDR subissent de nombreuses modulations potentielles avant la mise en forme d'un comportement adaptatif. Dans les modèles de douleur, un dysfonctionnement adaptatif sur les composantes émotionnelles et cognitives semble être intéressant pour rendre compte de la chronicisation des douleurs.

II. MATERIEL ET METHODES

Dans cette partie sont décrites les procédures et méthodes utilisées tout au long de ce travail de thèse. Les expérimentations animales ont toutes été effectuées après obtention d'une autorisation nationale (plateforme APAFIS) après examen par un comité d'éthique labélisé (dans notre cas, le CREMEAS : comité régional d'éthique en matière d'expérimentation animale). Les hébergements et expérimentations ont eu lieu dans des locaux agréés, au sein du chronobiotron (UAR 3415, établissement d'élevage et d'hébergement) et de l'unité CNRS UPR 3212 (Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives). Les articles dans lesquels les méthodes ont été utilisées sont annotés tout au long du texte. Plusieurs tests et procédures ont été développés au sein du laboratoire. C'est le cas du test du SADAC qui fait l'objet de l'article 3 de cette thèse.

A. Modèles animaux

Les animaux utilisés pour ces travaux de thèse sont des rats Wistar (article 1) ou Sprague-Dawley (article 2 et 3) adultes (P45-P60). Dans nos conditions expérimentales, les rats sont hébergés dans les cages par groupes de 3 ou 4 individus. Les cages sont enrichies avec du bois à ronger et un tunnel en carton. Ils ont un accès libre à la nourriture et l'eau, et sont soumis à un cycle lumière/obscurité de 12h (allumage à 7h). La pièce de stabulation est maintenue à 22°C, à un pourcentage d'humidité de 45±5%.

1. Stress précoce : La séparation maternelle néonatale

▪ Article 2

Pour la séparation maternelle néonatale (SMN), les nouveau-nés sont retirés de la cage de la mère pendant 3 heures du 2^{ème} au 12^{ème} jour postnatal. Ils sont placés dans une cage isolée avec de la sciure propre et sous une lampe chauffante afin d'éviter toute hypothermie. Tous les petits d'une portée sont séparés en même temps. Lors du sevrage (à 21 ± 1 jours), les rats sont séparés selon leur sexe et hébergés par groupes de 4 dans des cages enrichies avec du bois à ronger et un tunnel. Dans nos expériences, les animaux ayant subi une séparation maternelle sont comparés à des rats de portées contrôles (CTRL), maintenus en contact avec la mère pendant la période post-natale jusqu'au sevrage. Ce modèle a été utilisé initialement pour montrer l'impact de l'environnement sur la mise en place de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien dans la réaction au stress (Plotsky & Meaney, 1993). Il est très largement utilisé pour induire des conséquences hypersensibles nociceptives et psychosociales (Melchior *et al.*, 2021).

2. Induction d'une douleur neuropathique : Construction chronique du nerf sciatique

▪ Article 3

Initialement développé par Mosconi & Kruger à la fin des années 90, ce modèle a été par la suite adapté à la souris au sein de notre laboratoire pour étudier les conséquences antidépressives des états douloureux persistants (Benbouzid *et al.*, 2008).

Le modèle consiste à installer un petit tube de polyéthylène (le « cuff ») sur la branche principale du nerf sciatique afin que celui-ci exerce une pression calibrée, similaire entre les animaux du même groupe (Mosconi & Kruger, 1996). Pour cela, les animaux sont rapidement anesthésiés à l'isoflurane (induction à 4%) et une injection sous-cutanée de lurocaine/bupivacaine (2mg/kg et 2.5mg/kg respectivement) est effectuée à l'endroit où la peau sera incisée. L'anesthésie est réduite à 3% d'isoflurane et, en conditions d'asepsie, l'animal est placé sur une surface de chirurgie maintenue à température physiologique.

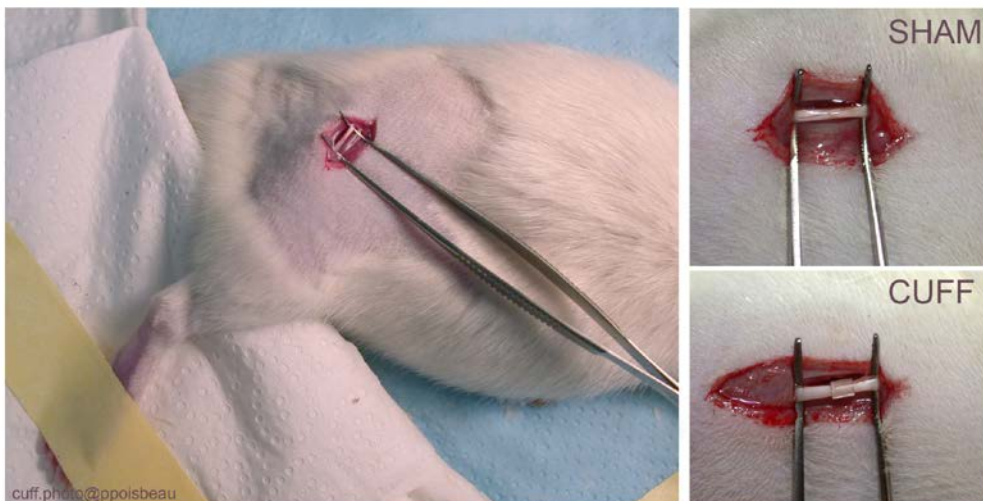


Figure 23 : Modèle neuropathique du « cuff »

Images montrant quelques étapes de la chirurgie d'implantation du manchon de polyéthylène (CUFF) sur le nerf sciatique, en comparaison avec le nerf exposé sans pose du cuff (SHAM).

La patte postérieure droite est rasée et une incision de 1 cm du plan cutané externe est effectuée à l'aide d'un scalpel au niveau de la cuisse (voir image ci-dessous). A l'aide de deux cure-dents humidifiés avec une solution physiologique et préalablement stérilisés (autoclave), le tronc commun du nerf sciatique est dégagé. Le manchon de polyéthylène (longueur 2 mm, diamètre interne 0.86 et externe 1.27mm), incisé dans sa longueur, est posé autour de la branche principale du nerf sciatique. Le diamètre du manchon et l'épaisseur de celui-ci permettent d'obtenir une pression sur le nerf sciatique. La plaie est ensuite suturée. Ces animaux appartiennent au groupe « cuff ». Les animaux du groupe

pseudo-opéré « sham » subissent la même procédure, mais le manchon n'est pas placé autour du nerf (voir image ci-dessous).

A la suite de la chirurgie, les animaux du groupe cuff vont rapidement développer une hypersensibilité durable vis-à-vis des stimulations nociceptives mécaniques et vis-à-vis du froid non nociceptif. Les hypersensibilités observées sont comparables aux symptômes douloureux observés dans d'autres modèles animaux de compression/lésion du nerf sciatique et dans les neuropathies en clinique humaine. Ce modèle permet d'induire une hypersensibilité mécanique et thermique au froid qui persiste pendant au moins 40 jours chez le rat (Aouad *et al.*, 2014).

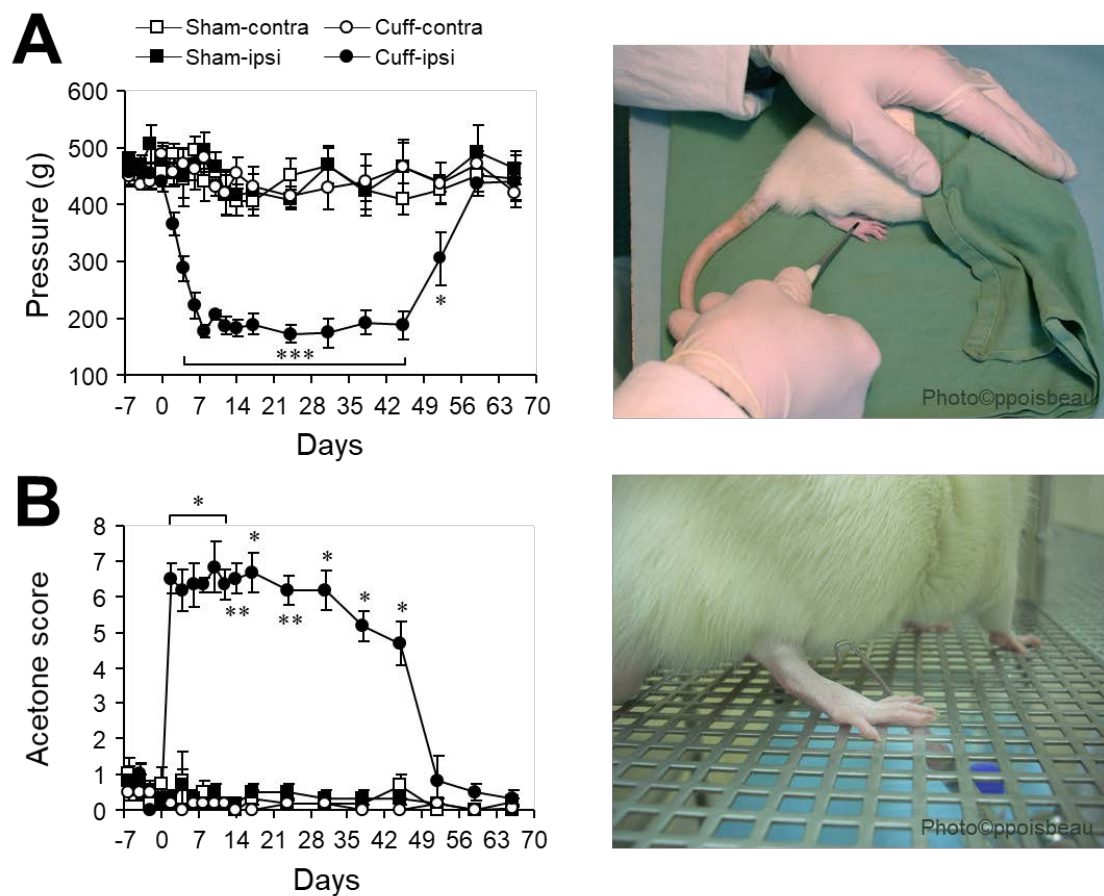


Figure 24 : Hypersensibilités nociceptives des rats « cuff »

Evolution des seuils de sensibilité aux stimulations mécaniques nociceptives (en gramme) et au refroidissement non douloureux par évaporation de l'acétone (score comportemental) chez des rats ayant un nerf sciatique droit (e.g. ipsilateral) avec cuff ou sans cuff (sham). Les images de droite montrent la procédure de mesure. Les mesures présentées ici sont décrites plus bas dans la section méthodologique (Aouad *et al.*, 2014).

3. Induction d'une douleur inflammatoire : injection intraplantaire de CFA

▪ Article 3

Le modèle d'inflammation douloureuse par injection intraplantaire d'adjuvant complet de Freund (CFA) a été utilisé pour la première fois par Iadarola et collaborateurs en 1988 (Iadarola *et al.*, 1988). Jusqu'à cette date l'injection de CFA était effectuée de manière systémique (modèle de polyarthrite) ou dans l'articulation du genou (modèle de monoarthrite).

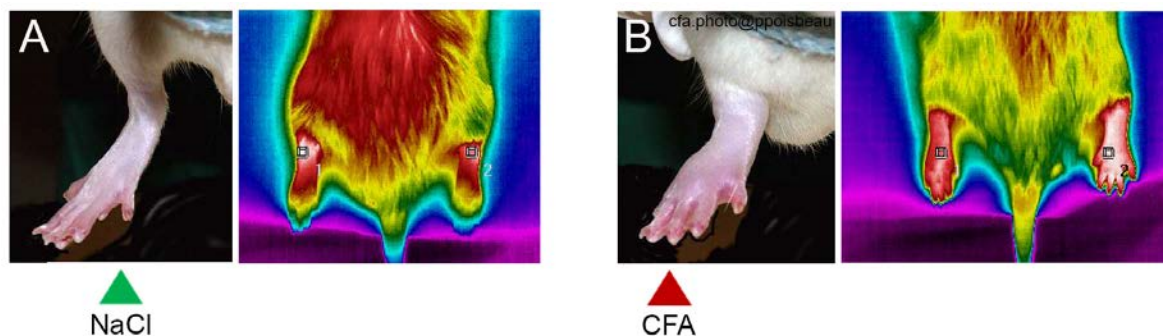


Figure 25 : Modèle inflammatoire au CFA

Sur ces photographies prises 2 heures après les injections intraplantaires de solution saline (A) ou de CFA (B) dans la patte droite des rats, l'inflammation est rapidement visible par l'œdème de la patte injectée. Les images de droite sur chaque panneau ont été prises par une caméra thermographique. Elles montrent la température de surface des animaux (en fausses couleurs) : bleu, plus froid que la température physiologique ; jaune-rouge température physiologique de surface, blanc : hyperthermie. *Données non publiées P. Poisbeau.*

Sur un animal anesthésié à l'isoflurane 3%, un volume de 100 μ L de CFA (Sigma-Merck, Allemagne) est injecté dans la patte arrière droite. Cette injection se traduit très rapidement par une inflammation qui persiste quelques jours (voir figure ci-dessous). Ceci s'accompagne par un œdème de la patte bien visible et une hypersensibilité nociceptive vis-à-vis des stimulations mécaniques et thermiques au chaud qui persistent au-delà d'une semaine.

B. Evaluation comportementale

1. Mesure de la sensibilité nociceptive somatique

▪ Article 2

a) Pince Calibrée

Mesure de l'hypersensibilité mécanique : Elle est effectuée à l'aide d'une pince calibrée associée à une jauge de contrainte qui mesure les pressions à la pointe. Avec cette pince, une pression croissante est exercée sur la patte postérieure du rat alors qu'il est maintenu légèrement en place sur un plan de travail, les yeux couverts par un tissu. Lorsque la pression devient désagréable, l'animal retire sa patte et la valeur de pression correspondante est notée. Cette mesure du seuil nociceptif mécanique est

effectuée trois fois de suite et la valeur moyennée est utilisée pour les analyses. Les animaux sont habitués à la manipulation et au test de pince au moins trois jours avant de démarrer les expérimentations.



Figure 26 : Test de la pince calibrée

Images de la pince calibrée, du boîtier de mesure et de la procédure permettant la mesure du retrait de la patte du rat en appliquant une pression croissante (Luis-Delgado *et al.*, 2006).

b) Plaque Froide/Chaude

Mesure de l'hypersensibilité thermique : L'utilisation d'une plaque chaude pour évaluer la nociception thermique date de 1944 (Woolfe & Macdonald, 1944). Cette approche a également été étendue au froid pour mesurer les hypersensibilités liées à la présence d'une douleur neuropathique (Bennett & Xie, 1988).

Pour cette évaluation, une plaque métallique est chauffée à 52°C (chaud nociceptif) ou 0°C (froid nociceptif). L'animal est placé sur la plaque et un chronomètre est déclenché jusqu'à observation du premier comportement nociceptif (généralement retrait d'une patte arrière ou comportement de léchage). La latence de ce premier comportement est considérée comme le seuil nociceptif thermique. Un temps limite (Cut off) est fixé à 30 secondes et si l'animal ne réagit pas, il est retiré du dispositif afin d'éviter tout dommage tissulaire. Dans ce cas, le temps limite de 30 secondes est reporté pour l'analyse.

Il existe plusieurs variantes de ce test dans la littérature. Parmi ces outils intéressants, les rampes de températures, dans le froid ou le chaud dynamiques ont permis de mesurer les comportements hyperalgésiques et allodymiques, en plus de seuils de nociception (Yalcin *et al.*, 2009).

c) *Test de Hargreaves (plantar™)*

Mesure de l'hypersensibilité thermique par la méthode de Hargreaves: Ce test a été initialement caractérisé par Hargreaves à la fin des années 1980 (Hargreaves *et al.*, 1988). Les animaux sont placés dans une boîte de Plexiglas sur une surface qui conduit la chaleur. Après une habituation au dispositif de 15 minutes, une source de chaleur radiante est placée sous les pattes des animaux. La latence requise pour que l'animal retire sa patte est considérée comme le seuil nociceptif. La mesure est effectuée trois fois par pattes de manière alternée et les mesures sont moyennées. Le cut-off est fixé à 30s.

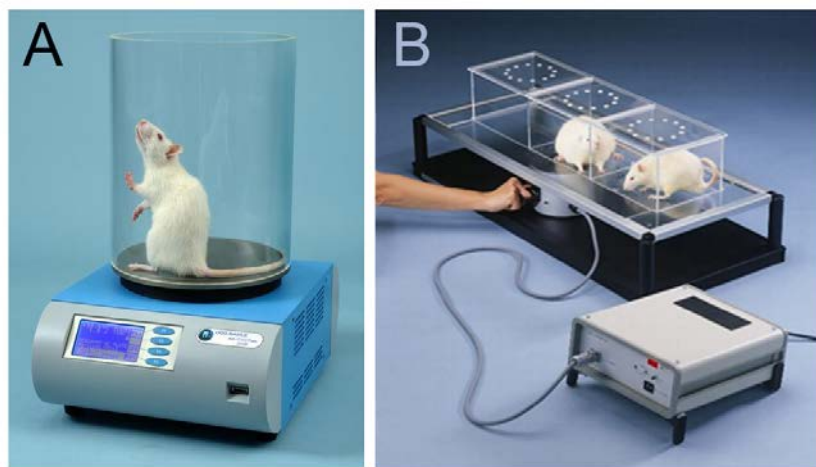


Figure 27 : Tests nociceptifs au chaud

Image représentant le dispositif de plaque chaude/froide (A) et celui du Plantar™ (B). Dans les deux tests, les animaux sont placés dans une arène de plexiglass et soumis à une stimulation thermique jusqu'à observation d'un comportement nociceptif. Pour la plaque, il consiste à chauffer ou refroidir la plaque sur laquelle repose l'animal. Pour le Plantar™, la stimulation est effectuée par une source de lumière radiante qui atteint la surface plantaire de la patte à travers un plancher en matériaux transparent conducteur. Le seuil nociceptif correspond dans ces tests à la latence nécessaire pour observer un retrait de la patte ou un comportement nociceptif (léchage, flinching, saut...).

d) *Test à l'acétone*

Mesure de l'allodynie au froid : Le test d'évaporation de l'acétone consiste en l'application d'une goutte d'acétone sur la face dorsale d'une patte arrière de l'animal. L'acétone s'évapore et refroidit la patte. Les températures cutanées atteintes ne sont jamais nociceptives ce qui a permis dans l'article original présentant cette méthode, de révéler la présence d'une allodynie au froid dans un modèle de neuropathie où les branches L5-L6 du nerf sciatique sont ligaturées (Yoon *et al.*, 1994).

La mesure de la nociception repose sur un score comportemental. Après une période d'habituation de 20 minutes, les animaux sont observés pendant 60 secondes après application de l'acétone et leur comportement est scoré suivant une échelle de 0 à 5 selon les observations suivantes : 0 = pas de

réaction, 1 = retrait bref ou reniflement, 2 = saut, ou secouage de la patte stimulée, 3 = multiples retraits ou secouages, 4 = retrait vif, léchage, secouage ou saut prolongés, 5 = protection de la patte (comportement de « guarding »). Les deux pattes sont testées et chaque *stimulus* est appliqué trois fois sur chaque patte, avec un intervalle minimal de 5 minutes. Les scores sont additionnés et moyennés (score maximum de 15 par patte).

2. Test de conditionnement de double-aversion

▪ Article 3

Ce test consiste à mettre l'animal face à deux situations aversives, une lumière intense et l'exposition à une température chaude nociceptive. Il se réalise dans une enceinte de plexiglas similaire à celle d'une boîte claire/obscur. Dans le modèle d'appareil utilisé, les enceintes cylindriques en plexiglas (hauteur : 25,5 cm, diamètre : 20 cm) sont reliées entre-elles par un petit passage libre d'accès. Un compartiment est éclairé d'une lumière forte et aversive (120 lux), et l'autre, entouré d'un film plastique rouge qui reproduit un environnement obscur. Les rats utilisés dans nos études ne voient pas le rouge ce qui constitue pour l'animal un compartiment « noir ». L'avantage pour l'expérimentateur est qu'il peut observer, filmer et scorer le comportement des animaux. Les deux compartiments sont placés sur une double plaque, utilisée habituellement pour faire de la préférence de place thermique (Ugo-Basile, Italie).

La procédure de 10 minutes comprend une première période de 5 minutes d'habituation où la température des deux sols est fixée à 25°C (proche de la température ambiante). Au bout de ces 5 minutes, une rampe thermique commence dans le compartiment noir entre la température initiale de 25°C et celle de 52°C (vitesse de rampe : 7°C/min). En chauffant le compartiment noir dans la gamme nociceptive, l'animal doit donc résoudre un conflit entre l'aversion envers le compartiment lumineux et la motivation d'échapper à une stimulation menaçant son intégrité.



Figure 28 : Image du « Sensory Affective Double Avoidance Conditioning » test et de la procédure

Le comportement des animaux est filmé et scoré manuellement, en notant les températures d'apparition des premiers comportements nociceptifs, celles d'échappement au compartiment chauffé (compartiment sombre), et le temps passé dans chaque compartiment durant toute la durée du test. La température nociceptive de 42°C est atteinte à la 7^{ème} minute. Après une heure, le test est réitéré avec les mêmes animaux afin d'évaluer l'effet de conditionnement.

Pour le test au froid, le paradigme a dû être modifié car l'appareil ne pouvait pas atteindre les températures froides aussi rapidement que les températures chaudes. Le refroidissement du compartiment sombre démarre à partir de la 5^{ème} minute (comme pour le chaud) jusqu'à la 18^{ème} minute, lorsque le sol atteint 0°C (soit une vitesse de refroidissement de 3°C/min). Le seuil nociceptif au froid, considéré à 15°C, il est atteint aux alentours de la 13^{ème} minute.

Le temps limite de résidence dans le compartiment chauffé (ou refroidi) à une température nociceptive a été préalablement fixé à 30 secondes. Il faut noter ici que les animaux testés dans ce travail ne sont jamais restés jusqu'à cette limite.

C. Traitements pharmacologiques pour le test du SADAC

▪ Article 3

1. Injections

Sous cutanées : Les injections sous-cutanées sont réalisées avec une aiguille 26G. Les animaux sont placés dans un linge afin de limiter tout stress. La peau de l'animal est soulevée au niveau du flanc afin de réaliser un pli, et l'aiguille est insérée de façon parallèle au corps de l'animal pour procéder à l'injection.

Intrapéritonéale : les injections intrapéritonéales sont réalisées avec une aiguille de 25G. Celle-ci est insérée dans le cadran inférieur droit ou gauche de l'abdomen avec un angle de 45°C.

2. Molécules injectées

Le diazepam (DZP ; TVM , CENTRAVET, Nancy) a été dilué dans une solution saline (NaCl 0.9 %) pour atteindre une dose de 1mg/kg. Cette dose a été injectée de manière sous-cutanée (s.c.) à un volume final de 20µL avec une seringue Hamilton, 20 minutes avant le test.

L'Etifoxine (ETX ; 2-ethylamino-6-chloro-4-methyl-4-phenyl-4H-3,1-benzoxazine hydrochloride) a été fournie par les laboratoires Biocodex (Biocodex, Gentilly, France, batch n°562). L'EFX a été préparée dans une solution saline (NaCl 0.9 %) contenant 1 % de Tween 80 (v/v ; Merck, France) après dissolution dans 1.5 % d'éthanol. La solution d'EFX a été injectée par la voie intrapéritonéale (i.p. ; volume 0.5 mL/100 g) à une dose de 50 mg/kg, une fois par jour et pendant deux jours avant le test. La troisième et dernière injection a été réalisée 20 minutes avant la procédure de SADAC. Les animaux contrôles ont reçu un volume équivalent de solution saline.

D. Enregistrements électrophysiologiques

▪ Article 1 et 2

1. Chirurgie

Durant toute la durée de la chirurgie et des enregistrements électrophysiologiques, les rats sont placés sous une anesthésie gazeuse à l'isoflurane (induction à 4%, chirurgie à 3%, enregistrement à 1.5%), sur une couverture chauffante (37°C). La chirurgie démarre lorsque l'animal est aréflexique : absence du réflexe de retrait de la patte et de la queue, absence de réflexes oculaires et immobilité des vibrisses.

Une laminectomie est effectuée au niveau lombaire (L3-L5) permettant d'exposer la surface dorsale de la moelle épinière. De l'agar est coulé autour de la fenêtre d'ouverture afin de protéger les tissus, et de créer une chambre opératoire ouverte au niveau de la moelle exposée. Cette dernière est recouverte d'huile minérale pour prévenir la déshydratation et permettre les enregistrements électrophysiologiques. Les enregistrements sont effectués à l'aide d'une micro-électrode en tungstène de 10µm de diamètre à la pointe et de résistance 10MΩ. L'électrode de référence est placée dans l'agar au contact du liquide céphalo-rachidien.

Les variations de potentiel détectées à proximité du neurone enregistré sont filtrées pour des fréquences supérieures à 3kHz et inférieures à 300Hz. Le signal, débarrassé des fréquences parasites à 50hz est ensuite converti en signal digital à l'aide d'une carte d'acquisition pour être visualisé, analysé et stocké par un ordinateur équipé du logiciel Spike2. Le signal est également visualisé par un

oscillateur et est transformé en son par un filtre audio. La fréquence d'échantillonnage est fixée à 10kHz.

Les neurones d'intérêt sont les neurones WDR situés dans les couches profondes de la CDME (entre 400 et 1000µm de profondeur). Ils sont sélectionnés sur la base de leurs réponses aux stimulations mécaniques nociceptives et non-nociceptives, puis sont testés pour des stimulations thermiques.

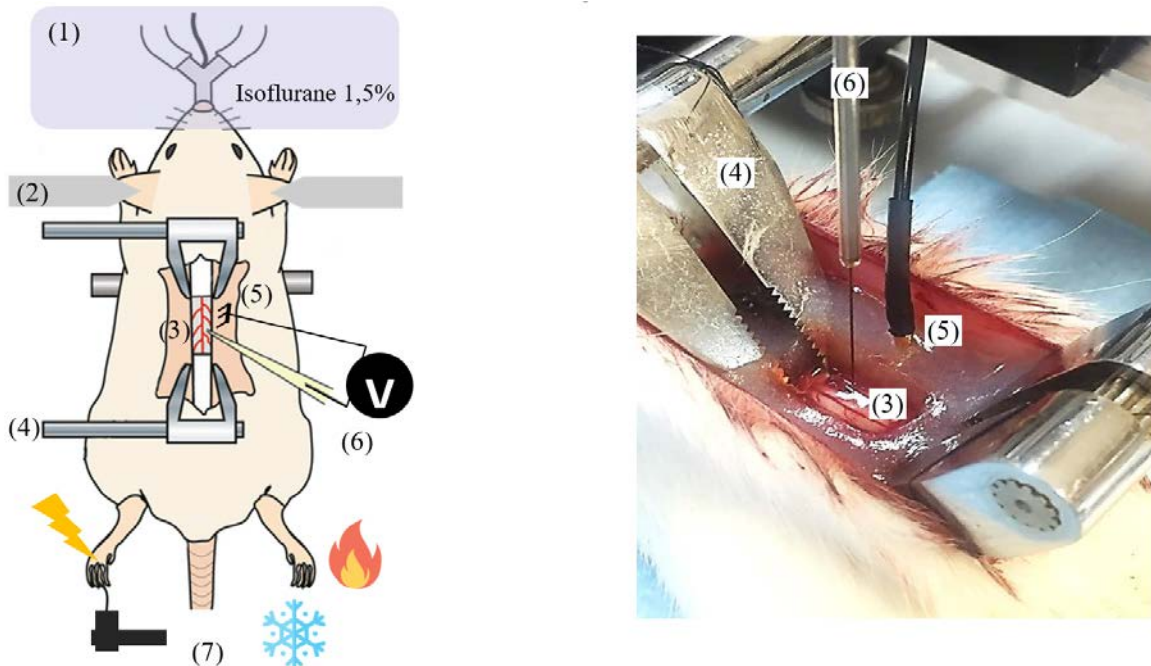


Figure 29 : Dispositif expérimental permettant les enregistrements électrophysiologiques extracellulaires

Représentation schématique (gauche) et photographie (droite) de la préparation expérimentale. L'animal est anesthésié à l'isoflurane (1), maintenu sur le cadre stéréotaxique par des barres d'oreilles (2). La moelle épinière lombaire est exposée (3) et protégée par de l'huile minérale, et la colonne vertébrale maintenue par des pincettes vertébrales (4). L'électrode de référence (5) est placée dans l'agar tandis que l'électrode d'enregistrement (6) est descendue dans la corne dorsale de moelle épinière à l'aide d'un micromanipulateur électrique. Une fois une cellule identifiée, son champ récepteur peut être stimulé (7, stimulations électriques, mécaniques ou thermiques).

2. Protocoles de stimulation

Mécanique : une fois CR identifié sur la patte postérieure de l'animal, différents types de stimulations mécaniques sont effectuées : à l'aide d'un pinceau (brush), d'une pression appliquée par le doigt pendant 3 secondes (press), ou à l'aide d'une pince (pinch, pendant 3s). Les stimulations mécaniques comprennent également l'application de la gamme des filaments de von Frey (fVF ; de 4g à 300g) jusqu'à obtention d'une courbure du filament.

Thermique au chaud et au froid : les stimulations thermiques ont été effectuées à l'aide d'un dispositif (TCSII, QST, Strasbourg) pourvu de 5 mini-thermodes (8mm²) à effet Peltier ultra rapide appliquées sur

le CR de la patte arrière. Une stimulation individuelle sur chaque mini-thermode permet de cibler précisément quelle thermode est au contact du CR. Une fois la/les électrodes d'intérêt identifiées, plusieurs types de protocoles de stimulation sont effectués :

Stimulation unique (SU) : une stimulation de 52°C ou 0°C pendant une durée de 250, 500, 700 et 1000ms (rampe de 300°C/s). Ce protocole permet de mesurer la latence d'apparition du premier PA et la fréquence de décharge (en Hz) pendant et après la stimulation (post-décharge).

Stimulation en rampe lente (RC/RF) : rampe allant de la température neutre (30°C – température de la surface cutanée) à 52°C ou 0°C, à une vitesse respective de 3°C ou 4°C/s pendant 7,5s. Le seuil de température d'activation des neurones sensoriels et le nombre de PA ont été mesurés pendant la durée de la stimulation.

Stimulation répétée (SR) : à partir de la température de 30°C, 30 stimulations ultra-rapides à 52°C ou à 0°C ont été appliquées à une fréquence de 1Hz. La fréquence en PA/s est mesurée pendant les 30 secondes de stimulation.

Courbe de réponse au chaud et au froid : à partir de la température neutre (30°C), une stimulation de 5 secondes à différentes températures (0°C, 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C et 52°C) est appliquée (vitesse de rampe : 300°C/s). La fréquence de décharge pendant ces 5 secondes est mesurée.

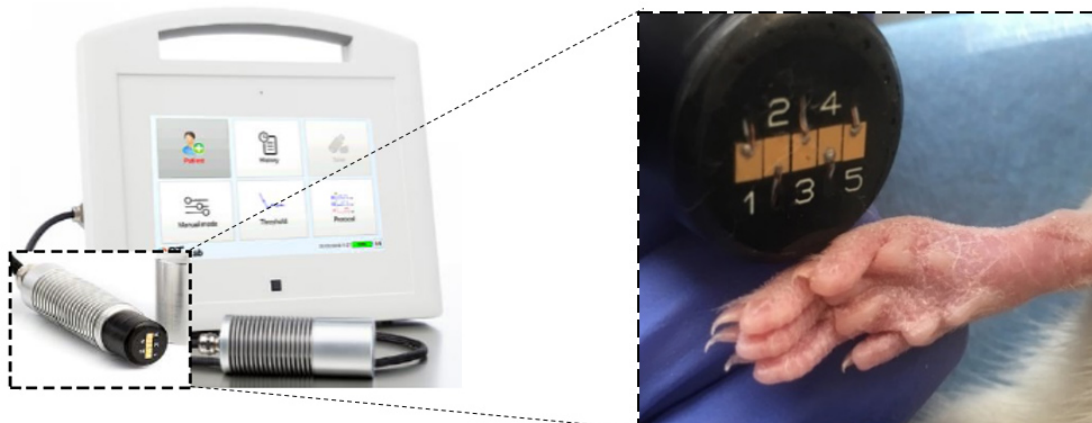


Figure 30 : Thermode de stimulation micropeltier TCSII (a) utilisée dans ce travail et photographie illustrant la taille d'une zone de stimulation (8mm²) par rapport à la taille de la patte arrière d'un rat adulte.

Table 1 : Protocoles de stimulations thermiques et paramètres mesurés

	Chaud	Froid	Paramètres mesurés
Stimulation unique	52°C Vitesse : 300°C/s Durée : 250, 500, 750, 1000ms	0°C Vitesse: 300°C/s Durée : 250, 500, 750, 1000ms	Latence au premier PA Fréquence de décharge
Rampe lente	30°C -> 52°C Vitesse: 3°C/s Duration: 7.5s	30°C -> 0°C Vitesse: 3°C/s Duration: 7.5s	Seuil d'activation Fréquence de décharge
Stimulations répétées	30 x Stimulations uniques Fréquence: 1Hz	30 x Stimulation unique Fréquence: 1Hz	Fréquence de décharge
Courbe de réponse au chaud et au froid	Températures: 30, 35, 40, 45, 52°C Durée: 5s	Températures: 20, 15, 10, 5, 0°C Durée: 5s	Fréquence de décharge

3. Analyse électrophysiologique

Les enregistrements et l'analyse de la réponse électrophysiologique des neurones ont été effectués avec le logiciel Spike 2. Ce logiciel permet la détection et la différenciation des différents potentiels d'action détectés par l'électrode d'enregistrement selon leur forme et leur amplitude. Il permet donc de faire la distinction entre l'activité de plusieurs neurones si le signal reçu est multi-unitaire.

Pour arriver à cette analyse, le signal brut est filtré pour identifier l'activité de chaque neurone individuel et est analysé (latence d'apparition du premier potentiel d'action après stimulation, nombre de potentiels d'action émis durant la stimulation etc.)

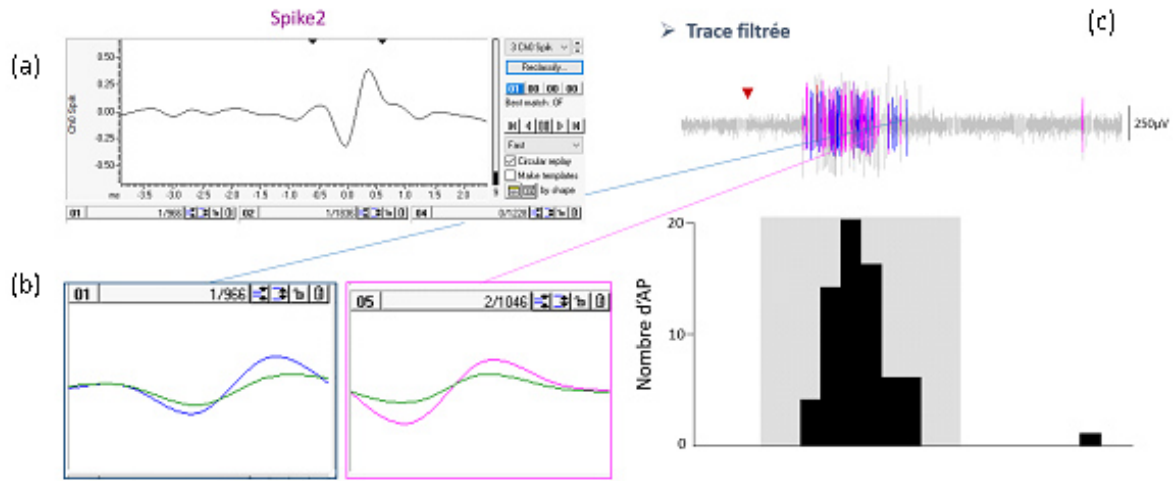


Figure 31 : Exemple de trace électrophysologique filtrée par Spike 2

Le logiciel permet de détecter et de différencier les différents potentiels d'action (a,b). (c) Les traces brutes (grisées) et filtrées (colorées) sont représentées avec l'histogramme représentant le nombre de potentiels d'action détectés après la stimulation (ici, stimulation chaude à 52°C pendant 1s)

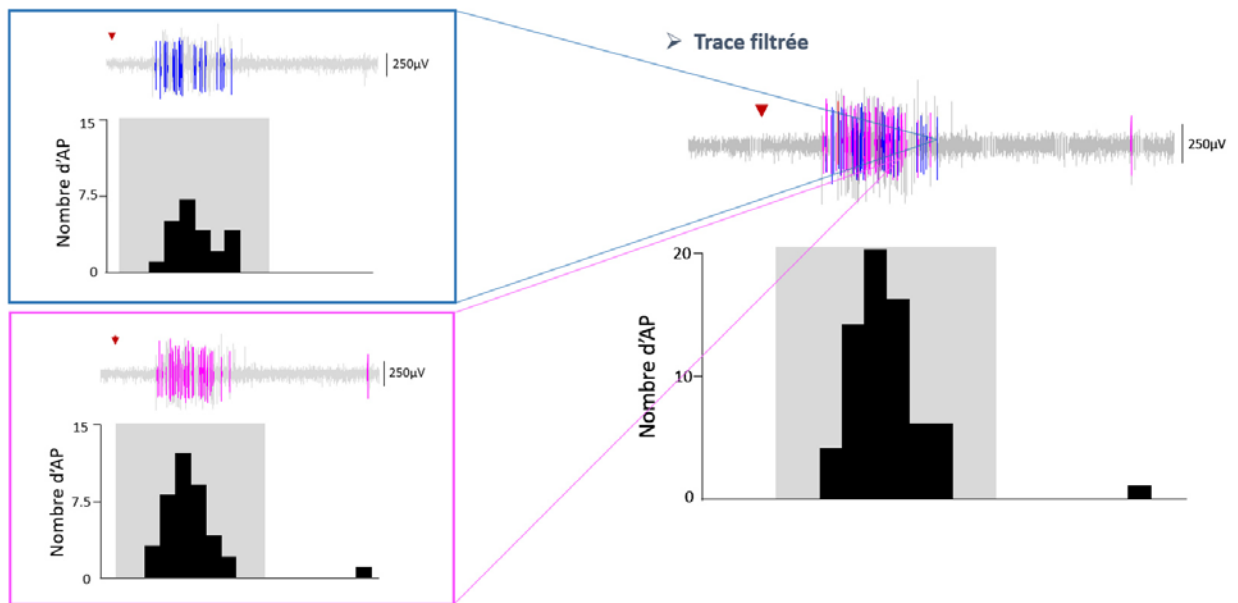


Figure 32 : Analyse individuelle des deux neurones détectés

Les traces filtrées sont individuellement analysables afin d'évaluer la réponse de chaque neurone unitairement.

E. Mesure de l'expression des gènes par RT-qPCR

▪ Article 2

Les GRD des segments lombaires et la moelle épinière lombaire ont été récupérés dans une préparation guanidine thiocyanate/ β -mercaptoethanol avec du ultraturax et conservés -80°C . Les ARNs sont ensuite extraits en suivant le protocole de Chomczynski and Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987) qui consiste en deux extractions totales et indépendantes des ARN, séparées par un traitement à la DNase I. Pour l'analyse, 800ng RNA ont été « reverse-transcrit » avec le kit de iScript. La PCR quantitative a été effectuée en utilisant SYBR Green Supermix. Les amplifications ont été faites sur 42 cycles (20s à 95°C , 20s à 60°C à 20s at 72°C).

La standardisation a été faite en utilisant des courbes standards faites d'une série de dilution d'échantillon. Les données d'amplification sont illustrées sous la forme d'une expression relative du gène, un ratio entre la concentration d'ADNc du gène d'intérêt et de celle du gène de ménage. Le gène de ménage sélectionné est le gène ubiquitaire de la Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase (HPRT) étant donné que ses transcrits sont extrêmement stables dans les différents échantillons.

Les amorces pour tous les gènes d'intérêt ont été désignés en utilisant les programmes Oligo6.0 et M-fold. Les échantillons ont été dispensés avec précision en utilisant une paillasse robotisée (Freedom EVO100; Tecan, Lyon, France) et l'efficacité de l'amplification donnée selon des courbes standard était toujours proche de 100% ($\pm 2\%$), tandis que la spécificité de l'amplification a été évaluée par une courbe de fusion.

Table 2 : Amorces des gènes d'intérêt

Nom de gène	Amorce (à l'endroit et à l'envers)	Référence NCBI	Région	Taille de l'amplicon (bp)
PIEZO2	CGGCAATTCTTCTATGACCT ATGATGATGAAGTCCACGGTG	XM032885462	6739-6836	98
TRPA1	TTGCAAAGAAGTGGTCCAAA GGCAACACGAAGATCATACTG	NM207608	2364-2471	108
TRPM8	AGTTTGTCCGCCTTTCCTG CTAGGGTGCTGAAGTGGGTG	NM134371	1453-1551	98
TRPV1	GGGCATCTATGCTGTCATGAT AATCCAAACAAGAACACGAGG	NM031982	1766-1852	87
NKCC1	GGGCCTCCTCACACGAAGAA TGAGGAGCCGAGGGTACTTCA	NM019229	2047-2138	91
KCC2	ACTACAGCTGGCCACCTCGC ATGCTGCCCTCAGAGAAACGC	NM134363	2507-2593	86
HPRT	TGGTGAAAAGGACCTCTCGAA TCAAGGGCATATCCAACAACA	NM012583	557-647	91

F. Analyses statistiques

Les analyses et graphiques ont été effectués avec le logiciel GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc, Californie, Etats-Unis). Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM). Un test de normalité de Shapiro-Wilk ou d'Agnostino-Pearson a été effectué avant les tests. En cas de normalité, des tests paramétriques ont été utilisés (test t de Student non apparié, ANOVA à deux facteurs, test de Kolmogorov-Smirnov). En l'absence de distribution normale des données, des tests non paramétriques ont été utilisés (test de Mann-Whitney ou de Wilcoxon). Le seuil de significativité a été fixé à 5%.

III. RESULTATS

A. Article 1 : L'intégration spinale de stimulations nociceptives chaude des froides par les neurones à large bande passantes chez le rat anesthésié

Introduction : La détection des informations thermiques chaudes et froides est cruciale pour l'adaptation d'un organisme à son environnement. En périphérie, les messages nerveux correspondant à la détection moléculaire du chaud et du froid nociceptif, sont majoritairement détectés par les canaux de la famille des TRP (pour « transient receptor potential ») exprimés par les neurones sensoriels. Ces informations sont transmises, *via* des synapses sensorispinales, aux neurones de la corne dorsale de la moelle épinière qui forment un réseau encore mal connu. Après intégration et modulation, les informations convergent vers les neurones à projection supraspinale qui se chargeront de faire remonter l'information vers les structures encéphaliques de la matrice douloureuse. Le but de cette étude a été de caractériser de manière fine le rôle des neurones WDR des couches profondes de la CDME dans l'intégration d'informations thermiques chaudes et froides.

Résultats principaux : Chez le rat adulte, j'ai effectué une caractérisation électrophysiologique des propriétés d'intégration des neurones WDR des couches profondes la moelle épinière qui reçoivent des informations tactiles, proprioceptives et nociceptives mécaniques. La majorité des neurones, identifiés selon leur sensibilité mécanique, ont répondu au chaud, et la moitié de ces neurones ont également répondu au froid. De manière intéressante, ces neurones semblent être nociceptifs spécifiques pour le chaud, c'est-à-dire qu'ils ne sont activés que pour des températures supérieures à 42°C tandis que leur activation au froid, lorsqu'elle existe, s'étend sur une gamme plus diffuse.

Les neurones WDR présentent également une intégration différente des informations nociceptives chaudes et froides : leur réponse au froid est plus rapide et adaptative (i.e atteint un plateau de décharge de potentiel d'action suivi d'une désensibilisation de la réponse), tandis que la réponse au chaud est proportionnelle à l'intensité de la stimulation (i.e augmentation de la fréquence de décharge qui augmente avec la température). Les neurones WDR étant à « large bande passante », cette différence d'intégration pourrait directement refléter les propriétés de codage des fibres afférentes primaires qui convoient les informations aux neurones spinaux. Dans cette hypothèse et compte tenu des délais observés, la réponse au froid serait majoritairement prise en charge par les fibres A δ et les informations chaudes par les fibres C.

Contribution de l'auteur : j'ai effectué toutes les expériences décrites, à l'exception de la modélisation de la température au niveau de la surface cutanée et des nocicepteurs.



Spinal integration of hot and cold nociceptive stimuli by wide-dynamic-range neurons in anesthetized adult rats

Clémence Gieré^a, Meggane Melchior^a, André Dufour^b, Pierrick Poisbeau^{a,*}

Abstract

Introduction: Early neuronal processing of thermal noxious information relies mostly on molecular detectors of the transient receptor potential family expressed by specific subpopulation of sensory neurons. This information may converge to second-order wide-dynamic-range (WDR) neurons located in the deep layer of the dorsal horn of the spinal cord.

Method: Using a micro-Peltier thermode thermal contact stimulator II delivering various cold and hot noxious stimulations, we have characterized the extracellular electrophysiological responses of mechanosensitive WDR neurons in anesthetized adult male and female Wistar rats.

Results: Most of the WDR neurons were activated after hot and cold noxious stimulations, at mean temperature thresholds corresponding to 43 and 20°C, respectively. If the production of action potential was not different in frequency between the 2 thermal modalities, the latency to observe the first action potential was significantly different (cold: 212 ms; hot: 490 ms, unpaired Student *t*-test: $t = 8.041$; $df = 32$; $P < 0.0001$), suggesting that different fiber types and circuits were involved. The temporal summation was also different because no facilitation was seen for cold noxious stimulations contrary to hot noxious ones.

Conclusion: Altogether, this study helps better understand how short-lasting and long-lasting hot or cold noxious stimuli are integrated by mechanosensitive WDR neurons. In our experimental conditions, we found WDR neurons to be nociceptive specific for C-fiber-mediated hot stimuli. We also found that cold nonnoxious and noxious information, triggered at glabrous skin areas, are likely taken in charge by A-type sensory neurons. This study will be helpful to establish working hypothesis explaining the thermal pain symptoms displayed by animal models and patients in a translational extent.

Keywords: Nociception, In vivo electrophysiology, Thermosensitivity, Pain, Cutaneous nociceptors

1. Introduction

In the nervous system, interoceptive and exteroceptive nociceptive stimuli are detected and coded by sensory neurons

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

^a Centre National de la Recherche Scientifique, University of Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Strasbourg, France, ^b Centre National de la Recherche Scientifique, University of Strasbourg, Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, Strasbourg, France

*Corresponding author. Address: Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI—CNRS UPR 3212), 8 Allée du général Rouvillois, 67000 Strasbourg, France. Tel.: 03 88 45 67 27. E-mail address: poisbeau@unistra.fr (P. Poisbeau).

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.painrpts.com).

Copyright © 2021 The Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. on behalf of The International Association for the Study of Pain. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License 4.0 (CCBY), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

PR9 6 (2021) e983

<http://dx.doi.org/10.1097/PR9.0000000000000983>

innervating tissues and organs. These stimuli are of various nature and intensity, such as mechanical deformation, heat, cold, or irritation caused by chemicals. Regarding thermal modalities, the molecular detection is mostly performed by the transient receptor potential (TRP) ion channel superfamily.⁵ If the gating mechanism is still unclear, it seems that nonselective cationic TRP ion channels are activated thanks to an allosteric coupling between protein modules, respectively, sensitive to temperatures and voltage changes.²⁴ This proposal also explains well the voltage-dependent influences on the TRP channel function and temperature thresholds. The thermal sensitivity of these TRPs in the skin is quite exceptional because they are capable of coding hot or cold temperature changes of less than 1°C.³⁰ Since the discovery of the transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1), which is activated by temperature higher than 42°C and capsaicin, an active ingredient in chili,⁶ several thermosensitive TRPs have been characterized in mammalian sensory neurons. In the 7 families of TRPs, thermosensitive channels are found in the ankyrin subtype (TRPA1), vanilloid set (TRPV1-4), canonical type (TRPC5), and melastatin subtype (TRPM2-5 and TRPM8).⁵

Heat threshold triggering activation of TRPV1, through temperature sensor domains which include the distal half of the

C terminus,³⁸ is found at temperature values around 42°C.⁶ TRPV1 is expressed by half of the dorsal root ganglion sensory neurons and by 75% of small diameter unmyelinated C-type neurons which represent most of the nociceptive-specific neurons.¹³ Transient receptor potential vanilloid type 2 are also activated by noxious hot temperatures exceeding 52°C but are mostly expressed by some A δ -type sensory neurons.² In comparison with TRPV1 and TRPV2, TRPV3 and TRPV4 seem to be involved in the thermal detection of nonnoxious hot temperature because their activation can be seen in the nonnoxious range, starting at 20 and 32°C for TRPV3 and TRPV4, respectively.¹² Although TRPV3 can be involved in the detection of temperature around 40°C, it is unlikely that TRPV3 and TRPV4 play a major role in thermal nociception.²⁰

The nociceptive cold threshold in humans can be reached when temperatures are generally below 15°C.¹⁰ Two subpopulations of sensory neurons seem to be involved. The first subpopulation is made of nociceptors expressing the type 8 melastatin TRP channel (TRPM8). They are activated by temperatures below 25°C or by natural substances inducing a sensation of cold, such as menthol or icilin.²⁷ The second neuronal population is expressing the type 1 ankyrin TRP channel (TRPA1). They also express TRPV1 and are activated at temperatures below 17°C or by chemicals inducing a sensation of burning like with allyl isothiocyanate, the active component of mustard, horseradish, and wasabi.³³ This TRPA1–TRPV1 co-expression could explain the feeling of burning induced by noxious cold stimuli.

Although the mechanisms underlying thermal sensitivity have been greatly studied in primary sensory neurons, the integration of such information in the spinal cord or in supraspinal centers is far less understood. The local microcircuits processing this thermal information in the superficial dorsal horn of the spinal cord are still under investigation.²¹ One of the first study that attempted to establish a characterization of thermal response in the spinal cord proposed a classification of neurons dependent on their activity in response to mechanical, hot, and cold stimuli; class 1 units were responsive to innocuous stimuli but not nociceptive, class 2 units responded to both innocuous and nociceptive stimuli, and class 3 units only to nociceptive stimuli. Only class 1 and class 2 units were heat responsive and were further divided into (1) warming neurons activated by temperature below 42.5°C, (2) warming or noxious units activated by temperature below 42.5°C but with peak activity at higher temperatures, and (3) noxious units activated above 42.5°C. All heat responsive units were also activated by cooling, but a specific characterization of the cold response was not conducted.²⁹ In this study, thermal responsive neurons were located in laminae I, IV, and V. Early c-fos studies also investigated the spinal integration of cold or hot noxious stimulation. They showed that after noxious heat, 57% to 69% of lamina I NK1 receptor-expressing projection neurons expressed c-fos and that the proportion did not differ between the different morphological groups of neurons (pyramidal, fusiform, and multipolar cell). However, noxious cold activated mostly multipolar neurons and only a small portion of fusiform or pyramidal cells.³⁴ A previous study on cats also reported that pyramidal cells responded to innocuous cooling, fusiform and multipolar cells responded to noxious heat, and only multipolar cells responded to noxious cooling.¹⁸ The intensity of c-fos expression in the spinal cord in response to noxious cold was showed to be intensity dependent and was absent or very small for temperatures above –10°C.¹ Dado et al. recorded spinal neurons of the spinothalamic tract and showed that 86% responded to noxious heat and 29% to cooling with a threshold

at 29.1°, with a majority responding to both noxious and innocuous cold.⁷ Concerning wide-dynamic-range (WDR) neurons, their response to noxious heat and cold was previously investigated by Khasabov et al.,²³ who showed that 86% of WDR neurons responded to both noxious heat and cold and 14% only to heat, whereas 61% of high-threshold nociceptive-specific neurons responded to both noxious modalities and 32% and 7% only to heat and cold, respectively. They also showed that the mean cold threshold of WDR neurons was higher than the one of high-threshold neurons (~15 vs –0.6°).

A recent *in vivo* calcium imaging study has been able to provide further insights into the coding and processing of thermal stimuli in the superficial layers.^{31,36} These data show a functional difference in the processing of warming and cooling, as well as at the response to noxious stimuli. Cold responses peaked during the transient phase of the stimuli and then rapidly adapted, whereas hot responses persisted during the whole stimulus. These results seem to indicate that processing of the cold response does not necessarily reflect the temperature of the skin but rather its change of temperature, whereas the coding of heat is absolute with little adaptation from the transducing fibers.

In this study, we have recorded WDR neurons in the deep dorsal horn layers of the spinal cord (400–1000 μ m) to characterize their role in the processing of nociceptive and nonnociceptive thermal information. More precisely, we recorded mechanoresponsive WDR neurons and characterized their integrative properties after thermal stimulation of peripheral receptive field on the hind paw. Based on data from the literature,³⁵ we expected that these neurons would respond to a convergence of both innocuous and noxious information, from mechanical and thermal modalities. So far, characterization of their integrative role for different modalities has been a challenge. Thermal stimulations used were often too slow (water jet, water bath, ice, or conducting metals) to evaluate thermal thresholds (skin inertia bias) and not properly controlling the receptor field local temperature.¹⁵ Here, we used stimulation (300°C/second) with cold or hot noxious temperatures, with various duration (short pulses, ramps, or sustained stimuli) while controlling the surface skin temperature, granting a greater control over the stimulation parameters. Thanks to this novel device, these stimulations were applied on a small receptive field while recording WDR neurons in the dorsal horn of the spinal cord using extracellular recording in isoflurane-anesthetized adult rats. Apart from testing the hypothesis that cold and hot information from a given receptive field converge to WDR neurons, we assessed the thermonociceptive-specific role of WDR neurons and the relative contribution of C-type and A-type fibers in this processing.

2. Material and methods

2.1. Animals

Adult male and female Wistar rats (aged P45–P60) were used for this study. No differences were found between males and females, so data were pooled (see supplementary Fig. 1, available at <http://links.lww.com/PR9/A144>). Rats were housed in littered cages, in a temperature-controlled room (22°C) at a hygrometry of 45 \pm 5%, under a 12-hour light–dark cycle (lights on at 7 AM), with *ad libitum* access to food and water. The experiments were performed after a week of acclimatization in the animal facility. All experiments conducted were approved by the regional ethical committee regarding animal experimentation (APAFIS #201706131614598) and complied to the ARRIVE guidelines.

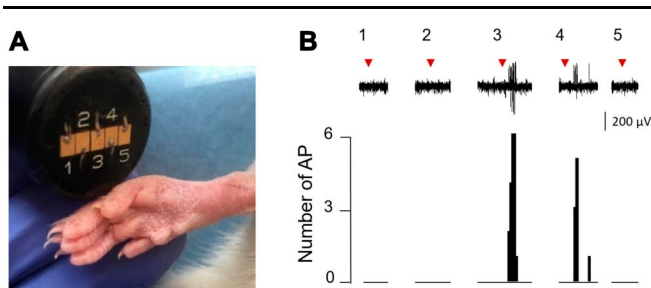


Figure 1. Thermode micro-Peltier TCS II characteristics and its interest while recording spinal wide dynamic range (WDR) neurons in vivo. (A) Image illustrating the size of the stimulation zones (8 mm²) with respect to the adult rat hind paw size. (B) Representative extracellular unit recording of a WDR neuron in response to nociceptive hot (52°C, heating speed 300 °C/s; duration: 1 second) delivered by one of the 5 stimulation zone (numbered 1–5). The corresponding receptor field for this WDR neuron overlaps on the third and fourth stimulated areas. AP, action potential; TCS, thermal contact stimulator.

2.2. In vivo extracellular single-unit electrophysiological recordings

We used an in vivo preparation for the extracellular single-unit recording, as previously described.²² Rats were anesthetized with isoflurane 4% pushed by pressured air at a flow rate of 700 mL/min (Ventoflurane, Vibrac, Carros, France) and placed onto a stereotaxic frame equipped with a nasal mask to maintain anesthesia and with an electrical warming blanket to keep a steady body temperature (Ugo Basile, Rodent Warmer X1, Gemonio, Italy). Isoflurane was adjusted to 3% for the ensuing surgery which started when the rat was areflexic. A laminectomy was performed at the lumbar level (L3–L5). With the cervical and sacral vertebrae firmly held, the meninges were carefully removed, the exposed segment of spinal cord was covered with an isolating mineral oil to prevent dehydration, and the anesthesia was adjusted to 1.5% for the recordings. At the end of the experiment, animals were killed with an overdose of anesthesia (isoflurane 5%).

Single-unit extracellular recordings were made from WDR neurons located in the deep layers of the dorsal horn (400–1000 μm) with a stainless steel microelectrode (FHC, Stainless Steel, UE FK1, Bowdoin) lowered into the medial part of the spinal cord by an electrical micromanipulator (Scientifica, IVM 1000, Uckfield, United Kingdom). Variations of potential were amplified (DAM80, AC Differential Amplifier, WPI, Aston, United Kingdom) and filtered for frequency superior to 3 kHz and inferior to 300 Hz. Parasite frequencies were suppressed using a noise eliminator (HumBug 50/60 Hz Noise Eliminator, WPI, Aston, United Kingdom), and the resulting signal was digitized with an

acquisition frequency of 10 kHz (Power 1401, CED, Cambridge, United Kingdom) and processed by the Spike2 software (CED, Cambridge, England). In the case of multicellular recordings, unitary responses were isolated thanks to the Spike Sorting Analysis Module of Spike2 software.

Neurons were selected on the basis of their response to innocuous (light brush applied on the receptor field and light pressure applied with the finger) and nociceptive (pinching with a pair of forceps) mechanical stimuli and were then tested with thermal stimuli. This not only allowed their identification as convergent second-order neurons but also permitted to precisely define the receptor field on the animal's paw.

After a single thermal stimulation of the peripheral receptive field, WDR neuron frequency of extracellularly recorded action potential (AP) discharges was measured during 2 seconds, corresponding to the duration of the stereotypical bursting discharge of hot-sensitive neurons. To evaluate the activation threshold temperature of stimulated sensory fibers, the latency to observe the first AP was measured in response to a slow-heating or slow-cooling ramp, from the neutral temperature (30°C) to 52 or 0°C, for noxious hot and cold modalities, respectively. The heating ramp speed was of 3°C/second, whereas the cooling ramp speed was of 4°C/second for a maximum stimulation duration of 7.5 seconds. The frequency of discharge for the duration of the stimulation was also measured. When spontaneous activity was already present, the mean baseline frequency before stimulation was removed from the poststimulation data.

2.3. Wind-up protocol

Spinal WDR neurons recorded in the deep layer of the dorsal horn are known to reproduce with fidelity the «wind-up» phenomenon observed when repeated electrical stimulation (1 Hz) are applied on C fibers. A similar protocol was used here for hot and cold nociceptive stimuli (30 single stimuli, 1 Hz) to assess the C fibers response to a sustained thermal stimulation. The frequency of response of the neuron was calculated in Hz for the 30 seconds of stimulation. This protocol was chosen to study the desensitization of thermal responses as well as to potentially observe a facilitation of the response such as the «wind-up» response resulting from repeated electrical stimulation.

2.4. Stimulation thermode

Thermal stimulations were applied using a thermal contact stimulator (TCS II, Thermal Cutaneous Stimulator, QST.Lab, Strasbourg, France), allowing the stimulation of the cutaneous

Table 1
Summary table of the stimulation protocols used in the study.

	Hot	Cold	Measured parameters
Single stimulation	52°C Speed: 300°C/second Duration: 250, 500, 750, and 1000 ms	0°C Speed: 300°C/second Duration: 250, 500, 750, and 1000 ms	Latency to first action potential Frequency of discharge
Slow ramp	30->52°C Speed: 3°C/second Duration: 7.5 seconds	30-> 0°C Speed: 3°C/second Duration: 7.5 seconds	Activation threshold Frequency of discharge
Sustained stimulation	30 × Single stimulation Frequency: 1Hz	30 × Single stimulation Frequency: 1Hz	Frequency of discharge
Hot and cold response curve	Temperatures: 30, 35, 40, 45, and 52°C Duration: 5 seconds	Temperatures: 20, 15, 10, 5, and 0°C Duration: 5 seconds	Frequency of discharge

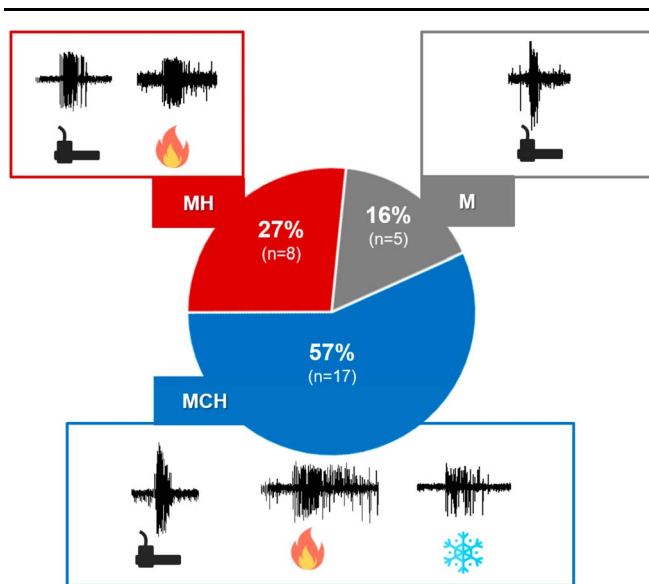


Figure 2. Proportion of wide dynamic range neurons responsive to hot, cold, and mechanical stimuli. M, mechano; MCH, mechano-heat-cold; MH, mechano-heat.

surface (minimum 8 mm²) with temperature ranging from 0 to 60°C. The heating or cooling rate could be adjusted from 0.1 to 300°C/second.¹¹ The device we used provides 5 independent stimulation areas of 8 mm² granting the possibility to perform very precise stimulation to a slower heating or cooling ramp (**Fig. 1**). As soon as the hind paw glabrous skin receptive field was identified for given WDR neurons, we placed the thermode on the site until the end of the recording. The different stimulatory procedures are given in **Table 1**.

2.5. Statistical analysis

Graphs and statistics were generated with GraphPad Prism 6 (GraphPad software Inc, California). Data are expressed in mean \pm SEM. We used parametric tests (unpaired Student *t* test) when data were normally distributed. Normality was verified with the D'Agostino–Pearson omnibus normality test. If not, non-parametric (Mann–Whitney) statistical tests were used. A *P* value < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Identification of thermal sensitive wide-dynamic-range neurons

A total of 37 neurons were recorded. Among them, 5 non-nociceptive neurons and 2 nociceptive-specific neurons were excluded from the analysis. Of the remaining WDR neurons responding to mechanical stimuli ($n = 30$), 83% were also activated by noxious heat (MH: mechano-heat neurons, $n = 25$) and 57% to cold and heat (MHC: mechano-heat-cold neurons $n = 17$) (**Fig. 2**). All neurons that responded to cold stimuli also responded to heat. Notably, very little to no basal activity as well as no response to nonnociceptive thermal stimulation was recorded.

3.2. Single thermal stimulation

In the first part of the work, a single stimulation was applied for a duration of 250, 500, 750, and 1000 ms with an ultrafast heating

at 52°C or cooling at 0°C (ramp of 300°C/second), from the baseline temperature set at 30°C (**Fig. 3**). As shown in the figure, we observed a stimulation duration-dependent increase of AP discharge frequency (hot: analysis of variance [ANOVA], $F_{(3,68)} = 9.87$; $P < 0.0001$; cold: ANOVA, $F_{(3,33)} = 5.95$, $P = 0.0023$). For latencies, a statistical difference was only found in the case of hot stimulation (hot; ANOVA, $F_{(3,57)} = 3.22$; $P = 0.029$; cold: ANOVA, $F_{(3,33)} = 0.3$, $P = 0.83$). Using the parameters given in a previously published article,¹⁴ the model describing temperature changes at the cutaneous surface and at the nociceptor depth (150 μ m) is given in **Figure 3**. It indicates the theoretical duration required to reach noxious temperature for heat (43°C) and cold (18°C) while using a contact thermode and our stimulation protocol (**Fig. 3**). We can see that the theoretical time to reach the hot nociceptive threshold (43°C) at the receptors (ie, at 150 μ m below the skin surface) is 470 ms while the time to reach the equivalent cold delta from baseline temperature (18°C) is 270 ms. This difference in latency is mainly due to the temperature set point imposed on the probe, ie, 52 vs 0°C, ie, a difference of 8°C between the 2 conditions, starting from the base temperature of 30°C.

When comparing the response between hot and cold stimulation for a 1000-ms stimulation, we observed that the latency to the first emitted AP was significantly higher (unpaired Student *t*-test: $t = 8.041$; $df = 32$; $P < 0.0001$) for the hot (490 ± 24 ms; $n = 21$) than the cold stimulation (212 ± 18 ms; $n = 13$; **Fig. 4**). The mean frequency of AP discharge, however, was not different between the 2 modalities (hot = 17.2 ± 2.8 Hz; cold = 12.4 ± 1.4 Hz; unpaired Student *t*-test: $t = 0.1283$; $df = 32$; $P = 0.2087$; **Fig. 4**).

3.3. Slow ramp stimulation

Representative responses of WDR neurons to heat and cold stimulations are shown in **Figure 4A**. As seen in **Figure 4B**, the threshold for hot stimulation was of $43.4 \pm 1.2^\circ\text{C}$ ($n = 14$) and for cold stimulation was of $19.8 \pm 1.8^\circ\text{C}$ ($n = 11$). Similarly to single stimuli, the mean frequency of AP firing did not differ (Student *t*-test: $t = 1.013$; $df = 23$; $P = 0.3214$) between both modalities (hot = 15.3 ± 3.4 Hz; $n = 14$; cold = 11.3 ± 1.2 Hz; $n = 11$; **Fig. 5**).

3.4. Sustained stimulation

We then assessed the electrophysiological properties of thermoresponsive WDR neurons while coding for repeated hot and cold stimulations (30 stimulations at 1 Hz) of various durations (**Fig. 6**). For repeated hot stimulation, we observed a slight increase in AP firing within the first few seconds (refer to the first 3 stimulations in the figure) followed by a progressive decrease in the frequency during the remaining part of the stimulation protocol.

For cold stimuli, no such facilitation could be observed, but the frequency of discharge did show a slight decrease until the end of the protocol.

As illustrated in **Figure 7**, in response to hot stimulations, a short-lasting facilitation of the WDR response can be easily observed during the first 3 stimulations. This could also be seen in the case of continuous stimulation (duration 1000 ms). Action potential discharge frequency increased from 9.5 ± 1.7 Hz (stim 1) to 23.1 ± 5.8 Hz (stim 3). After these first 3 seconds, a progressive decrease was observed which could be fitted with an exponential decay constant (τ) of 8.12 ms. The mean frequency at the end of the 30 stimulation protocols was strongly reduced and of 3.7 ± 1.7 Hz. As mentioned above, no facilitation could be observed for the cold stimulation, even if this stimulation was

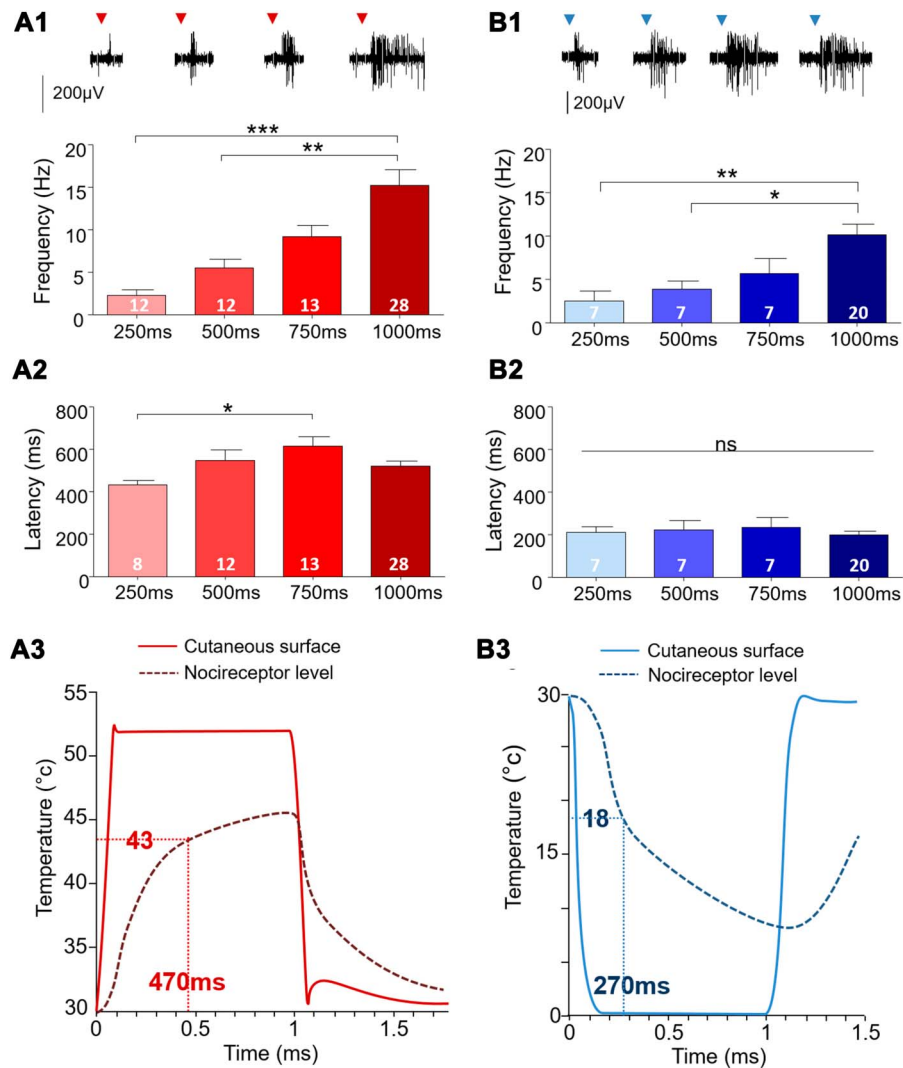


Figure 3. Characterization of wide dynamic range neurons extracellular action potential discharges after a single thermal stimulation (ramp 300°C/second) with various durations. Representative examples of a wide dynamic range neuron response to a hot (A1-2) or a cold (B1-2) paw stimulation with a duration of 250, 500, 750, and 1000 ms. After analysis of variance (refer to text), Tukey post hoc tests were performed for multiple comparison (code: ***, $P < 0.0001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; ns: not significant). (A3-B3) Model predicting the temperature reached at the cutaneous surface and at the nociceptor level (localized around 100 μm below the skin's surface) during a single hot (A3) stimulation of 52°C or a single cold (B3) stimulation of 0°C (ramp 300°C/s) during 1000 ms. The number of recorded cells is given in the graphs.

continuous (1000 ms duration). The frequency was maximal at the beginning of the protocol (17.1 ± 3.3 Hz) but slightly decreased with time. The mean frequency was of 4.2 ± 1.1 Hz at the end of the protocol (Fig. 7).

3.5. Hot and cold response curve

Figure 7 illustrates the responses seen in mechano-heat-cold WDR neurons (MHC, $n = 7$) (Fig. 8). Here, we applied a single stimulation (300°C/second, duration 5000 ms) from 0 to 52°C (increments of 5°C). Interestingly, these MHC neurons had different coding frequency depending on the cold and hot stimuli. The action potential number peaked at 25 for temperatures below 15°C, whereas more than 100 APs could be seen if noxious hot stimulations were applied (>40°C).

4. Discussion

In this work, spinal WDR neurons responding to mechanical stimulations were recorded to further characterize their

processing capacities after sensory spinal transmission of cold and hot noxious information. Most of the WDR neurons (83%) recorded were activated when noxious hot stimuli were applied to the hind paw receptive field. Surprisingly, we found that WDR neurons seem to respond in a nociceptive-specific manner to hot stimuli because they started to fire action potential at a threshold of about 42° (ie, the usual nociceptive threshold for heat). Half of them (53%) also processed cold messages, both noxious and nonnoxious. Using a single stimulus, we found that the latency to observe the first AP after the onset of the stimulation was much faster for cold (about 210 ms) than for hot noxious temperatures (about 490 ms). No differences could be seen in the mean frequency of occurrence of extracellular AP generated by WDR after cold or hot noxious stimulations (range between 10 and 20 Hz). When analyzing the coding properties about iterative stimulations at 1 Hz, only hot noxious processing was associated with an immediate short-lasting wind-up response. This result is in good agreement with the long latencies measured before the appearance of the first AP and the likelihood that these hot noxious messages are carried by unmyelinated C fibers. Our

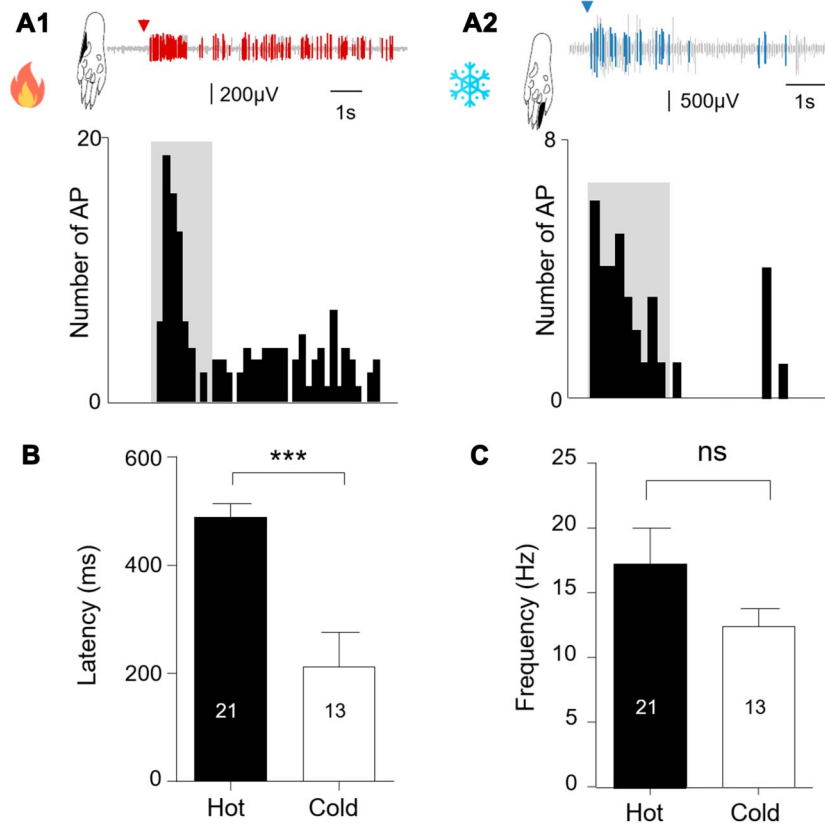


Figure 4. Extracellular recording of wide dynamic range neurons in the dorsal horn of the spinal cord after a single hot (A1) or cold (A2) stimulation (ramp 300°C/second, duration of 1000 ms). Red (A1) and blue (A2) segments within the recording trace correspond to the firing of a single neuron after spike sorting analysis. The black area in the rat hind paw drawing gives the localization of the receptive field stimulated. Histograms give the number of AP detected per bins of 200 ms. Graphs showing the mean latency to observe the first AP after a hot or cold single stimulation (B) and the corresponding mean frequency (C). Statistical code for the Student *t*-test: $P < 0.0001$ (***) ; ns: nonsignificant. The number of recorded cells is given in the graphs. AP, action potential.

results also suggest that cold messages may use other sensory neurons such as those from the A δ -type family. It is also to be noted that our study was made on glabrous skin which could explain differences in the threshold of proportion of thermoresponsive neurons compared with other studies made on hairy skin.³²

Thermal thresholds obtained during the slow ramp protocols and the modelisation of the stimuli are in good agreement with those found in the literature, ie, around 42°C for heat and below 15°C for cold.^{6,10} Therefore, it seems that slow and progressive heating or cooling of the cutaneous surface diminished the influence of the skin's inertia observed during the stimulation. These results highlight the interest of using this heating or cooling thermode in preclinical studies as well as in clinical ones. It is currently in use in several research laboratories for quantitative sensory testing or to trigger extracellular receptor potential from the cortex.⁴⁰ It is to be noted that the cold threshold obtained in this study comes from the mean of recorded threshold which varied from 25°C to 10°C. This apparent heterogeneity is in accordance with the literature which describes a large range of sensitivity in cold-responsive nociceptors.²

If an electrical stimulation of the peripheral receptive field is used (ie, to induce an immediate depolarization of primary afferent fibers without stimulating the nociceptive molecular detectors), fast conducting A-type sensory axons will activate more rapidly the second-order WDR neurons than the slow-conducting C-type sensory axons [see for example Ref. 22]. Regarding their conduction velocities and the appearance of

the first AP discharge, it seems likely that cold information reaching the WDR neurons used A δ fibers to reach spinal WDR neurons of the deep dorsal horn. The recorded response may also depend on other factors, including the thermode heating or cooling time or the thermal inertia of the skin. Indeed, our analysis of the hot and cold temperature ramps of the probe as well as the thermic diffusion properties of the skin (**Fig. 2**) shows that there is a significant difference in latency to reach the same temperature deltas from baseline between hot and cold stimuli. AP generation after the corresponding nociceptive receptor activation (ie, transduction time) may also be a nonnegligible factor.

As mentioned above, the latency of the first AP emitted after cold noxious stimuli (≈ 221 ms) does not seem consistent with an information transmitted by slow-conducting unmyelinated C fibers, which backs the hypothesis that the fast response observed in recorded spinal WDR neurons would correspond to a convergence of information carried by A δ fibers. Moreover, A δ fibers are known to be adaptive,²⁶ meaning that they rapidly cease to fire on a sustained stimulation. This hypothesis is well illustrated by the sustained stimulation protocol showing the adaptive nature of the cold response with the rapid decrease of AP firing within the first few seconds. This result is also in good agreement with previous works conducted on cold-sensitive fibers in the monkey,⁹ demonstrating a short latency to the cold response, followed by a fast decrease of firing as well as an inhibition of the response after repeated stimulation.

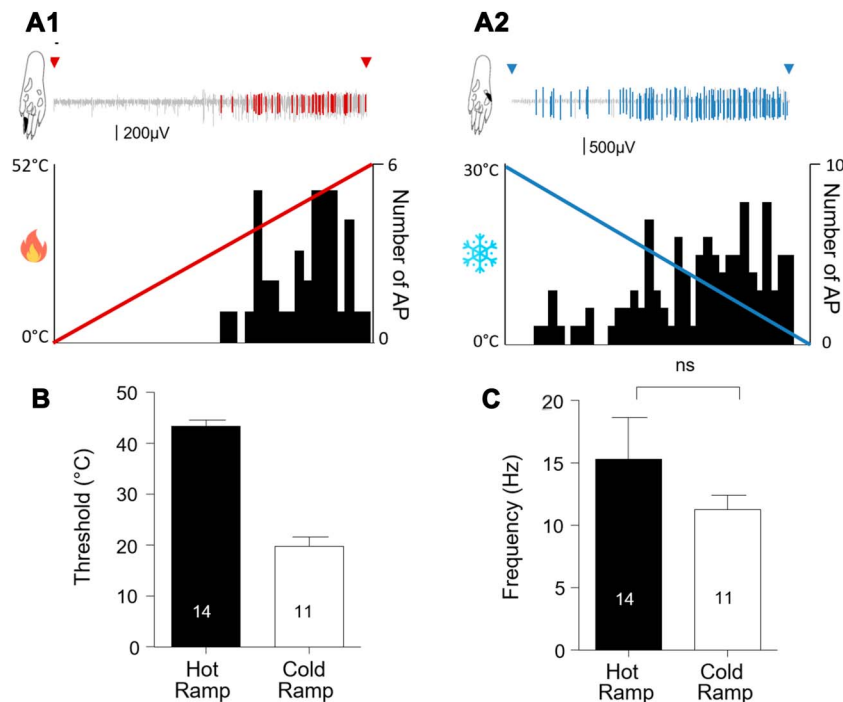


Figure 5. Electrophysiological responses of wide dynamic range spinal neurons after stimulation of the paw receptive field with a slow heating ($3^{\circ}\text{C}/\text{second}$) or cooling ($4^{\circ}\text{C}/\text{second}$) temperature ramp (duration: 7.5 seconds). (A1, A2) Representative traces recorded after a slow hot or cold ramp. Red (A1) and blue (A2) segments within the recording trace correspond to the firing of a single neuron after spike sorting analysis. The black surface on the paw indicates the receptive field stimulated for this response. Histograms show the number of AP per bins of 200 ms. (B) Mean temperature threshold to observe the first AP after hot or cold stimulation of the peripheral receptive field. (C) Mean frequency of AP discharge (Hz) while analyzing the whole period of firing. The number of recorded cells is given in the columns. Statistical code for the Student *t*-test, ns: nonsignificant. AP, action potential.

The results from the various hot stimulation protocols give less clear-cut conclusions, although the latency would argue in favor of a peripheral detection and transmission by C fibers. The observed latency (≈ 441 ms) is in accordance with the work of Xu et al.³⁹ who modeled a response by C nociceptors to heat with a latency of 600 ms. The discrepancy between our value and theirs could come from the type of metal used to heat the skin which implies a different coefficient of thermal conduction.³⁷ Moreover, the presence of postdischarge, characteristic of C fibers,²⁸ was often observed after stimuli of 52°C , but not at 0°C (as illustrated in **Fig. 3**). The hypothesis of the perception of nociceptive heat mostly by C fibers is also consistent with (1) the modelisation of the tail-flick reflex^{3,8} which does not include the involvement of A δ fibers and ii) the observation that the glabrous skin—as in our study—seems to be less innervated by heat-responsive A δ

fibers.^{4,17} Another explanation could be that the recorded neurons in the deep layer of the spinal dorsal horn do not integrate information arising from A δ fibers activated by noxious heat. To further support this idea, it is long been known that the «wind-up» response is a specific property of C fibers in physiological conditions.¹⁶ In our experimental conditions, the sustained noxious hot stimulation protocol induced an immediate and short-lasting facilitation before progressively decreasing to a lower frequency of occurrence. This initial facilitation, absent in sustained cold stimulation, is likely to represent a truncated form of the «wind-up-like» phenomenon, ie, seen fully with electrical stimulation bypassing the natural detector of noxious heat.¹⁹ TRPV1-expressing sensory neurons may perfectly be responsible for this phenomenon because early facilitation may encounter the optimal activation of TRPV1 before its partial deactivation as

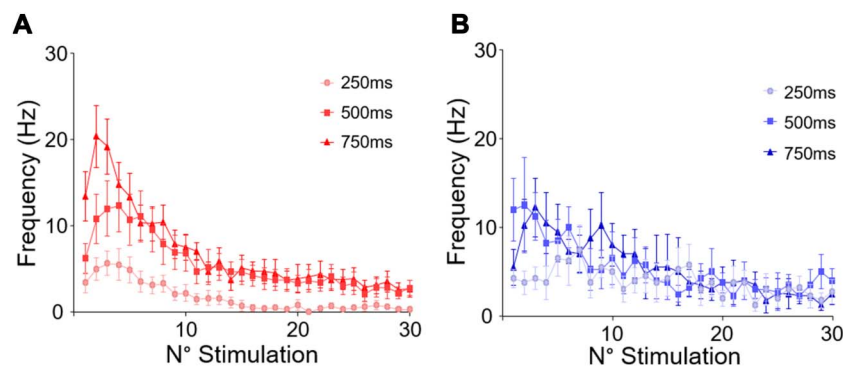


Figure 6. Adaptation of the wide dynamic range neuronal discharge after an iterative stimulation (30 stimulation applied at 1 Hz) of the paw receptive field for noxious hot (52°C , A) or cold (0°C , B). Several stimulation durations were tested.

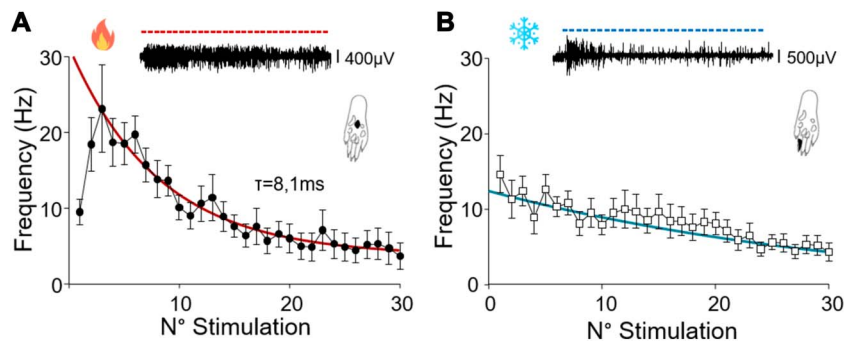


Figure 7. Wide dynamic range neurons coding after 30 stimulations of the paw receptive field with 1000 ms thermal noxious stimulations at 1 Hz. Continuous stimulation's response to 30 repeated hot (52°C; $n = 10$) or cold (0°C; $n = 6$) stimuli (300 °C/s, duration 1000 ms, frequency 1 Hz). Representative traces (top panels) showing the action potential discharge pattern for 30 stimulations at 52°C (A) and 0°C (B). The number of action potential is also given in the histogram for a 200-ms period. Bottom panels gives the frequency per stimulation period. Lines indicates the exponential fit which perfectly adjusted the reduction of the frequency with time.

previously described in the literature.²⁵ Our results are in accordance with the recent study of Ran et al., who recorded in vivo the calcium activity of thermoresponsive spinal neurons after peripheral cutaneous stimulation.³¹ They showed that the integration of cold information is more relative than adaptative and does not depend on absolute temperature, whereas the integration of hot stimulation does and shows little to no adaptation. These results are perfectly in line with ours as illustrated in the hot and cold response curve supporting the existence of «broadly tuned» spinal neurons that are responsive to both hot and cold stimulations. This neuronal population represented most of the recorded WDR neurons in vivo.

In this study, we finely characterized the integration of thermal nociceptive stimuli by WDR neurons in the deep dorsal horn layers of the rat spinal cord. Our results claim for distinct local spinal circuits of convergence for hot and cold nociceptive stimuli, using C-type and A-type sensory afferents, respectively. This observation is of utmost interest for further research work analyzing pathological pain states where pain symptoms related

to cold and hot stimuli are differentially expressed (eg, inflammatory vs neuropathic pain).

Disclosures

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

This work was funded by the Centre national de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Fonds Régional de Coopération et de Recherche (FRCR) Région Grand Est, French National Research Agency (ANR) through the Programme d'Investissement d'Avenir (PIA3; Contract ANR-17-EURE-022, EURIDOL graduate school of pain). C. Gieré received a PhD scholarship from Fondation Université de Strasbourg. PP is a senior fellow of the Institut Universitaire de France.

Appendix A. Supplemental digital content

Supplemental digital content associated with this article can be found online at <http://links.lww.com/PR9/A144>.

Article history:

Received 15 July 2021

Received in revised form 7 October 2021

Accepted 2 November 2021

References

- Abbadie C, Honore P, Besson JM. Intense cold noxious stimulation of the rat hindpaw induces c-fos expression in lumbar spinal cord neurons. *Neuroscience* 1994;59:457–68.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 2009;139:267–84.
- Benoist JM, Pincède I, Ballantyne K, Plaghki L, Le Bars D. Peripheral and central determinants of a nociceptive reaction: an approach to psychophysics in the rat. *PLoS One* 2008;3:e3125.
- Campbell JN, LaMotte RH. Latency to detection of first pain. *Brain Res* 1983;266:203–8.
- Castillo K, Diaz-Franulic I, Canan J, Gonzalez-Nilo F, Latorre R. Thermally activated TRP channels: molecular sensors for temperature detection. *Phys Biol* 2018;15:021001.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997;389:816–24.
- Dado RJ, Katter JT, Giesler GJ Jr. Spinothalamic and spinohypothalamic tract neurons in the cervical enlargement of rats. II. Responses to

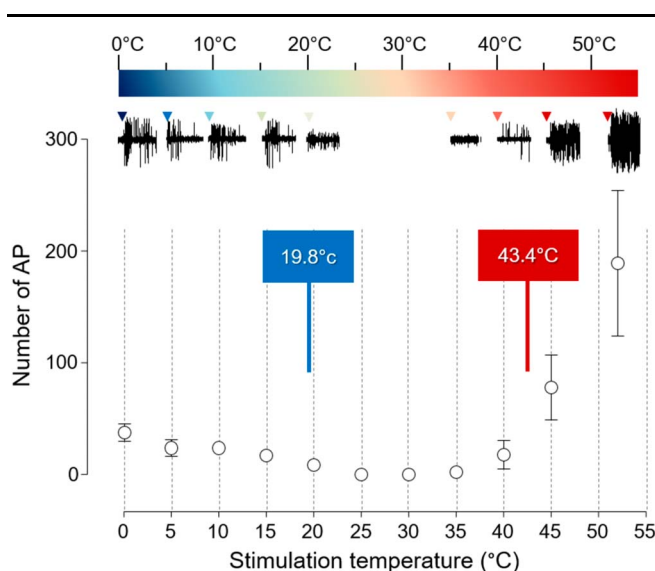


Figure 8. Specific processing of mechano-heat-cold wide dynamic range neurons ($n = 7$). The mean number of action potential (action potential (AP)) is indicated for each temperature used to stimulate the paw receptive field (300 °C/s; duration 5000 ms). The threshold activation temperature for both hot and cold is also represented.

- innocuous and noxious mechanical and thermal stimuli. *J Neurophysiol* 1994;71:981–1002.
- [8] Danneman PJ, Kiritsy-Roy JA, Morrow TJ, Casey KL. Central delay of the laser-activated rat tail-flick reflex. *PAIN* 1994;58:39–44.
- [9] Darian-Smith I, Johnson KO, Dykes R. Cold fiber population innervating palmar and digital skin of the monkey: responses to cooling pulses. *J Neurophysiol* 1973;36:325–46.
- [10] Davis KD, Pope GE. Noxious cold evokes multiple sensations with distinct time courses. *PAIN* 2002;98:179–85.
- [11] Despres O, Lithfous S, Pebayle T, Casadio C, Dufour A. Effects of thermosensory aging well demonstrated by cold stimulations with high temporal resolution. *Muscle Nerve* 2019;60:141–6.
- [12] Dhaka A, Viswanath V, Patapoutian A. Trp ion channels and temperature sensation. *Annu Rev Neurosci* 2006;29:135–61.
- [13] Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest* 2010;120:3760–72.
- [14] Dufour A, Despres O, Pebayle T, Lithfous S. Thermal sensitivity in humans at the depth of thermal receptor endings beneath the skin: validation of a heat transfer model of the skin using high-temporal resolution stimuli. *Eur J Appl Physiol* 2020;120:1509–18.
- [15] Flinger D. Neurophysiology of skin thermal sensations. *Compr Physiol* 2016;6:1429.
- [16] Gozariu M, Bragard D, Willer JC, Le Bars D. Temporal summation of C-fiber afferent inputs: competition between facilitatory and inhibitory effects on C-fiber reflex in the rat. *J Neurophysiol* 1997;78:3165–79.
- [17] Granovsky Y, Matre D, Sokolik A, Lorenz J, Casey KL. Thermoreceptive innervation of human glabrous and hairy skin: a contact heat evoked potential analysis. *PAIN* 2005;115:238–47.
- [18] Han ZS, Zhang ET, Craig AD. Nociceptive and thermoreceptive lamina I neurons are anatomically distinct. *Nat Neurosci* 1998;1:218–25.
- [19] Herrero JF, Laird JM, Lopez-Garcia JA. Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? *Prog Neurobiol* 2000;61:169–203.
- [20] Huang SM, Li X, Yu Y, Wang J, Caterina MJ. TRPV3 and TRPV4 ion channels are not major contributors to mouse heat sensation. *Mol Pain* 2011;7:37.
- [21] Hughes DI, Todd AJ. Central nervous system targets: inhibitory interneurons in the spinal cord. *Neurotherapeutics* 2020;17:874–85.
- [22] Juif PE, Poisbeau P. Neurohormonal effects of oxytocin and vasopressin receptor agonists on spinal pain processing in male rats. *PAIN* 2013;154:1449–56.
- [23] Khasabov SG, Cain DM, Thong D, Mantyh PW, Simone DA. Enhanced responses of spinal dorsal horn neurons to heat and cold stimuli following mild freeze injury to the skin. *J Neurophysiol* 2001;86:986–96.
- [24] Latorre R, Brauchi S, Orta G, Zaelzer C, Vargas G. ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium* 2007;42:427–38.
- [25] Luo L, Wang Y, Li B, Xu L, Kamau PM, Zheng J, Yang F, Yang S, Lai R. Molecular basis for heat desensitization of TRPV1 ion channels. *Nat Commun* 2019;10:2134.
- [26] MacIver MB, Tanelian DL. Structural and functional specialization of A delta and C fiber free nerve endings innervating rabbit corneal epithelium. *J Neurosci* 1993;13:4511–24.
- [27] McKemy DD, Neuhausser WM, Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 2002;416:52–8.
- [28] Mendell LM, Wall PD. Responses of single dorsal cord cells to peripheral cutaneous unmyelinated fibres. *Nature* 1965;206:97–9.
- [29] Menetrey D, Chaouch A, Besson JM. Responses of spinal cord dorsal horn neurones to non-noxious and noxious cutaneous temperature changes in the spinal rat. *PAIN* 1979;6:265–82.
- [30] Paricio-Montesinos R, Schwaller F, Udhayachandran A, Rau F, Walcher J, Evangelista R, Vriens J, Voets T, Poulet JFA, Lewin GR. The sensory coding of warm perception. *Neuron* 2020;106:830–41 e833.
- [31] Ran C, Hoon MA, Chen X. The coding of cutaneous temperature in the spinal cord. *Nat Neurosci* 2016;19:1201–9.
- [32] Simone DA, Kajander KC. Excitation of rat cutaneous nociceptors by noxious cold. *Neurosci Lett* 1996;213:53–6.
- [33] Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 2003;112:819–29.
- [34] Todd AJ, Spike RC, Young S, Puskar Z. Fos induction in lamina I projection neurons in response to noxious thermal stimuli. *Neuroscience* 2005;131:209–17.
- [35] Urch CE, Dickenson AH. In vivo single unit extracellular recordings from spinal cord neurones of rats. *Brain Res Brain Res Protoc* 2003;12:26–34.
- [36] Vandewauw I, De Clercq K, Mulier M, Held K, Pinto S, Van Ranst N, Segal A, Voet T, Vennekens R, Zimmermann K, Vriens J, Voets T. A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing. *Nature* 2018;555:662–6.
- [37] Weast RC. CRC handbook of chemistry and physics. Boca Raton, FL: CRC Press, 1988.
- [38] Winter J. TRPV1 distribution and regulation. In: *Turning up the Heat on Pain: TRPV1 Receptors in Pain and Inflammation*. AB Malberg, KR Bley, eds. Springer, 2005. pp. 39–51.
- [39] Xu F, Lin M, Lu TJ. Modeling skin thermal pain sensation: role of non-Fourier thermal behavior in transduction process of nociceptor. *Comput Biol Med* 2010;40:478–86.
- [40] Zhou S, Lithfous S, Despres O, Pebayle T, Bi X, Dufour A. Involvement of frontal functions in pain tolerance in aging: evidence from neuropsychological assessments and gamma-band oscillations. *Front Aging Neurosci* 2020;12:131.

B. Article 2 : Vers une origine centrale de l'hypersensibilité nociceptive de rats adultes après une séparation maternelle néonatale

Introduction : Il est maintenant bien accepté que les évènements stressants survenant pendant la période néonatale peuvent avoir des conséquences à long terme sur le développement du système nerveux, et notamment celui du système nociceptif. Utilisée parfois comme modèle d'étude des conséquences de la prématurité, la séparation maternelle néonatale (SMN) induit chez les rats adultes des hypersensibilités nociceptives viscérales et somatiques, ainsi que des troubles anxieux, cognitifs et sociaux. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la plasticité des propriétés électrophysiologiques des neurones WDR, chez des rats SMN présentant des hypersensibilités nociceptives mécaniques et thermiques. Dans un deuxième temps, nous avons mesuré, dans les ganglions rachidiens dorsaux et la moelle épinière, l'expression des transcrits codant pour plusieurs détecteurs moléculaires des stimulations mécaniques et thermiques, ainsi que pour des cotransporteurs chlorure essentiels dans l'inhibition GABAergique, afin d'évaluer des potentielles variations d'expression qui expliqueraient le codage par les neurones WDR et les phénotypes hypernociceptifs des rats SMN.

Résultats principaux : Nous avons pu mettre en évidence une exacerbation de la réponse en potentiels d'action des neurones WDR chez les rats SMN suite à des stimulations thermiques chaudes et froides. Cet « excès » de codage nociceptif par les neurones WDR des rats SMN n'est pas associé à un changement des latences de réponses ou de leurs seuils d'activation. Les résultats de biologie moléculaire pointent du doigt l'implication d'un déficit d'inhibition spinal entretenu par une surexpression du cotransporteur chlorure NKCC1.

Contribution de l'auteur : ma contribution à cette étude a été l'enregistrement électrophysiologique des neurones WDR et l'analyse de leur réponse suites au différents protocoles de stimulations thermiques.

Note : cet article est prêt à la soumission.

Toward a central origin of nociceptive hypersensitivity in adult rats after a neonatal maternal separation

Authors :

Clémence Gieré^{1,2}, Yannick Menger¹, Hannah Illouz^{1,2}, Vincent Lelièvre¹, Meggane Melchior³, Pierrick Poisbeau^{1*}

Affiliation :

¹ Centre National de la recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Strasbourg France

² Université de Strasbourg, Ecole Universitaire de Recherche Interdisciplinaire sur la Douleur, Strasbourg, France

³ Centre National de la recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Laboratoire des Neurosciences Cognitive et Adaptative, Strasbourg, France

***Corresponding author :**

Prof. Pierrick Poisbeau, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI - CNRS UPR 3212), 8 Allée du général Rouvillois, 67000 Strasbourg
Tel : 03 88 45 67 27 / email : poisbeau@unistra.fr

Acknowledgment :

This work was made possible thanks to the recurrent funding of CNRS and University of Strasbourg. This project received financial support from the French National Research Agency (ANR) through the Programme D'investissement d'Avenir (contrat ANR-17-EURE-022, EURIDOL, Graduate School of Pain), Fédération pour la recherche sur le cerveau, Région grand est (ClueDOL, Fonds de coopération régionale et de recherche). We thank the Fondation Université de Strasbourg and their donators for supporting CG, YM and PP.

Abstract: Early life adversities alter the development of a still maturing nervous system and can have long-term consequences on its function at adult age. This include nociceptive circuits that are critical to shape an adaptive pain response to protect our organism from potentially damaging insults. As such, adult rats with a history of neonatal maternal separation (NMS) display a visceral and somatic nociceptive hypersensitivity and inefficient analgesic responses to stress. NMS-induced changes in nociceptive networks are still largely unknown and need to be identified in order to understand how to compensate for these anomalies that affect adaptive behavior. In this study, we have characterized the consequences of NMS on wide dynamic range neurons (WDR) in the spinal cord of anesthetized adult rat during the nociceptive processing of hot and cold noxious information. We found that WDR neurons of NMS rats display an excessive coding of mechanical and thermal information applied at the rat hindpaws. This nicely explains the hypernociceptive behaviors seen after noxious mechanical, cold and hot peripheral stimulation. A peripheral change in the expression of molecular transducers for these stimuli (i.e. TRPV1, TRPM8, TRPA1) does not seem to account for this general hyperexcitability. Instead, a decreased chloride-mediated inhibitory tone on WDR neurons may play a role as indicated by the abnormal elevated of the type 1 Na-K-Cl cotransporter transcripts. Altogether, we propose that long-term consequences of NMS is associated with a reduced spinal cord inhibition favoring the expression of pain hypersensitivity. We cannot exclude that this phenomenon is also present at supraspinal sites as other NMS-associated symptoms include also excessive anxiety and impaired sociability.

Key words : Nociception, in vivo electrophysiology, neonatal maternal separation, thermosensitivity, early life stress

INTRODUCTION

Stressful events occurring during the perinatal period (*i.e.* ELA: early life adversity) are now well recognized to alter durably the neurodevelopment and to have long-term consequences on brain functions including pain responses (Fitzgerald, 2005; Melchior *et al.*, 2021). If cortical processing of nociceptive information is already possible around 24 weeks of amenorrhea (age corresponding to extreme premature birth) thanks to the establishment of thalamocortical synaptic connections, pain circuits continue to mature during the neonatal period (Anand & Hickey, 1987; Slater *et al.*, 2010). This is particularly true for descending inhibitory controls of pain, which are still scarcely efficient at birth and require several postnatal weeks to be established. Ontogenesis of nociception during the early postnatal period is associated with hyper-excitability circuits likely explaining the low pain thresholds seen in newborns exposed to thermal and mechanical stimuli (Schwaller & Fitzgerald, 2014). Stabilization of pain thresholds close to those seen in adults are only seen 30-60 weeks after birth (*i.e.* 70-100 weeks of amenorrhea (Andrews & Fitzgerald, 2002)). It is then not surprising that newborns, including premature newborns are extremely vulnerable to pain and any other ELA events during this period (for review see (Melchior *et al.*, 2021)).

To study the long-term consequences of ELA on pain, rodent models are extremely useful as their central nervous system (CNS) at birth (21 days after conception) is very similar to an extremely premature human newborn brain (born at the beginning of the last trimester of pregnancy). This allows the study of various stressors' effect on the CNS during the postnatal life, including those administered for the care of premature human newborns. In line, numerous studies confirmed the deleterious and long-lasting consequences of neonatal painful events on pain responses at adulthood (Taddio & Katz, 2005; Schwaller & Fitzgerald, 2014; Melchior *et al.*, 2021). In our laboratory, we further pointed out the critical role of neonatal maternal separation (NMS), a non-painful stress. We found that NMS in rat is associated with a functional deficit of oxytocinergic (OT) descending controls in stress-induced analgesia and in inflammatory conditions (Melchior *et al.*, 2018). As the OTergic system is still maturing during the neonatal period, a neonatal deficit in OT could be responsible for the nociceptive hypersensitivity and the prevalence of anxious behaviors and well as sociability deficits. In line with this hypothesis, a neonatal rescue treatment of OT during the maternal separation period restores nociceptive thresholds in adult SMN rats as well as anxiety-like behaviors and social behaviors (Melchior *et al.*, 2018; Gazzo *et al.*, 2021). So far, most of our observations were correlative, comparing behavioral measurements with biomarker changes in nerve tissues. No evidence has been obtained regarding a possible abnormal nociceptive processing, for example in the spinal cord.

Spinal processing involve second order neurons in the spinal cord mostly located in the superficial layers. When reaching the spinal cord, nociceptive information is relayed by a network of interneurons then reaches supraspinal structure through projection neurons situated in the layer I and V of the dorsal horn (Todd, 2010). The nature of the nociceptive signal reaching supraspinal centers is thus very much influenced by the balance between excitatory and inhibitory influences, finely tuned by the local interneuronal network (i.e. excitatory and inhibitory interneurons), by the activity of supraspinal descending controls and by the excitability of supraspinal projection neurons. In the first layer, three thermally-responsive neuronal types have been identified: nociceptive-specific fusiform neurons, pyramidal neurons for innocuous cold, and polymodal multipolar neurons responding to nociceptive mechanical, thermal hot and thermal cold *stimuli* (Han *et al.*, 1998). In the dorsal horn of the spinal cord, nociceptive specific neurons are activated only at high ($> 40\text{ }^{\circ}\text{C}$) and low ($< 8\text{ }^{\circ}\text{C}$) temperatures (Khasabov *et al.*, 2001; Todd, 2010). Of course, nociceptive non-specific convergent neurons, such as the wide dynamic range neurons (WDR neurons) that respond to both innocuous and noxious temperatures are also recruited. Using *in vivo* electrophysiological study, a differential integration of cold and hot has been characterized. Heat produces a proportional response that increases with the intensity of the stimulation (i.e absolute coding) while the response to cold is adaptive (i.e relative coding) (Ran *et al.*, 2016). In our laboratory, we recently observed a similar phenomenon while recording *in vivo* from WDR neurons. We could even show that these cold and hot-specific integration patterns were mostly due to the contribution of A-type and C-type peripheral sensory afferent fibers, respectively (Giere *et al.*, 2021). This observation further support the idea that thermonociception is differentially coded in the spinal pain matrix as many of the WDR neurons (25%) are projection neurons (Juif *et al.*, 2013).

Despite growing evidence indicating abnormal nociception in adult animals following neonatal maternal separation, no electrophysiological characterization of the spinal nociceptive processing is available at present to help understand the underlying mechanisms of this long-term plasticity. In this study, we evaluated the spinal processing of mechanical, thermal hot and cold stimulations by recording WDR neurons in anesthetized adult rats. Our objective was to identify a possible spinal explanation for the behavioral nociceptive hypersensitivity seen in adult rats after NMS.

MATERIAL & METHODS

Animals and neonatal maternal separation

For this study, we used 45 to 60 male and female days-old Wistar rats. Rats were housed in littered cages of 3 or 4, in a temperature controlled room (22 °C) at a hygrometry of 45 ± 5 %, under a 12h light/dark cycle (lights on at 7 am), with *ad libitum* access to food and water. All experiments conducted were approved by the regional ethical committee regarding animal experimentation (CREMEAS, national agreement APAFIS #201706131614598).

At birth, litters were randomly assigned to one of the two groups: control (CTRL) and NMS. The NMS pups were separated for 3h per day from the second to the twelfth postnatal day (P2-P12). They were placed in a new cage separate room under a red lamp to avoid hypothermia. The control pups remained undisturbed and with their mother until weaning. Pups from both group were weaned at P21 and housed 4 rats per cage. Both male and female were used, as no difference could be seen during the electrophysiological recordings or behavioral test.

Behaviourial measures of nociception

Mechanical sensitivity was assessed with a calibrated forceps (Bioseb, Vitrolles, France) as previously described (Luis-Delgado *et al.*, 2006). After habituation, rats are loosely restrained in a towel in order to reduce environment stress. A gradual increasing force is applied on the hindpaw of the animal until withdrawal; the corresponding pressure is considered the nociceptive threshold. This manipulation is performed three times for each hindpaw and the individual paw values are averaged.

Thermal sensitivity was measured with the Hargreaves method, as previously described (Hargreaves *et al.*, 1988). Briefly, rats are placed in plexiglas boxes (20 cm x 25 cm x 45 cm) for a 15-20 minutes habituation period and then hindpaws are exposed to a radiant heat. The latency time required to observe paw withdrawal is measured and considered as the nociceptive heat threshold. Measurements are performed three times for each hindpaw and values are averaged for further analysis. The hot Plate and cold plate test has also been used. In this procedure, animals are placed in a Plexiglas box (20 cm x 25 cm x 45 cm) sitting onto a metallic plate set at 52°C or at 0°C, for noxious hot and cold stimulations respectively. Latency to observe the first nociceptive reflex (paw withdrawal, paw lick, jump) is considered as the nociceptive threshold. Cut off is set at 30 seconds for both temperatures.

***In vivo* extracellular electrophysiological recordings**

In vivo extracellular recordings were carried out as previously described (Juif et al., 2013). Rats are anesthetized with isoflurane 4% pushed by pressured air at a flow rate of 700 mL/min (Ventoflurane®, Vibrac, Carros, France). They are then placed onto a stereotaxic frame equipped with a nasal mask to maintain the anesthesia adjusted to 3% for the ensuing surgery. An electrical warming blanket helps to keep a steady body temperature (Ugo Basile, Rodent Warmer X1, Gemonio, Italie). Surgery begins once the animals are areflexic. A laminectomy is performed at the low lumbar level (L3-L5). With the cervical and sacral vertebrae firmly held with metallic clamps, the meninges are carefully removed to expose a spinal cord segment. This segment is next covered with mineral oil and the isoflurane anesthesia is progressively reduced to 1.5% for the recordings. At the end of the electrophysiological experiment, animals are killed with an overdose of anesthetics.

Single unit extracellular recordings were made from WDR neurons located in the deep layers of the dorsal horn (400-1000µm) with stainless steel microelectrode (FHC, Stainless Steel, UE FK1, Bowdoin, USA) lowered into the medial part of the spinal cord with an electrical micromanipulator (Scientifica, IVM 1000, Uckfield, UK). Variations of potential were amplified (DAM80, AC Differential Amplifier, WPI, Aston, UK) and filtered for frequency higher to 3kHz and lower to 300Hz. All along the experiments, 50/60Hz frequencies are suppressed using a noise eliminator (HumBug, WPI, Aston, United-Kingdom). The resulting voltage signal is digitized (Power 1401, CED, Cambridge, UK) and processed by the Spike 2 software (CED, Cambridge, England).

Mechanical and thermal stimulation during electrophysiological recording

WDR neurons were identified while stimulating the peripheral receptive field with mechanical stimulations. Various mechanical stimuli were applied: light friction with a brush, 3 second pressure with the finger, 3 seconds pinching with forceps, a range of von Frey hairs (4g to 300g) applied until bending. The same receptive fields were stimulated with hot and cold stimulations.

Thermal stimulations were made using a micropeltier TCSII thermode (Thermal Cutaneous Stimulator II, QST Labs, Strasbourg, France) allowing the stimulation of the cutaneous surface with temperature ranging from 0°C to 60°C, with an adjustable heating or cooling rate (from 0.1°C/s to 300°C/s). The device provides five independent stimulation zone (8 mm²) granting the possibility to perform very precise stimulations on a restricted area on the paw of the animals. Three protocols of stimulation were chosen, as previously described (Giere *et al.*, 2021) : (i) Slow ramps from the neutral temperature (30°C) to 52°C (heating speed of 3°C/s) or to 0°C (cooling speed of 4°C/s) for a maximal duration of 7.5 seconds. This procedure helped measure the latency to observe the first emitted action potential (AP) corresponding to the threshold temperature of WDR neuron activation. (ii) Single stimulations from

the neutral temperature (30°C) to 52°C or 0°C for 1 second, at a heating or cooling speed of 300°C/s. We then analyzed the latency to the first AP and the WDR neuron instantaneous frequency of discharge during the stimulation and after (i.e. post discharge). (iii) Fast (300°C/s) sustained stimulations from the neutral temperature of 30°C to 52°C or 0°C during 30 seconds to characterize the frequency adaptation of the WDR neuron action potential discharge.

Nerve tissue sampling and RT-qPCR

Lumbar segment dorsal root ganglia (DRG) and spinal cords were collected, placed in a guanidine thiocyanate/ β -mercaptoethanol preparation using ultraturax and stored at -80°C. Total RNA was extracted following a protocol consisting in two independent total RNA extractions separated by a DNase I treatment (TURBO™ DNase; Ambion, Life technologies, Saint Aubin, France), as previously described in detail (Lelievre *et al.*, 2002). An amount of 800 ng RNA was reverse transcribed with the RNA iScript kit (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Quantitative PCR was performed using SYBR Green Supermix (Bio-Rad), on the iQ5 Real Time PCR system (Bio-Rad). Amplification were carried out in 42 cycles (20s at 95°C, 20s at 60°C and 20s at 72°C). Standardization was done using standard curves made from serial dilutions of samples. Amplification data are shown as relative gene expression (ratio between cDNA concentration of the gene of interest and the one from the control housekeeping gene). The housekeeping gene selected for this study was the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) as its transcripts are highly stable among the different samples. Primer sets for all genes of interested were designed using Oligo6.0 and M-fold softwares (primer sequence in Supplementary Table 1). Samples were accurately dispensed in duplicates using a robotic workstation (Freedom EVO100; Tecan, Lyon, France) and amplification efficiency given by standard curves was always close to 100% ($\pm 2\%$), while amplification specificity was assessed by a melting curve study.

Statistical analysis

All data were graphed using GraphPad Prism 6 (GraphPad software Inc, California, United-States) and are expressed in mean \pm standard error of the mean (SEM). After verifying the linear distribution of the data, we used parametric (unpaired Student's t test) or non-parametric (Mann-Whitney) statistical tests. For the von Frey and sustained stimulation protocols, results were analyzed using a two-way ANOVA, time or stimulation x group. A p value below 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Neonatal maternal separation and behavioral nociceptive hypersensitivity at adulthood

Before performing electrophysiological recordings, we first assessed the impact of NMS on nociceptive behavior displayed by the adult rats while exposed to mechanical and thermal hot/cold stimulations. Compared to control rats (i.e. not separated during the neonatal period), we found that NMS rats have hypernociceptive behaviors to all tested sensory modalities (**Figure 1**).

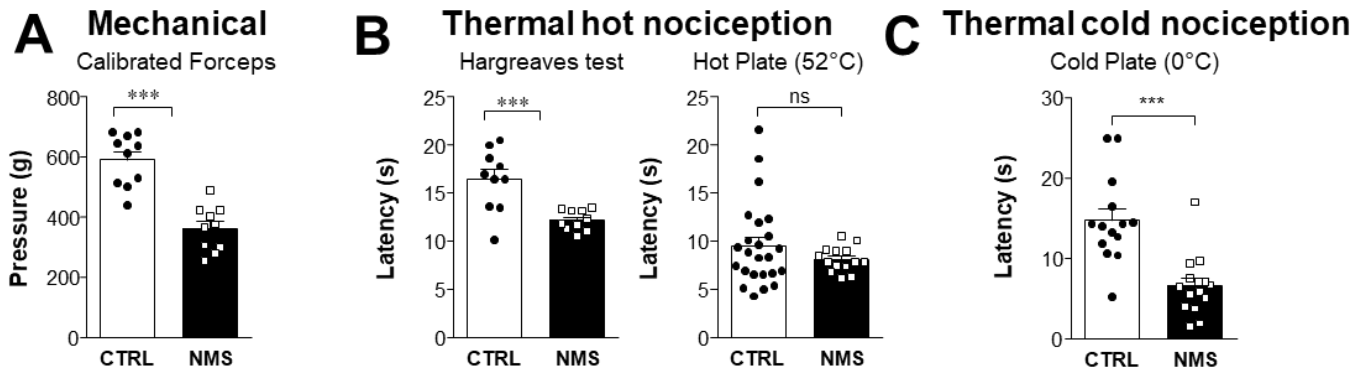


Figure 1: Nociceptive profile of NMS animals (A) Mechanical threshold causing the withdrawal of the hindpaw (CTRL=10; NMS=10) (B) Latency to paw withdrawal for the Hargreaves' test (CTRL=10; NMS=10) and the hot plate test (CTRL=10; NMS=10) (C) Latency to the first nociceptive behavior for the cold plate test (CTRL=14; NMS=4). Statistics: unpaired student t-test. Code: (***) $p < 0.001$; ns: non-significant.

NMS rats exhibited a significant lower mean mechanical threshold as measured with the calibrated forceps (**Figure 1A**; unpaired Student t-test, $t = 6.287$, $df = 18$, $p < 0.001$; CTRL: 592.1 ± 28 g, $n = 10$; NMS: 362.4 ± 24 g, $n = 10$). They also have a lower mean latency to remove their paw while stimulated with noxious heat using Hargreaves method (**Figure 1B**; unpaired Student t-test, $t = 3.984$, $df = 18$, $p = 0.0009$; CTRL: 16.43 ± 1.0 s, $n = 10$; NMS: 12.18 ± 0.3 s, $n = 10$). We could not reach a statistical significance at $p < 0.05$ with the hot plate (**Figure 1B**; unpaired Student t-test, $t = 1.179$, $df = 36$, $p = 0.246$; CTRL: 9.53 ± 0.9 s, $n = 24$; NMS: 8.13 ± 0.3 , $n = 14$). Contrary to the hot plate test, cold plate test helped identify a significant hypernociception of NMS rats to cold, as seen by the shorter mean withdrawal latencies compared to control animals (**Figure 1C**; unpaired Student t-test; $t = 4.669$, $df = 26$, $p < 0.0001$; CTRL: 14.80 ± 1.4 s, $n = 14$; NMS: 6.58 ± 1.0 s, $n = 14$).

Electrical coding of peripheral mechanical information by WDR neurons of NMS rats

While identifying WDR neurons in the spinal cord with peripheral mechanical stimulation, we characterized their activation following various stimulations (**Figure 2**). In the control group, they all responded with an action potential (AP) discharge after peripheral stimulation with brush, pinch and von Frey filaments. It is important to note here that a significant increase in the AP discharge in the WDR neurons from the control group was reached only with the 60g or higher von Frey filaments (**Figure 2B**; two-way ANOVA group x time, $F_{(9,126)}=51.43$, $p<0.0001$). As clearly seen in figure 2A, WDR neurons recorded in NMS rats emitted a significantly higher number of AP in response to intense mechanical stimuli (i.e. press: $p=0.0002$; pinch: $p<0.0001$), but not innocuous ones (brush: $p=0.9566$) compared to the control group.

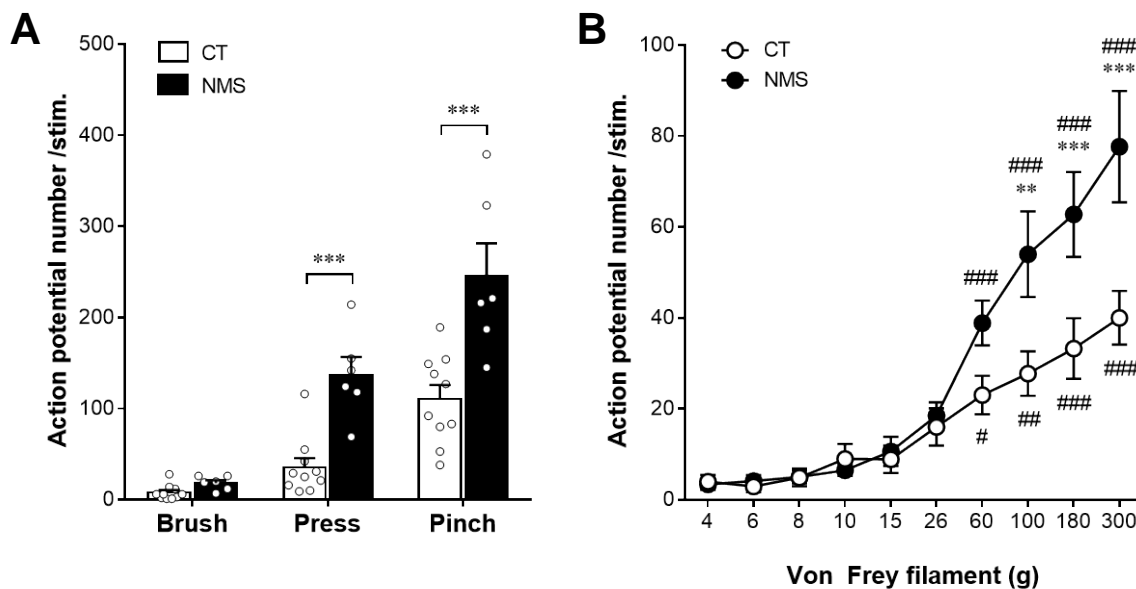


Figure 2: WDR neurons response to innocuous and nociceptive mechanical stimuli in CTRL and NMS animals. (A) Histogram represents the number of action potential (AP) emitted following a light pressure applied with a brush, a press of 3s applied with the finger and a pinch of 3s applied with forcer on the paw's receptor field. Statistic: two way ANOVA, Sidak's post-hoc test, code (*) $p<0.05$. (B) Number of AP emitted after applying an increase of pressure with von Frey hairs. Statistic: two way ANOVA, Sidak post-hoc test; code (*) $p<0.05$; (**) $p<0.01$; (***) $p<0.001$.

If the global statistics indicated a statistically significant difference in the number of emitted AP between groups (two-way ANOVA, stimulation x group, $F_{(1,42)} = 39.35$; $p < 0.0001$), posthoc tests revealed only a difference after receptive field pressure (CTRL: 35.4 ± 10.0 AP, $n = 10$; NMS: 137.0 ± 20.0 AP, $n = 6$) or pinching (pinch; CTRL: 110.3 ± 15.0 AP, $n = 10$; NMS: 245.2 ± 36.0 AP, $n = 6$), but not for brush (CTRL: 7.9 ± 2.6 AP, $n=10$; NMS: 18.33 ± 2.1 AP, $n = 6$). A similar conclusion could be drawn while applying von Frey filaments. Thin filaments (4g to 26g) produced a similar amount of AP

in CTRL rats and NMS rats while thicker filaments (starting at 60g) induced a significant increase in the AP firing of WDR neurons in NMS rats compared to CTRL (**Figure 2B**; two-way ANOVA repeated measures, stimulation x group, $F_{(1,14)} = 5.108$; $p = 0.0403$).

Neonatal maternal separation affects thermal nociceptive processing by WDR neurons

We first measured the temperature threshold to observe the first AP in WDR neurons following a slow heating or cooling ramp. As illustrated in **Figure 3**, we found no difference of temperature threshold between CTRL and NMS group for hot (unpaired Student t-test, $t = 0.757$, $df = 32$, $p = 0.454$; CTRL: 44.7 ± 0.8 °C, $n = 20$; NMS: 43.8 ± 0.9 °C, $n = 14$) and cold stimulation (unpaired Student t-test, $t = 0.750$, $df = 7$, $p = 0.478$; CTRL: 17.42 ± 2.8 °C, $n = 6$; NMS: 21.1 ± 3.9 °C, $n = 3$).

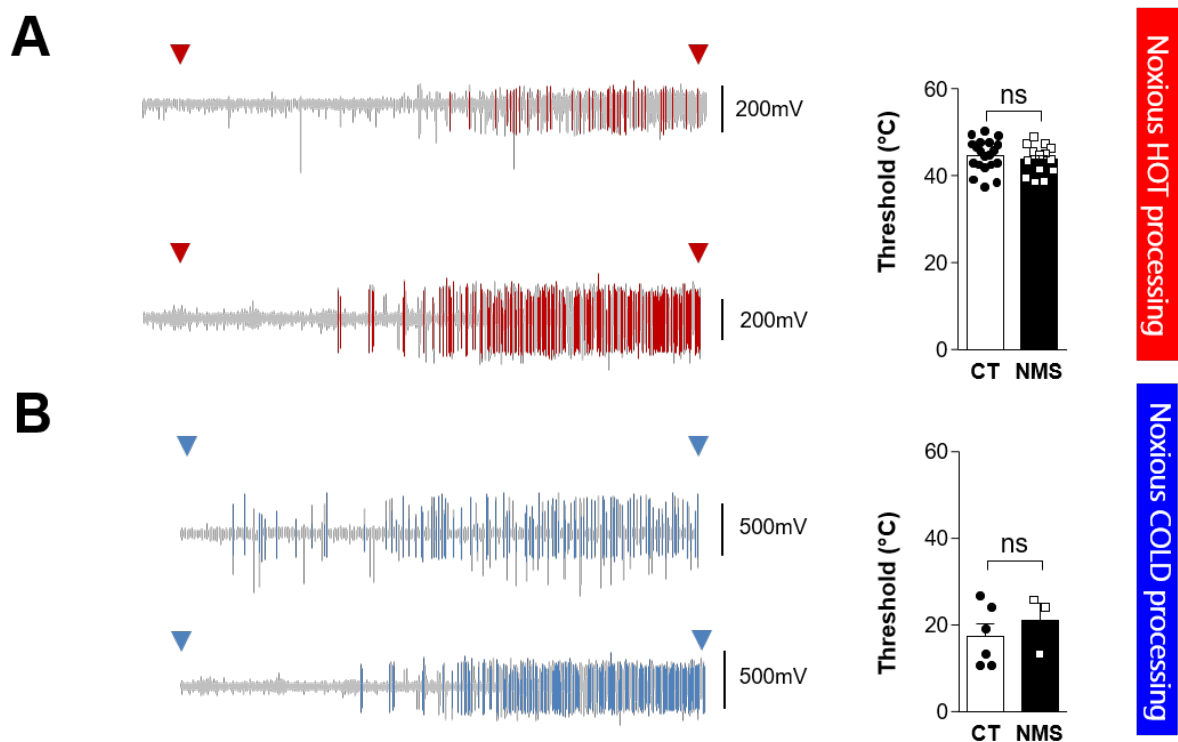


Figure 3: WDR neurons response to a slow heating (A, 30°C to 52°C, 3°C/s) or cooling (B, 30°C to 0°C, 4°C/s) ramp in CTRL and NMS animals. Example of representative electrophysiological traces in response to the stimulation has been provided (raw traces in gray, single, isolated neuron in red and blue). Histogram represents the activation threshold of WDR neurons. Statistic: unpaired student t-test; code: ns: non significant.

We then assessed WDR neuronal AP response to a one second long single hot (52°C) or cold (0°C) noxious stimulation. While latency to first AP were similar between the groups (**Supplementary Figure**

1) for hot and cold stimulation (see also (Giere *et al.*, 2021)), the mean AP frequency evoked by the stimulation was significantly higher in NMS group compared to CTRL group for noxious heat (**Figure 4A₁**; unpaired Student t-test, $t = 2.997$, $df = 43$, $p = 0.0045$; CTRL: 15.25 ± 3.1 Hz, $n = 20$; NMS: 27.98 ± 2.9 Hz, $n = 25$) and noxious cold (**Figure 4A₂**; unpaired Student t-test, $t = 2.572$, $df = 17$, $p = 0.0198$; CTRL: 11.3 ± 1.6 Hz, $n = 10$; NMS: 17.8 ± 1.9 Hz, $n = 9$). We also found that WDR neurons from the NMS rats had higher instantaneous frequency rates than CTRL rats for both modalities (**Figure 4B**; Noxious hot stimulation: two-way ANOVA, $F_{(1,37)} = 7.822$; $p = 0.0081$; Noxious cold stimulation: two-way ANOVA, $F_{(1,17)} = 4.454$; $p = 0.0499$). Following the thermal stimulation, WDR neurons of the NMS group produced more AP during the post-discharge period after a noxious hot stimulation (**Figure 4C₁**; unpaired Student t-test, $t = 3.750$, $df = 43$, $p = 0.0005$; CTRL: 10.6 ± 1.2 Hz, $n = 20$; NMS: 26.6 ± 3.7 Hz, $n = 25$) but not after a noxious cold stimulation (**Figure 4C₂**; unpaired Student t-test, $t = 1.082$, $df = 17$, $p = 0.2945$; CTRL: 6.0 ± 1.3 Hz, $n = 10$; NMS: 4.0 ± 1.3 Hz, $n = 9$).

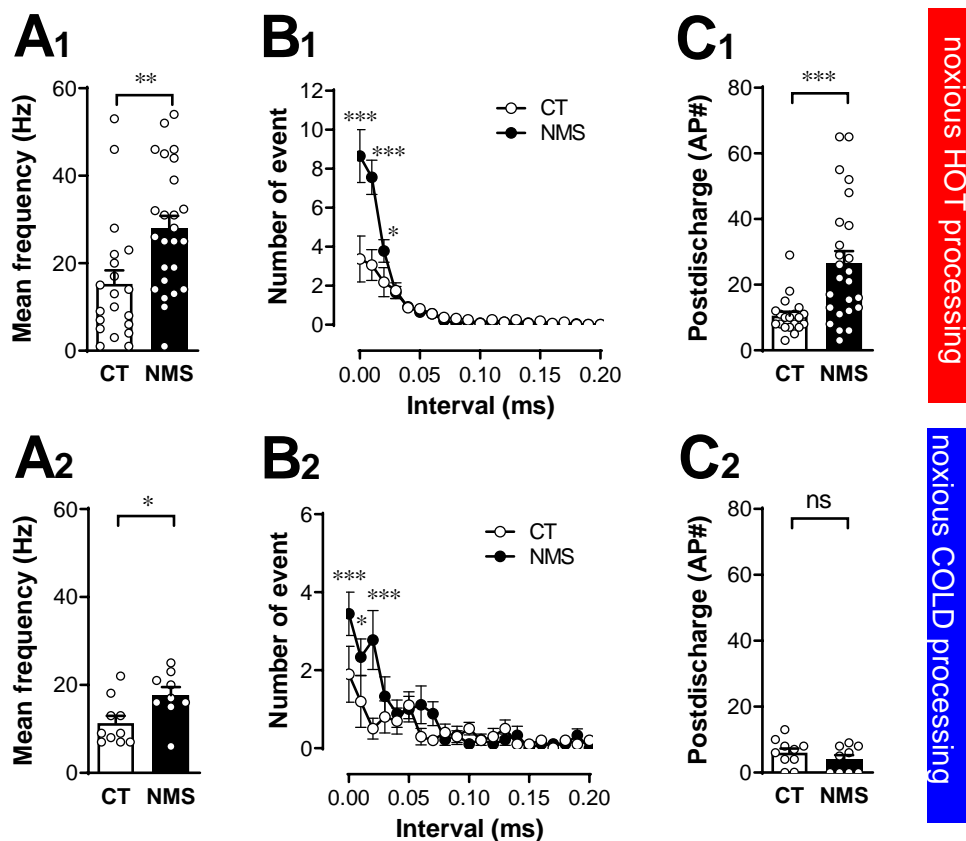


Figure 4: Response to a single hot or cold nociceptive stimulation (A) Mean frequency of discharge of WDR neurons during the 1s during a hot (A1) or cold (A2) single stimulation (speed 300°C/s , duration 1s) in adult CTRL and NMS animals. Statistic: unpaired student t-test, code (**) $p < 0.01$, (*) $p < 0.05$, ns: non-significant. (B) Instantaneous frequency for hot (B1) and cold (B2) stimuli. Statistics: two-way ANOVA, Sidak's post-hoc, code: (***) $p < 0.001$, (*) $p < 0.05$. (C) Post discharge during the 1s following the end of the stimulation for heat (C1) and cold (C2). Statistics: unpaired student t-test, code (***) $p < 0.001$; ns: non significant.

As previously described in one of our recent study (Giere *et al.*, 2021), a fast and sustained peripheral stimuli induces a short-lasting, wind-up like phenomenon which does not persist (contrary to electrical stimulation applied repetitively at the receptive field) because of the deactivation properties of molecular thermal transducers. A similar phenomenon could be observed in WDR neurons from control and NMS rats (Figure 5A). As expected, statistically significant increases in frequency could be seen in the NMS group after hot stimulation, compared to control and during the first 10 seconds (Figure 5A; two-way ANOVA; $F_{(1,780)} = 178.2$; $p < 0.0001$). Noxious cold only evoked a significant higher response in NMS rats for the first stimulation compared to CTRL rats (Figure 5B; two-way ANOVA; $F_{(1,360)}=10.28$; $p=0.0015$) before a rapid adaptation. This further supported the idea that hot and cold modalities are carried by different sensory neurons before reaching WDR neurons.

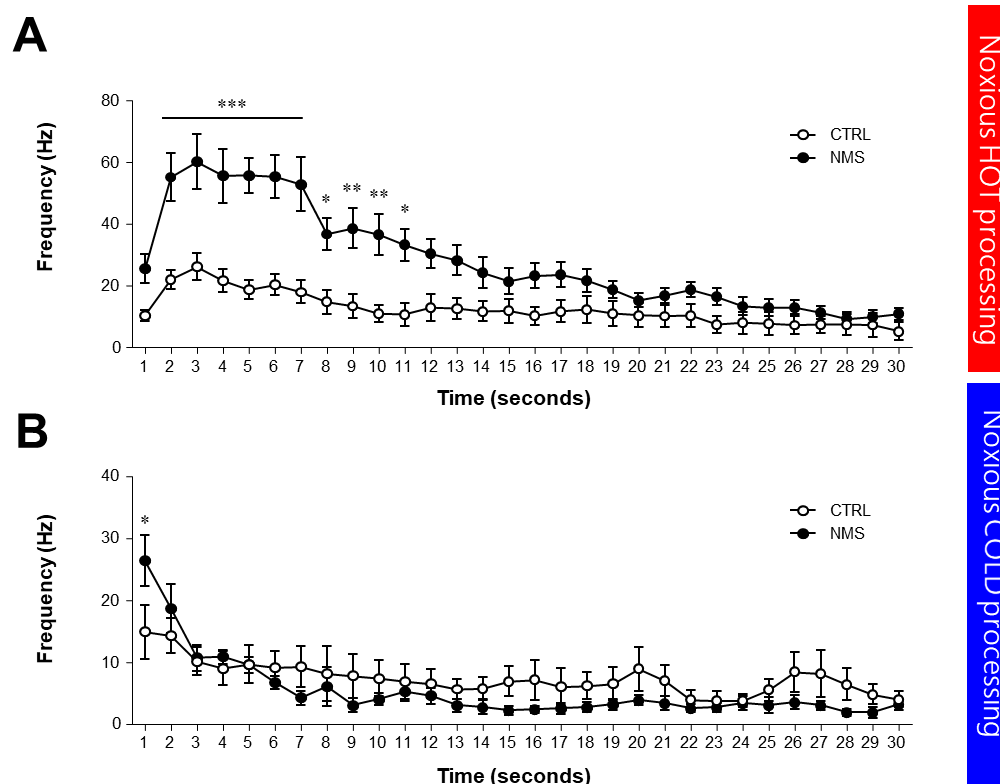


Figure 5: Mean frequency of discharge of WDR neurons during a sustained hot (A) or cold (B) stimulation during 30s in CTRL and NMS animals. Statistics: two-way ANOVA, Sidak's post-hoc; code: (***) $p < 0.001$; (**) $p < 0.01$, (*) $p < 0.05$.

If NMS does not modify activation thresholds nor latency to first AP, it has long-lasting consequences on the processing of noxious hot and cold spinal messages that are higher in AP frequency in comparison with WDR neurons of the control group.

Neonatal maternal separation effect on peripheral molecular transducers of mechanical and thermal stimulations

In order to better understand the NMS-induced alteration of the WDR neuron properties while processing noxious messages, we analyzed the expression of several gene coding for proteins possibly involved in the peripheral (i.e. DRG neurons) and central modulation (i.e. spinal here) of mechanical and thermal nociception.

Expression of the transcripts coding for the mechanical transducer Piezo2 in the rat DRGs were similar between groups (Figure 6A; CTRL: 0.8 ± 0.1 , $n = 8$; NMS: 0.7 ± 0.1 , $n=8$; unpaired t test with Welch's correction, $t=0.7466$, $df=14.00$, $p=0.4676$). Regarding the molecular transducers of thermal information (Figure 6B-D) in NMS rats compared to control, we found a decreased in the transcript expression for TRPA1 (CTRL: 2.79 ± 0.26 ; $n = 8$; NMS: 1.27 ± 0.09 ; $n = 8$, unpaired student t-test, $t = 5.438$, $df = 8.639$, $p = 0.0005$), for TRPM8 (CTRL: 0.06 ± 0.005 ; $n = 8$; NMS: 0.04 ± 0.005 , $n = 8$; unpaired student t-test, $t = 3.344$, $df = 13.97$, $p = 0.0344$) and for TRPV1 (CTRL: 0.17 ± 0.02 , $n = 8$; NMS: 0.05 ± 0.01 , $n = 8$; unpaired student t-test, $t = 5.081$, $df = 9.984$, $p = 0.0005$). This likely suggest a compensation (though insufficient) while considering the behavioral nociceptive hypersensitivity measured.

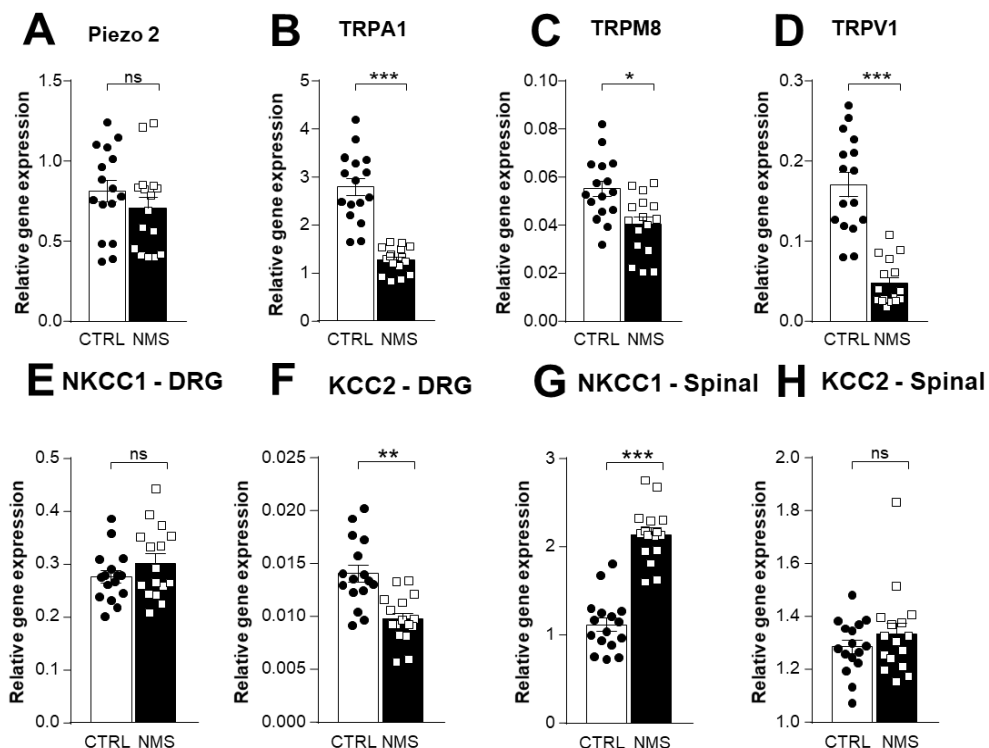


Figure 6: Changes in relative gene expression of transcript for mechanical and thermal receptors in the DRGs (A, B, C and D) as well as chloride transporters NKCC1 and KCC2 in the DRG (E and F) and the spinal cord (G and H) as measured with RT-qPCR in adult CTRL and NMS animals (P45-P60; $n=16$) Statistics: unpaired student t-test with Welch's correction; code (***) $p<0.001$; (**) $p<0.01$; (*) $p<0.05$; ns: non significant.

We further compared the expression levels for chloride co-transporters, whose expression is critical to finely tune the inhibition mediated by chloride ions (i.e. through activation of glycine and GABAA receptor channels). As shown in **Figure 6E-F**, the expression of NKCC1 is not different in the DRG between groups (CTRL: 0.277 ± 0.02 , $n = 8$; NMS: 0.30 ± 0.02 , $n = 8$; unpaired student t-test, $t = 0.888$, $df = 12.53$, $p = 0.3912$) contrary to the spinal cord where expression is significantly higher in NMS animals (CTRL: 1.12 ± 0.10 , $n=8$; NMS: 2.14 ± 0.10 , $n = 8$; unpaired student t-test, $t = 7.556$, $df = 14$, $p < 0.0001$). The expression of KCC2 in DRG expression decreases (CTRL= 0.015 ± 0.001 ; $n=8$; NMS= 0.010 ± 0.001 ; $n=8$, unpaired student t test, $p=0.0090$, $t=3.083$, $df=12.57$). In addition, we fail to observe any difference for KCC2 in the spinal cord between control and NMS rats (CTRL: 1.29 ± 0.03 , $n = 8$; NMS: 1.34 ± 0.05 , $n = 8$; unpaired student t test, $t = 0.8677$, $df = 11.76$, $p=0.4029$). The higher expression of NKCC1, reported in previous work by our laboratory and others, suggest that chloride-mediated inhibition is reduced in the spinal cord of NMS rats and possibly in WDR neurons.

DISCUSSION

In this study, we provide original evidence indicating that adult rats having experienced NMS have an impaired spinal processing by WDR neurons. This observation nicely explains the hypernociceptive behaviors when they are exposed to mechanical, thermal hot and cold noxious stimulations. The lack of change in temperature thresholds between control and NMS groups, as well as the lower levels of TRP expression, does not support a major peripheral contribution to this excess coding by WDR neurons. Instead, changes in the local chloride tonic and/or phasic inhibition (i.e. contributed by NKCC1 activity) in the superficial layer interneuron networks and possibly in WDR neurons may explain the increased capacity to emit repetitive AP without changing the temperature threshold. This hypothesis fully fits with the gate control theory proposed by (Melzack & Wall, 1965).

NMS has long been used as a model of psychosocial stress that triggers long-term changes on several brain functions and their associated behaviors (Melchior *et al.*, 2021). Among others, we show here that NMS has modality nonspecific consequences on nociceptive processing shaping the behavioral responses to adapt to potentially damaging mechanical and thermal stimulations. At adulthood, rats exposed to NMS are clearly hypersensitive to these stimulations. Among many mechanisms possibly explaining these durable changes, epigenetic influences are involved. Our laboratory has already pointed out the role of class I/II/IV histone deacetylases recently and other groups have also identified possible genes of interest likely modulating the nociceptive system (Moloney *et al.*, 2015; Melchior *et al.*, 2018). Because NMS-induced nociceptive changes are not selective on the behavioral expression as well as the electrophysiological signature at this stage, it is unlikely that a specific epigenetic

pathway is involved. The available literature on the NMS model further claims for multiple consequences of NMS likely affecting the peripheral and central nervous system.

At the periphery, we failed to see any overexpression in the molecular detectors for mechanical and thermal stimuli. The expression level of thermosensitive TRP channels was even lower in NMS compared to control. If protein levels are also lower, it is unlikely that these protein (i.e. piezo2, TRPA1, TRPM8 and TRPV1) contribute to hypernociception. Instead, the lower expression level might reflect homeostatic regulation attempting to reduce the hyperexcitability of nociceptive DRG neurons that have been previously shown to surexpress $\text{Na}_v1.8$ (Juif *et al.*, 2016). Mechanical hypersensitivity may be explained by changes in the expression another molecular detector than piezo2. However, we can not rule out a possible contribution by piezo2 if post-translational processes increase its function despite lower expression. This was not be tested in this study. A similar hypothesis can be drawn for the thermo-responsive TRP channels TRPV1, TRPM8 and TRPA1. Compensatory homeostatic regulation is compatible with the previously demonstrated hyperexcitability of C-type nociceptive sensory neurons which express lower levels of K_{2P} channels and higher levels of voltage-gated $\text{Na}_v1.8/1.9$ (Luo *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2013; Juif *et al.*, 2016). The changes are likely to affect the general excitability of C-type sensory neurons but not the molecular detectors of mechanical and thermal stimulation. At this stage, cold hypersensitivity seen in electrophysiological recording and behavioral testing cannot be fully explained as it is mostly coded by A-type fibers. It is likely that other mechanisms are involved. Apart from changes in the sensory neurons carrying nociceptive messages to the central nervous system, NMS may also affect nociceptive structures in the central nervous system.

We recorded WDR neurons *in vivo* as they are involved in the processing of non-nociceptive and nociceptive information coming from the periphery and, for a subpopulation of them (25%), are projection neurons (Juif *et al.*, 2013). Because the latency to observe the first AP after noxious stimulation was similar in the control and NMS groups, it is unlikely that their passive properties are significantly affected by this neonatal stress. A change in the latency would have indicated for example, a decreased resting membrane potential or a reduction of the threshold to fire AP (Hu *et al.*, 2013). This was not the case here. Instead, we did observe that WDR neurons from NMS rats were capable of producing more AP for a given nociceptive stimulation. This suggests that active properties of WDR are likely to be durably affected after NMS. Among the likely candidate permitting high frequency firing, changes in the open state of potassium channel is a classical hypothesis. This effect is often seen with transient potassium channels (I_A) which are highly regulated by small changes in the resting membrane potential or by neuromodulators. They are, moreover, the likely candidates when modulating the frequency of AP firing. Of interest in this model, OT deficits have been claimed to

account for some of symptoms seen in this model. Among many other modulators, OT plays a key role for the modulation of I_A currents and control the AP firing frequency of superficial layer neurons of the spinal cord (Breton *et al.*, 2009). Since OT increases GABAergic inhibitory control in the spinal cord, it is tempting to speculate that the long-lasting consequence of the lack of OT action in NMS rats renders WDR neurons hyperexcitable when receiving peripheral sensory information. This working hypothesis would require to record WDR neurons with an intracellular electrode in order to characterize the shape of action potential.

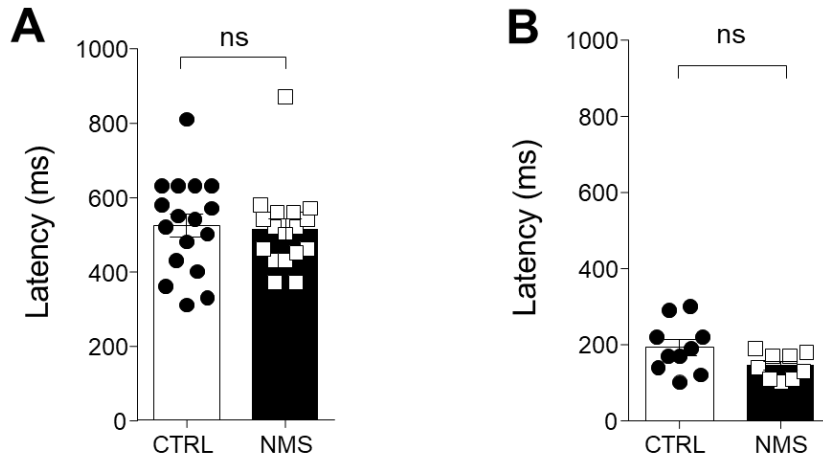
To go one step further in this direction, a reduced inhibitory control by GABAergic interneurons has also been involved in the expression of nociceptive hypersensitivity and pain symptoms. This inhibition is critical to control and closes the “gate” as described initially by Melzack and Wall. Because most of the inhibition is mediated by chloride permeable GABAA receptor-channels, we measured the expression of chloride cotransporters NKCC1 and KCC2 because they have been involved in the expression of inflammatory/neuropathic pain symptoms as well as in the expression of nociceptive hypersensitivity (Price *et al.*, 2005; Hasbargen *et al.*, 2010; Kaila *et al.*, 2014).

Chloride cotransporters NKCC1 and KCC2, controlling the import or export of chloride respectively, are major determinants of the expression of pain symptoms. They were measured in the spinal cord and DRG of NMS rats. As previously observed, NKCC1 expression is far much higher in NMS rats while compared to control. A neonatal treatment of an antagonist of NKCC1 (bumetanide) during the separation period rescues the nociceptive hypersensitivity as well as anxiety like symptoms and social deficits in adults NMS rats (Gazzo *et al.*, 2021).

In summary, our findings suggest that an alteration in the coding properties of WDR spinal neurons account for a large part for the enhanced nociceptive hypersensitivity of NMS rats. This sustained hyperexcitability is contributed by several factors including a reduced chloride inhibition due to the NKCC1 overexpression in the spinal cord. In addition with other possible mechanisms mentioned above, this creates a dysregulation of the excitatory/inhibitory balance in superficial spinal networks which, in term, is likely to favor the excessive coding of nociceptive information to supraspinal centers. This study provides a new insight into the role of spinal WDR neurons in the integration of mechanical and thermal stimuli in NMS rats, where a central spinal disinhibition leading to a neuronal hyperexcitability as well as a decrease in peripheral nociceptor expression could partially be responsible for the excessive nociceptive coding contribute to behavioral nociception.

Supplementary figures and tables

Supplementary figure 1



Supplementary Figure 1: Latency to first AP following a single hot (A) and cold (B) stimulation in CTRL (A, n=17; B, n=10) and NMS (A, n=17; B, n=9) animals. Statistics: unpaired student ns: non significant

Supplementary Table 1

Nom de gène	Amorce (à l'endroit et à l'envers)	Référence NCBI	Région	Taille de l'amplicon (bp)
PIEZO2	CGGCAATTCTTCTATGACCT ATGATGATGAAGTCCACGGTG	XM032885462	6739-6836	98
TRPA1	TTGCAAAGAAGTGGTCCAAA GGCAACACGAAGATCATACTG	NM207608	2364-2471	108
TRPM8	AGTTTGTCCGCTCTTCCTG CTAGGGTGCTGAAGTGGGTG	NM134371	1453-1551	98
TRPV1	GGGCATCTATGCTGTCATGAT AATCCAAACAAGAACACGAGG	NM031982	1766-1852	87
NKCC1	GGGCCTCCTCACACGAAGAA TGAGGAGCCGAGGGTACTTCA	NM019229	2047-2138	91
KCC2	ACTACAGCTGGCCACCTCGC ATGCTGCCCTCAGAGAAACGC	NM134363	2507-2593	86
HPRT	TGGTGAAAAGGACCTCTCGAA TCAAGGGCATATCCAACAACA	NM012583	557-647	91

Supplementary Table 1: Primer sets for all genes of interest.

REFERENCES

- Anand, K.J. & Hickey, P.R. (1987) Pain and its effects in the human neonate and fetus. *N Engl J Med*, **317**, 1321-1329.
- Andrews, K. & Fitzgerald, M. (2002) Wound sensitivity as a measure of analgesic effects following surgery in human neonates and infants. *Pain*, **99**, 185-195.
- Breton, J.D., Poisbeau, P. & Darbon, P. (2009) Antinociceptive action of oxytocin involves inhibition of potassium channel currents in lamina II neurons of the rat spinal cord. *Mol Pain*, **5**, 63.
- Fitzgerald, M. (2005) The development of nociceptive circuits. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 507-520.
- Gazzo, G., Melchior, M., Caussaint, A., Giere, C., Lelievre, V. & Poisbeau, P. (2021) Overexpression of chloride importer NKCC1 contributes to the sensory-affective and sociability phenotype of rats following neonatal maternal separation. *Brain Behav Immun*, **92**, 193-202.
- Giere, C., Melchior, M., Dufour, A. & Poisbeau, P. (2021) Spinal integration of hot and cold nociceptive stimuli by wide-dynamic-range neurons in anesthetized adult rats. *Pain Rep*, **6**, e983.
- Han, Z.S., Zhang, E.T. & Craig, A.D. (1998) Nociceptive and thermoreceptive lamina I neurons are anatomically distinct. *Nat Neurosci*, **1**, 218-225.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C. & Joris, J. (1988) A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, **32**, 77-88.
- Hasbargen, T., Ahmed, M.M., Miranpuri, G., Li, L., Kahle, K.T., Resnick, D. & Sun, D. (2010) Role of NKCC1 and KCC2 in the development of chronic neuropathic pain following spinal cord injury. *Ann N Y Acad Sci*, **1198**, 168-172.
- Hu, S., Xiao, Y., Zhu, L., Li, L., Hu, C.Y., Jiang, X. & Xu, G.Y. (2013) Neonatal maternal deprivation sensitizes voltage-gated sodium channel currents in colon-specific dorsal root ganglion neurons in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **304**, G311-321.
- Juif, P.E., Breton, J.D., Rajalu, M., Charlet, A., Goumon, Y. & Poisbeau, P. (2013) Long-lasting spinal oxytocin analgesia is ensured by the stimulation of allopregnanolone synthesis which potentiates GABA(A) receptor-mediated synaptic inhibition. *J Neurosci*, **33**, 16617-16626.
- Juif, P.E., Salio, C., Zell, V., Melchior, M., Lacaud, A., Petit-Demouliere, N., Ferrini, F., Darbon, P., Hanesch, U., Anton, F., Merighi, A., Lelievre, V. & Poisbeau, P. (2016) Peripheral and central alterations affecting spinal nociceptive processing and pain at adulthood in rats exposed to neonatal maternal deprivation. *Eur J Neurosci*, **44**, 1952-1962.
- Kaila, K., Price, T.J., Payne, J.A., Puskarjov, M. & Voipio, J. (2014) Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*, **15**, 637-654.
- Khasabov, S.G., Cain, D.M., Thong, D., Mantyh, P.W. & Simone, D.A. (2001) Enhanced responses of spinal dorsal horn neurons to heat and cold stimuli following mild freeze injury to the skin. *J Neurophysiol*, **86**, 986-996.

- Lelievre, V., Hu, Z., Byun, J.Y., Ioffe, Y. & Waschek, J.A. (2002) Fibroblast growth factor-2 converts PACAP growth action on embryonic hindbrain precursors from stimulation to inhibition. *J Neurosci Res*, **67**, 566-573.
- Luis-Delgado, O.E., Barrot, M., Rodeau, J.L., Schott, G., Benbouzid, M., Poisbeau, P., Freund-Mercier, M.J. & Lasbennes, F. (2006) Calibrated forceps: a sensitive and reliable tool for pain and analgesia studies. *J Pain*, **7**, 32-39.
- Luo, J.L., Qin, H.Y., Wong, C.K., Tsang, S.Y., Huang, Y. & Bian, Z.X. (2011) Enhanced excitability and down-regulated voltage-gated potassium channels in colonic drg neurons from neonatal maternal separation rats. *J Pain*, **12**, 600-609.
- Melchior, M., Juif, P.E., Gazzo, G., Petit-Demouliere, N., Chavant, V., Lacaud, A., Goumon, Y., Charlet, A., Lelievre, V. & Poisbeau, P. (2018) Pharmacological rescue of nociceptive hypersensitivity and oxytocin analgesia impairment in a rat model of neonatal maternal separation. *Pain*, **159**, 2630-2640.
- Melchior, M., Kuhn, P. & Poisbeau, P. (2021) The burden of early life stress on the nociceptive system development and pain responses. *Eur J Neurosci*.
- Melzack, R. & Wall, P.D. (1965) Pain mechanisms: a new theory. *Science*, **150**, 971-979.
- Moloney, R.D., Stilling, R.M., Dinan, T.G. & Cryan, J.F. (2015) Early-life stress-induced visceral hypersensitivity and anxiety behavior is reversed by histone deacetylase inhibition. *Neurogastroenterol Motil*, **27**, 1831-1836.
- Price, T.J., Cervero, F. & de Koninck, Y. (2005) Role of cation-chloride-cotransporters (CCC) in pain and hyperalgesia. *Curr Top Med Chem*, **5**, 547-555.
- Ran, C., Hoon, M.A. & Chen, X. (2016) The coding of cutaneous temperature in the spinal cord. *Nat Neurosci*, **19**, 1201-1209.
- Schwaller, F. & Fitzgerald, M. (2014) The consequences of pain in early life: injury-induced plasticity in developing pain pathways. *Eur J Neurosci*, **39**, 344-352.
- Slater, R., Fabrizi, L., Worley, A., Meek, J., Boyd, S. & Fitzgerald, M. (2010) Premature infants display increased noxious-evoked neuronal activity in the brain compared to healthy age-matched term-born infants. *Neuroimage*, **52**, 583-589.
- Taddio, A. & Katz, J. (2005) The effects of early pain experience in neonates on pain responses in infancy and childhood. *Paediatr Drugs*, **7**, 245-257.
- Todd, A.J. (2010) Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci*, **11**, 823-836.

C. Article 3 : Entre Scylla et Charybdis : Une procédure de conditionnement sensori-affective de double aversion pour évaluer les aspects multidimensionnels de la douleur chez le rat

Introduction : La réponse comportementale à la douleur est complexe et met en jeu de nombreuses structures cérébrales (« pain matrix ») qui déterminent l'expression sensori-discriminative (i.e intensité, localisation) de celles-ci, mais également modulent l'état émotionnel et cognitif. L'évaluation préclinique des symptômes douloureux, physiologiques ou pathologiques, s'appuie principalement sur la mesure de reflexes nociceptifs. Cette réponse comportementale est révélatrice de la composante sensori-discriminative de la douleur mais ne donne pas de renseignement sur l'état émotionnel et cognitif. Afin de prendre en compte l'intégration supraspinale de l'expérience douloureuse, l'utilisation de tests de préférence de place permet de prendre en compte les composantes menant à une prise de décision et un comportement motivé des animaux face à un environnement aversif. Ce travail est une tentative pour proposer d'utiliser un nouveau test comportemental où les animaux sont libres de leurs mouvements et doivent faire un choix entre l'aversion causée par un compartiment éclairé et une stimulation thermique nociceptive. La répétition de ce test une heure après une première exposition permet également d'évaluer la composante cognitive (i.e mémorisation/conditionnement).

Résultats principaux : La procédure de test, d'une durée totale de 2 x 1 heure (par groupe de 4 rats), a permis de mesurer les comportements nociceptifs et d'adaptation des animaux tout en identifiant l'influence de l'état émotionnel sur ces comportements. Cette caractérisation a été effectuée dans différentes conditions expérimentales : animaux naïfs ou expriment des symptômes douloureux en réponse à une lésion périphérique associée à une inflammation ou à une lésion nerveuse. Après avoir caractérisé le comportement général des rats naïfs dans les différentes phases de test (comportements d'adaptation, nociceptif, émotionnel, aversif, conditionnement ...) nous avons pu confirmer certains de ces comportements en les supprimant à l'aide d'anxiolytiques (e.g. diazepam, etifoxine). Par ailleurs, nous avons pu montrer la perte de comportement adaptatif chez les rats douloureux (inflammatoires ou neuropathiques), exposés à des stimulations nociceptives chaudes. Ceci a également montré la dépendance de ces troubles du comportement adaptatif vis-à-vis des symptômes sensoriels (e.g. allodynie au chaud ou au froid).

Contribution de l'auteur : j'ai effectué une grande partie des tests comportementaux ainsi que leur analyse chez i) une partie des animaux naïfs ii) les animaux ETX et DZP iii) les animaux neuropathiques cuff.

Note : cet article est en préparation

Between Scylla and Charybdis: A sensory-affective double avoidance conditioning procedure (SADAC) to assess the multidimensional aspects of pain behaviors in rats

Authors :

Clémence Gieré^{1,2}, Andréa Caussaint², Yannick Menger¹, Géraldine Gazzo^{1,2*}, Pierrick Poisbeau^{1*}

(*) These authors equally contributed

Affiliation :

¹ Centre National de la recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Strasbourg France

² Université de Strasbourg, Ecole Universitaire de Recherche Interdisciplinaire sur la Douleur, Strasbourg, France

***Corresponding author :**

Prof. Pierrick Poisbeau, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI - CNRS UPR 3212), 8 Allée du général Rouvillois, 67000 Strasbourg
Tel : 03 88 45 67 27 / email : poisbeau@unistra.fr

Acknowledgment :

We thank the Ugo-Basile team in France and Italy for their kind help in modifying/optimizing the apparatus. We also thank all staff members of the Chronobiotron facility who contributed to the animal care. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and Université de Strasbourg. GG was a fellow from the French Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur at the time of the study. We also thank the following research programs of excellence for their support: FHU Neurogenycs, French National Research Agency (ANR) through the Programme d'Avenir (contract ANR-17-EURE-0022, EURIDOL Graduate School of Pain).

ABSTRACT

While animal pain models are largely used to study the mechanisms underlying a number of pathologies, behavioral testing often only relies on nociceptive reflexes and fail to account for the cognitive and affective components of pain. We introduce here a new behavioral test that relies on the conflict between a thermal nociceptive compartment and an aversive brightly lit compartment. After a 5 minutes period of exploration between a dark and lit compartment where the floor temperature is set at 25°C, a heating or cooling ramp is applied in the dark compartment. Latency to first nociceptive reflex, latency to escape and time spent in each compartment is measured. This test allows to measure the nociceptive threshold like classic hot or cold plate do, as well as the adaptative escape behavior of freely moving animals. The test is reiterated an hour later in order to assess conditioning. This test also allows to evaluate the cognitive and affective impairment induced by anxiolytic treatments or animals models of inflammatory and neuropathic pain.

Keywords

Pain ; Nociception ; Sensori-affective behavior ; Escapable place preference ; Conditioning ; Thermal place preference

INTRODUCTION

Pain is defined by the International Association for the Study of Pain (IASP) as “an unpleasant sensory and emotional experience associated with, or resembling that associated with, actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage” (Raja *et al.*, 2020). Several components of pain are commonly distinguished : (i) a sensori-discriminative nociceptive component, the most straightforward, which refers to the coding of the noxious message (quality, duration, localization, intensity); (ii) the affective aspect underlies the unpleasantness of the pain experience, which can lead to anxiodepressive comorbidities ; (iii) the cognitive component refers to the significance given to the pain experience and its memorization ; finally, (iv) the behavioral aspect of pain underlies the motor (including unconscious autonomic regulations) and verbal expression associated with the experience of pain (Bushnell *et al.*, 2013; Wilcox *et al.*, 2015; Talbot *et al.*, 2019).

The study of pain and its underlying mechanisms is of utmost importance in order to enable the elaboration of new analgesic treatments and in the case of particularly pathologic pain which is an increasing burden worldwide and the origin of more than half of medical consultations in Europe and the United States of America (SFETD, 2017). A plethora of animal models, ranging from inflammatory sensitization to neuropathic pain (Colleoni & Sacerdote, 2010; Gregory *et al.*, 2013; Yalcin *et al.*, 2014), have emerged over time and proven effective to further our knowledge in the apparition and maintenance of pain symptoms. However, assessment of pain symptoms in animal models still mainly relies on reflex-based nociceptive tests (Barrot, 2012). These tests translate the sensori-discriminative component of pain through the measure of the threshold eliciting an avoidance response to a noxious stimulus. Although some tests have been developed to try and evaluate a more integrated concept of pain in animal such as the Conditioning Placement Preference or other related operant paradigms (Mauderli *et al.*, 2000; LaBuda & Fuchs, 2001; Baliki *et al.*, 2005; Navratilova *et al.*, 2013), classic nociceptive tests still mainly rely on reflex responses and do not enable the evaluation pain in all its components. Moreover, most of the reflexes studied such as tail flicks or paw withdrawal have been shown to be exhibited in decerebrated animals (Matthies & Franklin, 1992) and hardly translate the supraspinal integrated responses associated with pain proper. It is also of notes that the nociceptive threshold varies depending on the test used (Baliki *et al.*, 2005).

Yet, the other components of pain are strongly entangled in our current society; chronic pain negatively affects the clinical burden of patients (Fields, 1999). These comorbidities can be evaluated separately in animals using specific behavioral testing [see review by (Kremer *et al.*, 2021)], but are currently under investigated in pain laboratories, which mostly focus on pain thresholds and nociceptive reflexes.

The aim of this work was to elaborate a testing procedure (SADAC: sensory-affective Double Avoidance Conditioning test) capable of providing measures of nociceptive threshold and adaptative (affective and cognitive) behaviors in freely moving rats. This procedure stems on avoidance behaviors of rats to bright light or to a potentially painful thermal hot/cold stimulation. This procedure has been applied to naïve animals, animals treated with anxiolytics compounds, and to animals exhibiting inflammatory and neuropathic pain symptoms.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Adult Wistar rats (Charles River, Saint Germain Nuelles, France) aged 6-8 weeks were used for this study. Animals were housed in a temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity ($50 \pm 10\%$) controlled room under a 12 h light-dark cycle (lights on at 7:00am), with *ad libitum* access to food and tap water. Both males and females were used for this study, housed in collective cages according to sex. All procedures were conducted in accordance with EU regulations and approved by the regional ethical committee (authorization number 2019071018511286 v5).

Sensory-affective double avoidance test

In this study, we used an escapable pain testing procedure performed in a light/dark box arena, well known for the assessment of anxiety-like symptoms (preference for the dark compartment). To do so, a thermal place preference apparatus (Ugo-Basile, Italy), made of two Plexiglas cylinders (h: 25.5cm, diameter: 20 cm), placed on separated temperature-controlled floors, was modified to create a “dark” compartment by means of a transparent dark red plastic film. Because Wistar rats cannot see in the red, the “dark” cylinder compartment allowed to perform a video monitoring as well as to score rat behaviors at any time of the testing procedure (**Figure 1A**). The light in the other compartment was set at twice the intensity recommended for evaluating anxiety-like symptoms in order to create a truly aversive environment (120 lux). The 10-minute procedure consists in a 5 minute habituation period with both floor temperatures are set at 25°C (close to room temperature), followed by a thermal stimulation in the dark compartment, with ramp going from 25°C to 52°C (for hot) and from 25°C to 0°C (for cold). Both compartments are accessible at all times of the test.

By heating the floor from room temperature (25°C) to noxious hot (52°C) in the dark compartment at a heating speed of $7^\circ\text{C}/\text{min}$, animals have to solve a conflict between their aversion to the lit compartment and the motivation to escape the noxious hot stimulation in the dark compartment. A temperature of 42°C was reached after 2 minutes of heating (i.e. minute 7 to 8). The dark compartment floor reached a temperature of 52°C at 9 minutes (i.e. after 4 minutes of heating). A priori cutoff was

set at 30 seconds during the last minute of the test if animals remained in the 52°C-floor dark compartment, but was never reached in the present study. At the time of testing, animals are placed in the dark compartment, and their behavior is manually monitored during 10 minutes and video-recorded. An hour after the first exposition to the test, the procedure is repeated in a second session to assess conditioning.

For cold testing, the test had to be modified, as the device could not reach cold temperatures as fast as hot temperatures. Cooling started after the 5th minute, until the 18th minute to reach 0°C. A temperature of 15°C, possibly nociceptive based on the literature, was reached around the 10th minute. This corresponded to the cooling speed of 2°C/min.

Model of inflammatory sensitization

Animals were anesthetized with 3 % isoflurane (Ventoflurane[®], Vibrac, France) pushed by compressed air (700 mL / min). 100 µL of complete Freund's adjuvant (CFA, Merck, USA) was then injected into the plantar surface of both hindpaws. Animals were exposed to the SADAC 24 h after CFA injection, in order to be outside of the acute inflammatory phase, which peaks 7 h after injection. Control animals received no intraplantar injection.

Model of neuropathic pain

Animals were anesthetized with 4% isoflurane (Ventoflurane[®], Vibrac, France) pushed by compressed air (700 mL / min). An incision was made to expose the right sciatic nerve of the animals and a polyethylene cuff (1-mm-long splitted section; ID = 0.86 mm, OD = 1.27 mm; PE-90, Harvard Apparatus, Les Ulis, France) was placed around it. The skin was then closed with a nylon suture (Ethilon 4-0, Ethicon, USA). Control rats underwent the same procedure without the cuff implantation.

Pharmacological treatments

Diazepam (TVM, CENTRAVET, Nancy) was diluted in NaCl 0.9 % to reach a dose of 1 mg/kg and injected subcutaneously (s.c.) at a final volume of 20µL with a Hamilton syringe 20 minutes prior to the SADA procedure. Etifoxine (EFX; 2-ethylamino-6-chloro-4-methyl-4-phenyl-4H-3,1-benzoxazine hydrochloride) was kindly provided by Biocodex laboratories (Biocodex, Gentilly, France, batch n°562). EFX was prepared in NaCl 0.9 % containing 1 % Tween 80 (v/v; Merck, France) after dissolution in 1.5 % ethanol. EFX solution was administered intraperitoneally (i.p.; volume 0.5 mL/100 g) at a dose of 50 mg/kg once per day, for two days prior to the day of testing. The third and last injection was done 20 minutes prior to the SADA procedure. Control animals received an equivalent i.p. volume of NaCl 0.9 %.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard error of the mean. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 6 software (La Jolla, CA, USA). After verifying the linear distribution of the data, we used parametric (two way ANOVA, group x time, Kolmogorov-Smirnov) or non-parametric (Mann-Whitney, Wilcoxon t test) statistical tests.. A p value below 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

General behavior of adult Wistar rats in the SADAC test

Figure 1A illustrates the time spent in the dark compartment of control Wistar (n=32) rats during 2 consecutive sessions of the SADAC. Overall, during the first 5 minutes, rats spent most of their time in the “dark” compartment (i.e. cylinder with dark red filter, **Figure 1A₁**), as expected. As soon as the heat ramp started (after the 5th minute), they progressively left this dark compartment when floor temperature increased to a maximum value of 52°C (**Figure 1A₂**).

If the general behavior is similar for both sessions, there is significant differences in the place preference of the animals (two-way ANOVA, group x time, $F_{(9,558)}=2.097$, $p=0.0281$). In comparison with the habituation period during session 1 (before the conditioning), rats spend less time in the dark compartment after conditioning (i.e. in session 2; **Figure 1A₂**). A similar phenomenon is observed at the beginning of the heating ramp before and after it reaches nociceptive. Using the temperature of definitive escape from the dark compartment, we have also plotted the distribution of the rat population present in the dark compartment during SADAC. In agreement with the analysis of time spent in the dark compartment, rats are escaping earlier from the dark compartment during session 2 and this is well described by the temperature of “half-escape” which diminish from about 46°C to 39°C, for session 1 and 2 respectively (**Figure 1B**; Kolmogorov-Smirnov, KS: $D=0.7146$; $p<0.0001$). In this primary characterization, no differences between male (n = 8) and female rats (n = 8) were observed (**Supplementary Figure 1**). This led us to pool all rats for the follow-up characterization.

Keys values and threshold are summarized in **Table 1**.

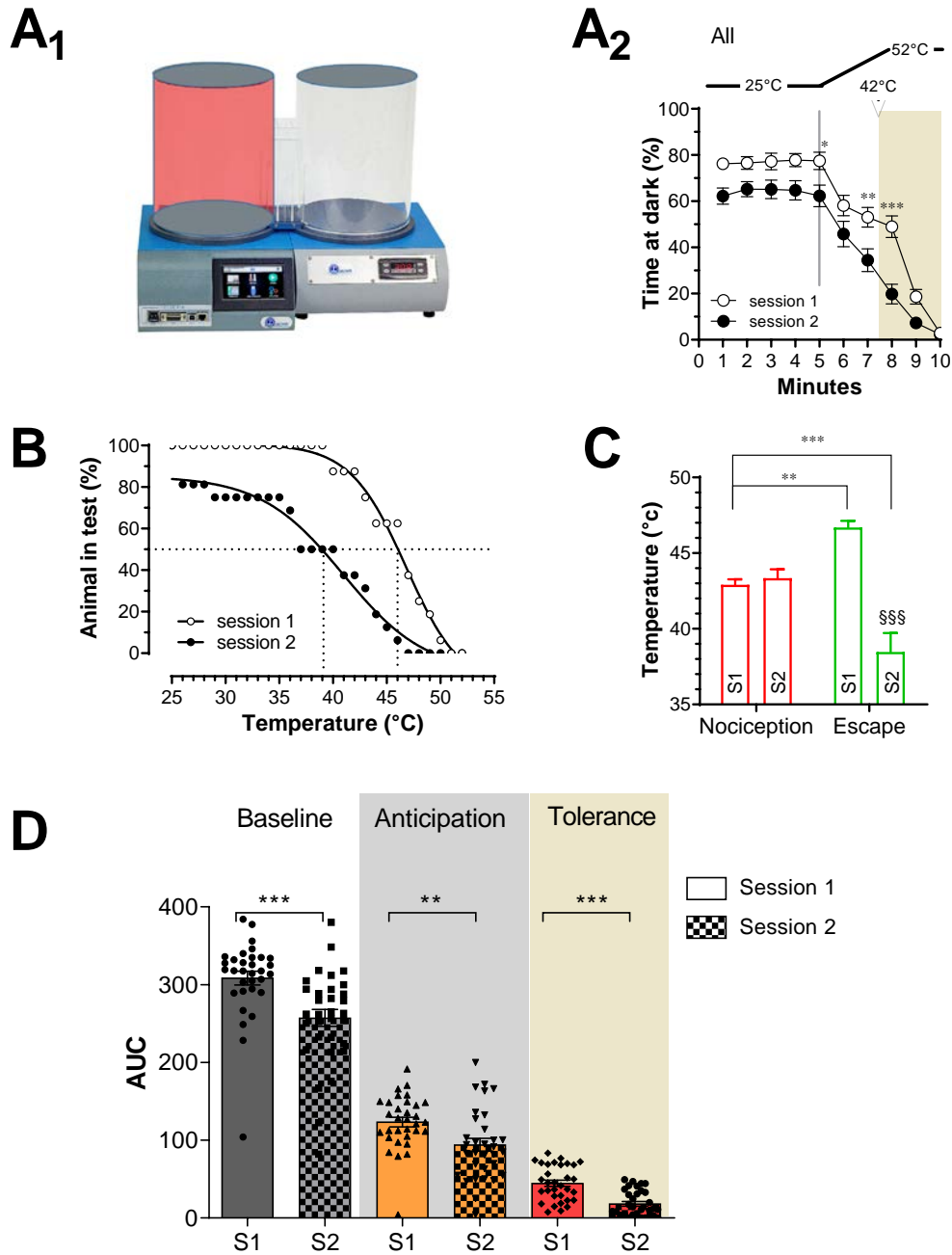


Figure 1: General behavior of naïve rats in the SADAC testing procedure

Animals are placed the SADAC device (A₁) and tested for 10 minutes per session. The second session is set one hour after the first. During the second session (A₂), rats spend less time in the dark compartment from the 5th to the 7th minute. Statistical test: two-way ANOVA, group x time, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (B) Survival curve representing the percentage of animals present in the dark compartment in relation to the temperature of the floor. “Half escape” temperatures are represented in dotted lines. (C) Nociceptive and escape threshold during both session. Statistical test: two way ANOVA, group x time, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, \$\$\$ $p < 0.001$. (D) Histograms representing the areas under the curves of the time spend in the dark compartment in the three phases of the test during both sessions. Statistical test: two-way ANOVA, group x time, (***) $p < 0.001$; (**) $p < 0.01$, (*) $p < 0.05$.

As seen in **Figure A₂**, animals remained mostly in the dark heated compartment before and after reaching the nociceptive threshold values. This interesting feature allowed us to measure the appearance of nociceptive behaviors, when the rats did stay in the compartment, before their definitive escape. The mean threshold to observe a nociceptive behavior and a definitive escape from the “dark” heated compartment are given in **Figure 1C and Table 1**. The mean threshold to observe a nociceptive behavior was similar between both sessions. (Session 1= 43.0 ± 0.4 °C; Session 2= 43.3 ± 0.2 °C, two-way ANOVA, $p=0.9969$). The average temperature threshold to observe a definitive escape behavior is clearly different between the two sessions (as also seen with the half escape values). This average temperature, extracted from the behavior of each rat, was of 46.8 ± 0.4 °C ($n = 32$) during session 1 whereas it was significantly reduced to 38.5 ± 1.3 °C ($n = 32$) in session 2 (two-way ANOVA, $p<0.0001$). As mentioned above, the average values could only be taken from the rats who were present in the dark compartment and this number is lower during session 2 because of the conditioning. In our experimental conditions, the subpopulation of rats expressing a nociceptive reflex in the dark compartment was of 88% (14/16) and of 38% (6/16) for session 1 and 2, respectively.

In an attempt to extract a conceptual analysis of the different phases of SADAC, we have divided the test in three distinct parts: (1) the baseline period (BL), from minute 0 to 5 when the animals explore freely the two compartments with the same floor temperature; (2) the anticipation period, (from minute 5 to 7) when the heating ramp has started but has not reached nociceptive temperature threshold of 42°C (AT) and; (3) the tolerance period (from minute 8 to 10), when the floor temperature is above 42°C (TL) (**Figure 1D**). We have next calculated the area-under-the-curve (AUC) of time spent in the dark compartment for both sessions (session 1 and 2) and performed a Two way ANOVA (AUC per session x period). This statistical analysis is highly significant ($F_{(5,5155)}=312.9$, $p<0.0001$) and intra-period post-hoc comparisons (between sessions) show at each period of time a significant reduction in AUC for the time spent in the dark compartment during baseline, anticipation and tolerance periods.

Sensitivity of the place preference behavior to anxiolytics

In the next set of experiments, we characterized the effects of two anxiolytics, having different pharmacological profile and consequences on affective/cognitive functions, on the different behavioral parameters measured in the SADAC test. Results shown in **Figure 2** illustrate the general behavior of rats, 20 minutes after the injection of the classical benzodiazepine diazepam (DZP) or the non-benzodiazepine anxiolytic etifoxine (ETX).

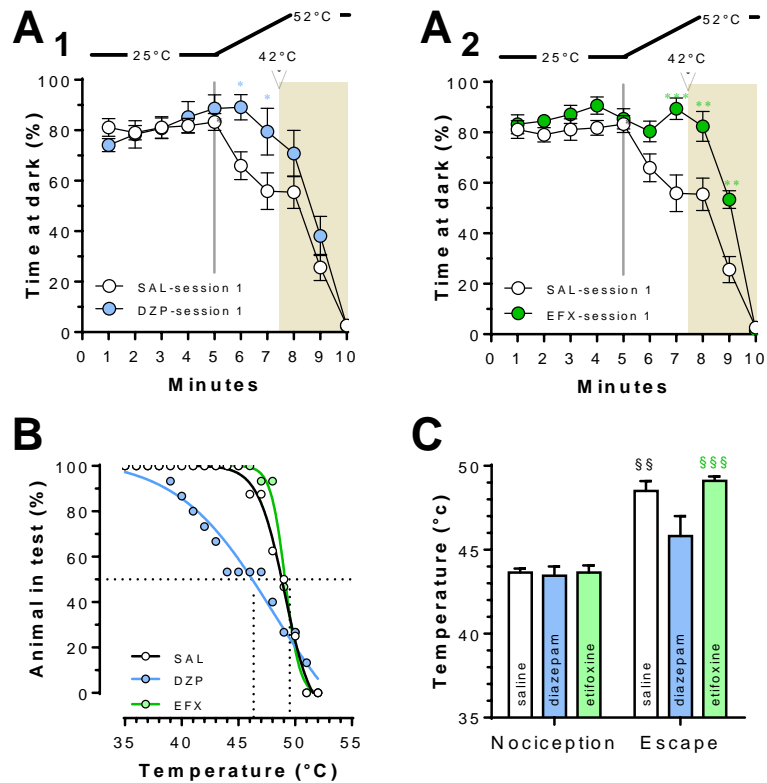


Figure 2: Effect of anxiolytic treatment during the first session

(A₁) General behaviour of saline-injected (SAL) and diazepam-injected (DZP) rats during the first session. (A₂) General behaviour of SAL and etifoxin-injected (ETX) rats during the first session. Statistical test: two-way ANOVA treatment x time, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (B) Survival curves of the time spent in dark during the first session. "Half escape" temperatures are represented in dotted lines. (C) Nociceptive and escape threshold during both session. Statistical test: two way ANOVA, group x time, \$\$ $p < 0.01$, \$\$\$ $p < 0.001$

As seen in **panels A₁-A₂ of figure 2**, DZP and EFX change significantly the escape behavior of the animal exposed to SADAC (two-way ANOVA for DZP: $F_{(9,720)} = 2.101$; $p = 0.0297$ and for EFX: $F_{(9,261)} = 4.410$; $p < 0.0001$).

While no differences are seen for the baseline period between saline-injected animals and anxiolytic-injected animals, DZP and EFX groups display distinct behaviors during the heating ramp period. DZP rats spent significantly more time in the dark compartment during the anticipation period (see minutes 6 and 7). When the temperature reached the nociceptive threshold, both saline and DZP animals resumed a behavior similar as previously described. Comparatively, EFX-treated rats stayed longer in the dark compartment before (minute 7) and after the temperature threshold of 42°C (minutes 8 and 9) (**Figure 2B, Table 1**).

While considering the cumulative distribution of the rat population in the dark compartment (**Figure 2B**), and despite a visual difference in the shape of the distribution between DZP- and EFX treated groups, we failed to reveal a difference using the Kolmogorov-Smirnov test (Saline- vs. DZP-injected group: KS D = 0.2857, $p = 0.2032$; Saline- vs. EFX-injected group: KS D = 0.9971). As seen in **Figure 2C and Table 1**, mean temperature thresholds to observe the first nociceptive behavior do not seem to be affected by the anxiolytics treatments. This is not the case for the mean escape temperature threshold, which is significantly lower only in the DZP group

Overall, anxiolytics do not seem to affect nociceptive thresholds but does affect the place preference behavior while being exposed to a nociceptive but escapable hot environment.

Anxiolytic effect on the conditioning procedure

As seen in **Table 1**, mean temperature threshold to observe a nociceptive behavior, for session 1 and session 2, was similar for control (not injected) and saline-injected rats. Similarly, to the control group, escape temperature threshold in saline-injected rats decreased significantly from 48.5 ± 0.6 °C in session 1 to 41.2 ± 2.4 °C in session 2 (Wilcoxon t test, $P=0.0078$). This confirms the efficacy of the conditioning procedure to reduce the time to escape the dark compartment associated with the noxious hot stimulation, translated by a reduction in the time spent in the dark compartment and the half-escape threshold (**Figure 3A**, from 49.1 °C to 43.7 °C, Mann Whitney, $U=173$, $p=0.0008$). This is also well shown by the AUC of the time spent in dark during the baseline (Wilcoxon t test BL $p=0.0013$), the anticipation (Wilcoxon t test AT $p=0.0934$) and the tolerance periods (Wilcoxon t test TL $p=0.0004$) (**Figure 3A₃**).

Interestingly, DZP injection prevents conditioning as we find no difference of behavior between the first and second session (**Figure 3B, Table 1**) for: i) the time spent at dark (two-way ANOVA, $F_{(9,252)}=0.7061$, $p=0.7031$), ii) the temperature of half-escape (Session 1: 49.1 °C; Session 2: 47.3 °C; Mann Whitney, $U=282$, $P=0.0662$) or iii) the AUC of time spent in dark (Wilcoxon t test, BL $p=0.9399$, AT $p=0.2293$, TL $p=0.3591$). Compared to DZP, EFX preserves the conditioning. EFX-treatment still delayed the escape behavior as seen by the significant reduction of the total time spent in dark compartment (two-way ANOVA, $F_{(9,252)}=5.527$, $p<0.0001$), a reduction of the escape temperature threshold (49.1 °C to 45.7 °C; Mann Whitney, $U=181.5$, $P=0.0001$) and the reduction in the AUC during the tolerance period (Wilcoxon t test, BL $p=0.6685$, AT $p=0.1924$, TL $p=0.0002$).

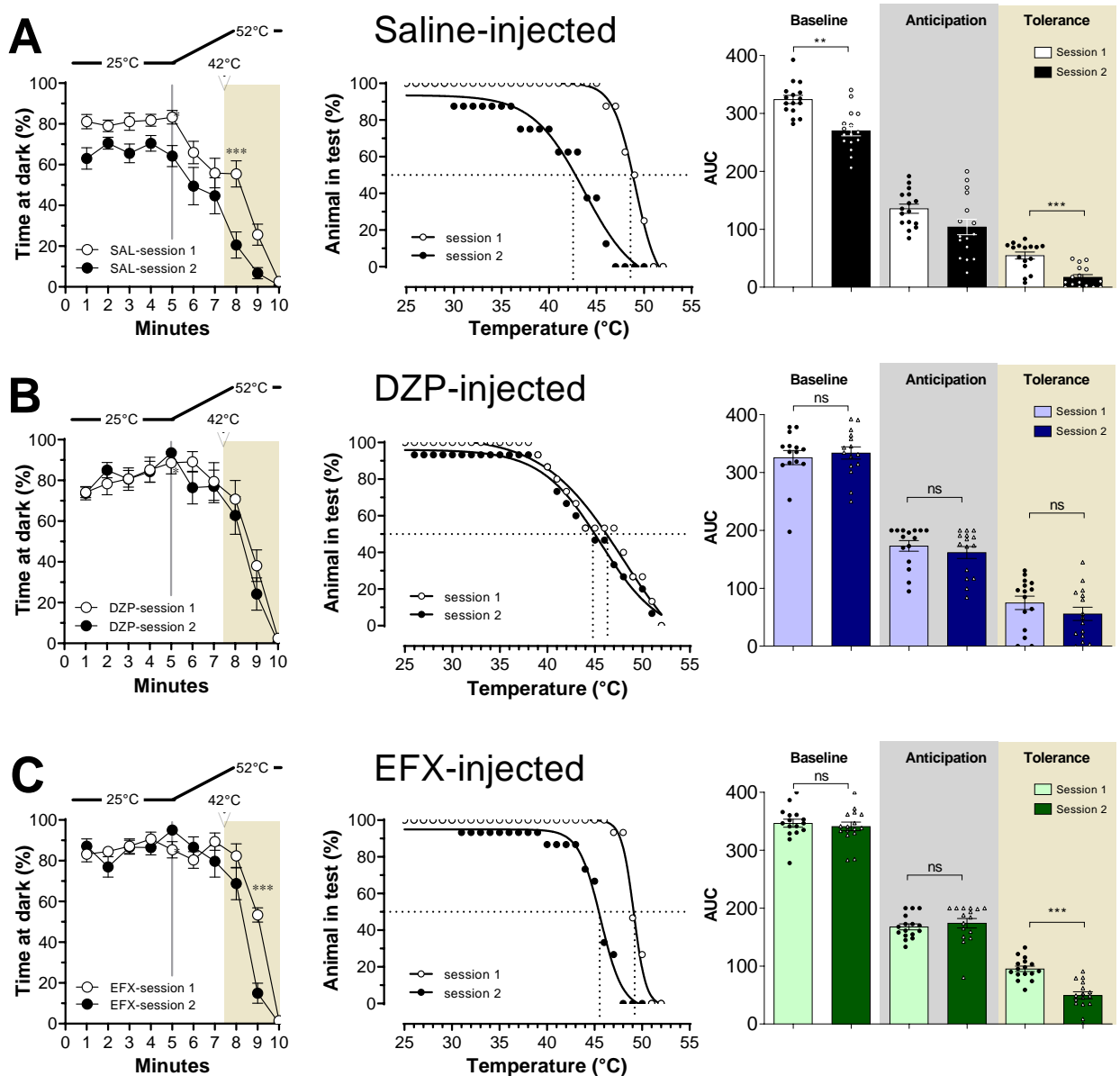


Figure 3: Effect of anxiolytic treatment on heat conditioning

Time spend in dark, survival curve and area under the curve of time spend in dark of SAL (A), DZP (B) and EFX (C) animals during the first and second session. Statistical test: two-way ANOVA group x time, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

In summary, DZP and EFX treatment strongly affects the behavior of rats in SADAC test. Anxiolytics reduced the time spent in the dark compartment because of its association with the noxious hot stimulation. The anticipated escape behavior during the second session is also impaired. Interestingly, EFX treatment do not affect the escape behavior contrary to DZP.

Influence of inflammatory pain on behaviors, place conditioning and temperature thresholds for heat

We then measured the impact of a painful inflammation induced by a unilateral intraplantar CFA injection (**Figure 4, Table 1**). As previously described, animal that received an intraplantar saline injection behaved similarly to control and other saline-injected animals. During session 2, the time spent in the dark compartment is significantly reduced (two-way ANOVA, $F_{(9,252)}=2.403$, $p=0.0125$) as is half-escape temperature (Session 1, 47.6°C; Session 2= 42.9°C; Mann Whintey, $U=173$, $p=0.0008$). No differences are seen for the first nociceptive behavior temperature threshold (**Supplementary figure 2**; S1: 43.0 ± 0.7 °C, S2: 43.1 ± 0.7 °C; Wilcoxon t test, $p=0.8125$) but there is a decrease in the temperature of escape (S1: 46.2 ± 1.0 °C, S2: 37.9 ± 2.0 °C, Wilcoxon t test, $p=0.0034$). In the second session, conditioning was also effective in the baseline and anticipation period of the test (Wilcoxon t test, BL $p=0.0017$; AT $p=0.0021$). Indeed, in the second session, 19% of animals left the dark compartment before the heat ramp even started and 46% of the remaining animals left before the heat reached nociceptive levels.

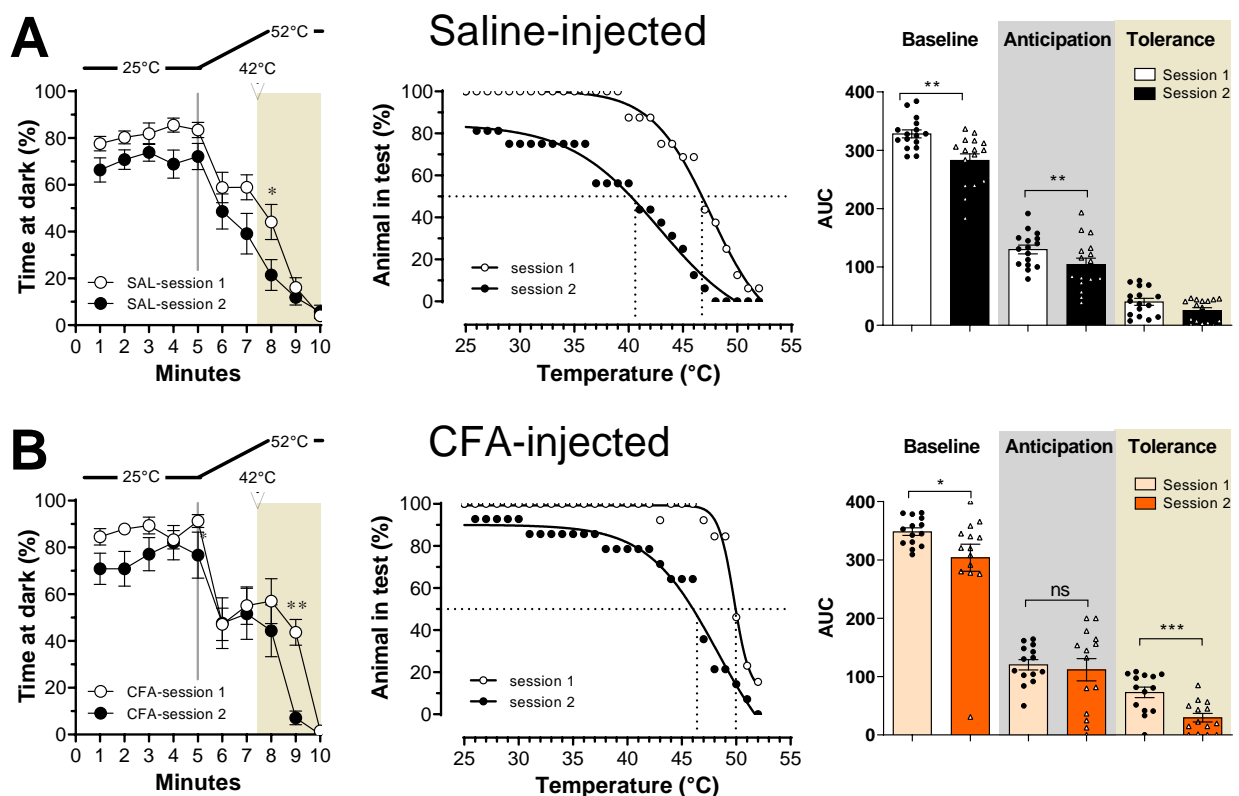


Figure 4: Impact of inflammation on the SADAC testing procedure

Time spend in dark, survival curve and area under the curve of time spend in dark of SAL (A) and CFA (B) animals during the first and second session. Statistical test: two-way ANOVA group x time, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

As expected, CFA animals exhibit lower nociceptive thresholds compared to saline animals (**Supplementary Figure 2**, Session 1; CFA=34.4 ± 1.3 °C; Saline=43.0 ± 0.7 °C; Mann Whitney, U=6.000, p>0.0001). Interestingly, conditioning in CFA-injected rats was only partial. More precisely, CFA-injected animals show a significant reduction in AUC during the baseline period (Wilcoxon t test, BL p=0.0308) and the escape period (Wilcoxon t test, ES p=0.0002), but not during the anticipation period (Wilcoxon t test, AT p=0.7148).

Influence of neuropathic pain on behaviors, place conditioning and temperature thresholds for heat

We next tested rats expressing neuropathic pain symptoms because of a chronic sciatic nerve constriction injury (cuff group). The control group consisted a sham surgery. Sham rats spent less time in the dark compartment during the second session, once the temperatures had reached 42°C (**Figure 5A**; two-way ANOVA $F_{(9,270)}=1.004$, p=0.0188). A strong reduction in the half escape temperature is also seen (S1: 47.7°C; S2= 38.4°C; Mann Whitney, U=227.5, p=0.0053) demonstrating that conditioning is effective. It is to be noted that this conditioning is only partial as baseline and anticipation do not differ between the first and second session (Wilcoxon t test, BL p=0.8438, AT p=0.8125). A significant reduction is, however, seen while analyzing the AUC for the tolerance period (Wilcoxon t test, TL P=0.0234).

Compare to sham animals, time spent in the dark compartment in cuffed animals during session 1 and session 2 is similar (**Figure 5B**). However, the survival curves shows slight differences in escape behavior. If the half-escape temperature does lower between the two session (S1=48.9°C; S2=45.7°C; Mann Whitney, U=106.5, p=0.0001), neuropathic pain blunted the effect of conditioning in all periods of the test (Wilcoxon t test on AUC, BL p=0.1094, AT p=0.6406, TL p=0.0547) where animals spent as much time in the dark compartment compared to the first session.

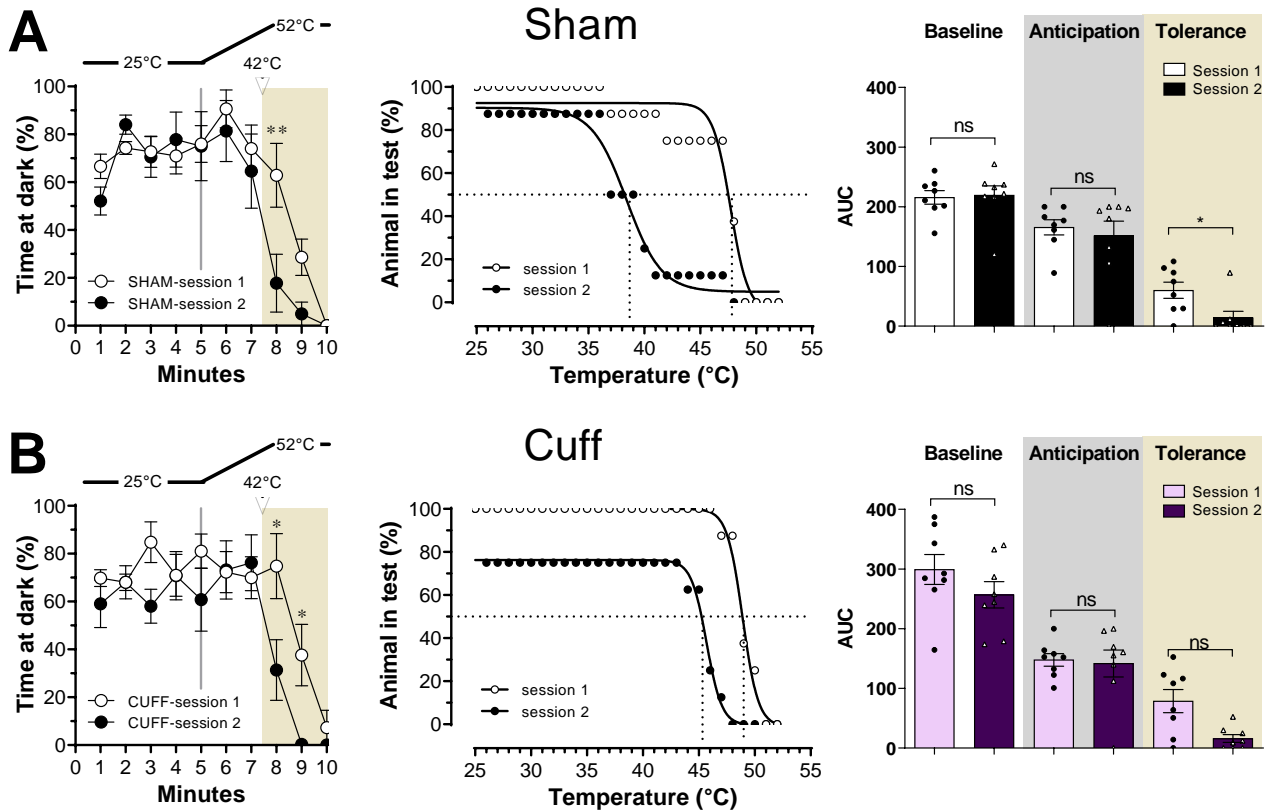


Figure 5: Impact of a neuropathy on the SADAC testing procedure with a heat ramp

Time spend in dark, survival curve and area under the curve of time spend in dark of sham (A) and Cuff (B) animals during the first and second session. Statistical test: two-way ANOVA group x time, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Behavioral responses of neuropathic rats to SADAC using cold temperatures

While nociceptive tests using heat are widely used, ranging from hot water (tail flick test), to radiant heat (Hargreaves' test) as well as static or dynamic hot plate, sensibility to cold is much harder to qualify and more rarely used. It is even more interesting in the case of neuropathic pain as cold allodynia/hyperalgesia is often observed. In that context, we have adapted the SADAC test in order to test "cuffed" rats with a cooling ramp instead of a heating one. Key values and thresholds are summarized in **Table 2**.

During the first 10 minutes of the first session, sham-operated animals mostly remained (about 80% of the animals) in the dark compartment even after the start of the cooling ramp at the 5th minute. When the temperature reached nociceptive levels (15°C), rats progressively left the cold compartment until none of them remained when it reached 0°C at the 18th minute (**Figure 5A**). During the second session, if animals remained in the dark compartment during the baseline period, they quickly and

consistently escaped when the cooling began (**Figure 6A**, two way ANOVA, $F_{(17,238)}=1.770$, $P=0.0327$). In agreement, there is a shift in temperatures of half escape during the first (8.2°C) and the second (13.7°C) session demonstrating an effective conditioning by cold (Mann Whitney, $U=206.5$, $p=0.0018$). As seen by the AUC analysis, it appears that cold conditioning mostly affects the sham group of rats during the anticipation (Wilcoxon t test, $p=0.0313$) and the tolerance period ($p=0.0313$) of the test but not during the baseline ($p=0.3750$).

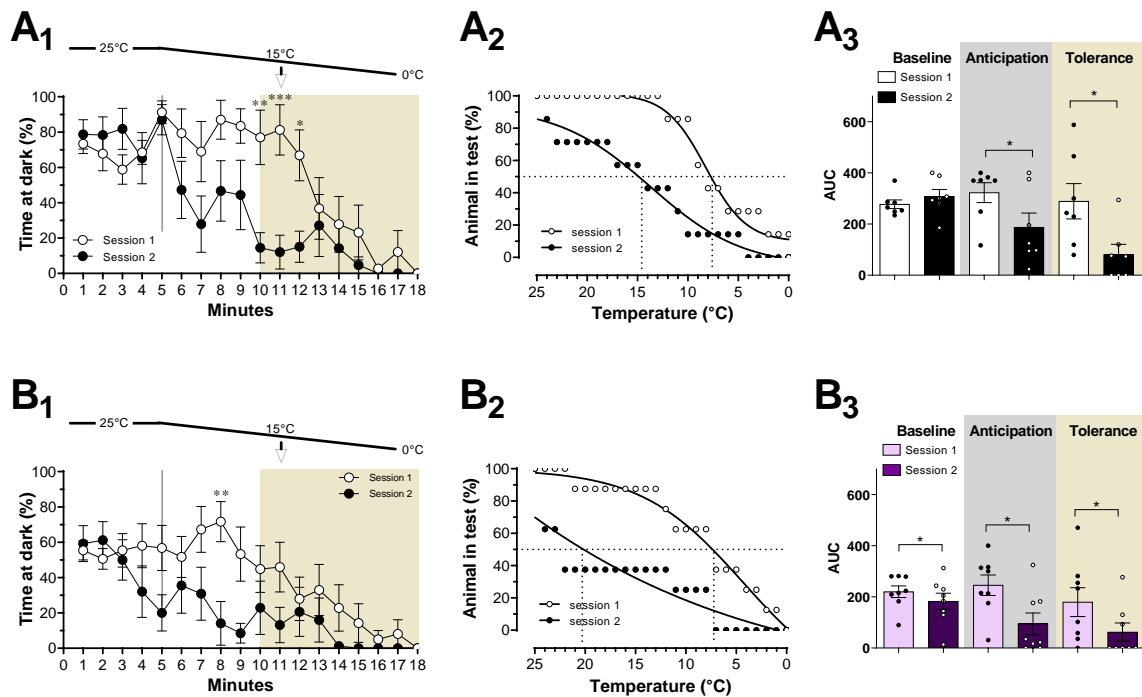


Figure 6: Impact of a neuropathy on the SADAC testing procedure with a cold ramp

Time spend in dark, survival curve and area under the curve of time spend in dark of sham (A) and Cuff (B) animals during the first and second session. Statistical test: two-way ANOVA group x time, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Cuff animals tended to spend less time in the dark compartment than sham even before the cooling ramp (80% for sham vs 60% for cuff). When the cooling began, they progressively left the dark cold compartment similarly to sham animals. During the second session, an effective cold-conditioning can be observed as cuff animals left the cold dark compartment significantly faster (two way ANOVA, $F_{(17,238)}=1.770$, $P=0.0327$). An increased temperature of half escape is also seen (Session 1 \approx 7°C; Session 2 \approx 20°C). Cold conditioning is very effective on the anticipation (Wilcoxon t test $p=0.0156$) and escape ($p=0.0313$) as well as the baseline in the second session ($p=0.0391$), suggesting a higher sensibility to cold in cuffed animals.

The cold conditioning paradigm of the SADAC renders difficult to estimate the threshold for nociceptive behavior, as very few animal tend to stay in the dark cold compartment (**Table 2**). With these low number, cuff animals tend to have a higher threshold to cold temperatures (i.e more sensitive) compared to sham-operated rats (sham: 12.6 ± 0.8 °C, cuff: 15.4 ± 1.9 °C) although the difference did not reach a statistical difference (Mann Whitney, $U=12$, $P=0.6494$).

DISCUSSION

While pain is a multidimensional, complex integrated process, most preclinical studies only focus on the sensori-discriminative pain of the experience (i.e nociception). It is indeed a challenge to take in account the affective and cognitive component of pain in non-verbal animals who have no way of expressing their subjective pain in a measurable or quantifiable way. As such, researchers have tried to come up with paradigms going beyond the mere sensory element of nociception (Navratilova *et al.*, 2013). While many of those new approaches are based on operant behaviour, wherein animals have to be trained to complete a task before being tested, we propose here a test that do not require previous training or habituation and can be used in naïve animals.

In controls animals, we therefore are able to distinguish two thresholds: the temperature that elicits the first nociceptive reflex, similar to a classic hot or cold plate test, and the temperature prompting the animal to leave the compartment for good. It highlights the separation between a nociceptive reflex and the conscious decision to escape an aversive situation, as previously hinted at in the literature (LaBuda & Fuchs, 2001). This test also provides the opportunities to measure the effectiveness of thermal conditioning as it can be repeated an hour after the first session. After the first session, rats spent less time in the nociceptive compartment both before (baseline) the heating ramp starts, before it reaches nociceptive levels (anticipation) and after the noxious threshold is reached (tolerance), leading to an overall decrease of the escape threshold, but not the nociceptive one (granted only few animals remained long enough to exhibit such a reflex).

The use of anxiolytics however blunts this conditioning. If nociceptive thresholds are not affected, the escape thresholds and time spent in the dark compartment are altered in the case of DZP and ETX injected animals. It is particularly interesting to note that DZP and EFX treatments had similar consequences in the test with slight differences. While both anxiolytics induced a clear delay in the escape from the heated dark compartment, heat conditioning did partially work on ETX injected animals in the nociceptive range of the test (i.e tolerance) while DZP animals showed no sign of learning compared to the first session. This result is consistent with a number of studies reporting the

effect of anxiolytics, and notably drugs used in the treatment of chronic pains, on cognitive functions (Stein & Strickland, 1998).

In human, pain and persistent pains are accompanied by emotional comorbidities from an increase of anxiety and a vulnerability to depression to catastrophization in which the anticipation and experience of pain is worsen by a negative mental state (Meints & Edwards, 2018) . This phenomenon is scarcely measurable with classic nociceptive tests in animals. In that context, our paradigm involves supraspinal processes of an integrated behaviour that cannot be assessed in those tests. As such, it is of particular interest to see the impact of inflammatory or neuropathic pain on the adaptive response of rats when faced with a nociceptive stimulus with a possibility of escape against another aversive stimulation (i.e light). Indeed, even if CFA injected or cuffed rats present a nociceptive hyperalgesia, they tend to remain in the dark heated compartment even after it has become nociceptive. As pain impacts cognitive capacities (Gregoire *et al.*, 2012), it appears that in this test, pain induces a delay in the decision making processes leading to the definitive exit of the heated compartment as well as the memorization of the test. Painful animals therefore present a blunted adaptive response to a nociceptive aversive stimulation beyond the mere nociceptive threshold. It is interesting to note that if in the literature neuropathic cuffed animals are not typically described as showing hypersensitivity to heat, they do show an altered spontaneous behaviour to thermal heat in this place conditioning paradigm.

While the use of heated plates are widely used in nociceptive test, cold plate test are less common as it provokes less of a reaction in animals, and the scoring relies on the amount of behaviour exhibited in a certain amount of time or the amount of time spent presenting this behaviour (Jasmin *et al.*, 1998). As neuropathic cuffed animals are allodynic to cold, the use of a cold ramp instead of a hot one in the SADAC test provided new insights on the spontaneous behaviour relating to cold of both sham and cuffed rats. Both sham and cuffed animals had a nociceptive threshold around the 15°C cold threshold commonly described in the literature (Allchorne *et al.*, 2005) and a strong adaptive response to cooling upon the second session. It demonstrates an efficient aversive conditioning by cold temperatures. Most animals of both groups left the compartment before the ramp even started or reached 15°C. This conditioning appears stronger in cuffed animals, which is in good agreement with their described hypersensitivity to cold (Aouad *et al.*, 2014).

In summary, this new proposed paradigm allows not only the measure of classic nociceptive thresholds with the use of dynamic cold and hot plates, allowing the assessment and differentiation allodynia and hyperalgesia behaviours in animals (Yalcin *et al.*, 2009), but also speaks for an integrated cortical integration leading to a proactive avoidance behaviour of freely moving animals without prior training.

SUMMARY TABLES

Table 1: Summary table of heat-SADAC Figure 1 Figure 2 and 3 Figure 4 Figure 5

Nociceptive behaviour	CT (n=32)	CT saline (n=8)	DZP (n=15)	EFX (n=16)	CT saline (n=16)	CFA (n=13)	CT Sham (n=8)	Cuff (n=8)
Nociceptive threshold S1 (°C)	43.7±0.2	43.7±0.2	43.5±0.4	43.7±0.4	43.0±0.7	34.4±1.3	44.5±0.7	43.0±0.2
Nociceptive threshold S2 (°C)	43.3±0.2 (5/32)	43.0±0.5 (2/8)	43.5±0.3 (10/15)	43.8±0.3 (13/16)	43.1±0.7 (7/16)	33.0±2.3 (12/13)	43.3 (1/8)	41.7±0.2 (3/8)
Tolerance Behaviour	CT (n=32)	CT saline (n=8)	DZP (n=15)	EFX (n=15)	CT saline (n=16)	CFA (n=8)	CT Sham (n=8)	Cuff (n=8)
Escape threshold session 1 (°C)	46.8±0.4	48.5±0.6	45.8±1.1	49.1±0.3	46.2±1.0	50.0±0.4	45.8±1.6	46.8±1.4
Delta escape-nociception (°C)	3.8±0.5	3.8±0.9	5.7±0.6	5.5±0.6	3.1±0.8	16.5±1.9	1.7±0.6	2.5±0.8
Half escape session 1	46.4	49.1	48.4	49.1	46.8	49.8	47.7	48.9
Escape before heat ramp (% animals)	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Escape before 42°C (% animals)	6% (2/32)	0%	27% (4/15)	0%	13% (2/16)	0%	25% (2/8)	0%
Conditioning/learning	CT (n=32)	CT saline (n=8)	DZP (n=15)	EFX (n=15)	CT saline (n=16)	CFA (n=13)	CT Sham (n=8)	Cuff (n=8)
Escape threshold session 2 (°C)	38.5±1.3	41.2±2.1	44.3±1.6	44.4±1.1	37.9±2.0	42.7±2.4	37.7±2.2	38.7±2.2
Delta escape session 2-1 (°C)	2.1±0.3	1.1±1.7	5.2±0.5	1.8±0.4	0.8±0.6	15.6±2.3	2.7±2.0	0.5±0.3
Half escape session 2	40.9	43.7	45.6	45.7	41	48.27	38.4	45.7
Escape before heat ramp (% animals)	13% (4/32)	0	7% (1/15)	0	19% (3/16)	0	13% (1/8)	25% (2/8)
Escape before 42°C (% animals)	61% (17/28)	25% (2/8)	29% (4/14)	13% (2/15)	46% (6/13)	15% (2/13)	86% (6/7)	0

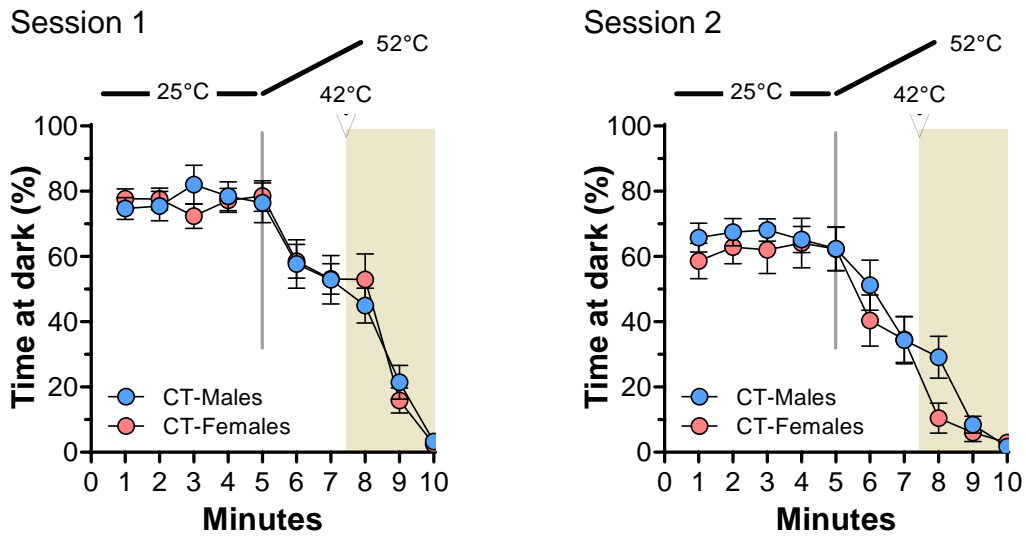
Table 2: Summary of cold-SADAC

Nociceptive behaviour to cold	Sham (n=8)	Cuff (n=8)
Nociceptive threshold S1 (°C)	12.6±0.8	15.4±1.9°C
Nociceptive threshold S2 (°C)	19.0 (1/8)	11.6 (1/8)

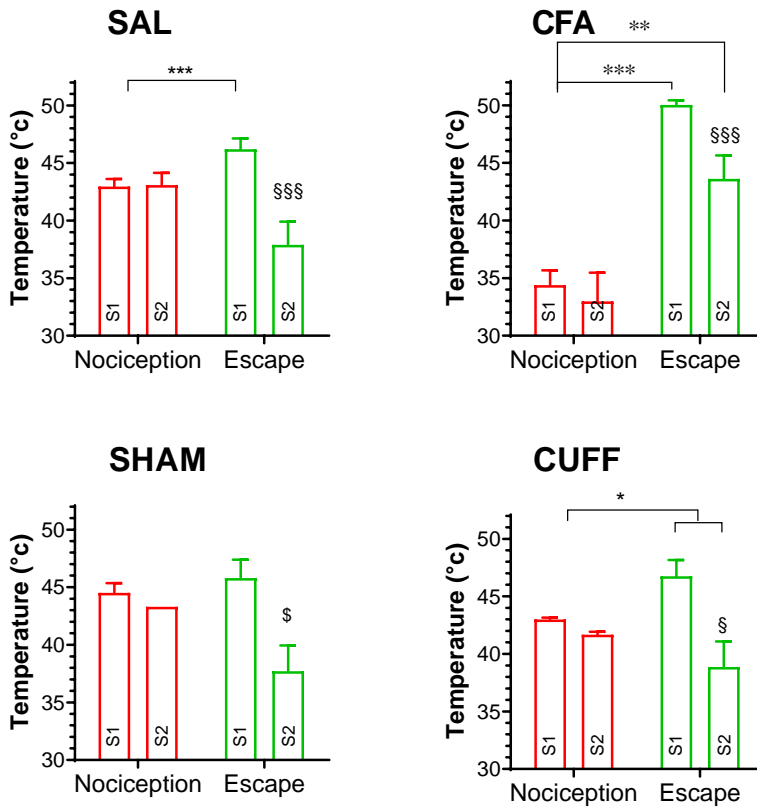
Cold Session 1	Sham (n=8)	Cuff (n=8)
Escape threshold session 1 (°C)	8.0±1.6°C	9.5±2.4°C
Delta escape (°C)	-5.4±1.6°C	-4.8±2.3°C
50% definitive escape session 1	8.2°C	≈7°C
Escape before heat ramp (% animals)	0%	0
Escape before 42°C (% animals)	0%	13% (1/8)

Cold Session 2	Sham (n=8)	Cuff (n=8)
Escape threshold session 2 (°C)	16.1±2.7°C	18.8±2.7°C
Delta escape (°C)	-6.5°C	-2.9°C
50% definitive escape session 2	13.7°C	≈20°C
Escape before heat ramp (% animals)	14% (1/7)	38% (3/8)
Escape before 42°C (% animals)	50% (3/6)	40% (2/5)

SUPPLEMENTARY FIGURE



Supplementary figure 1: Comparison of the time spend in the dark compartment between male and female rats for both sessions. Statistical test: two-way ANOVA, group x time.



Supplementary figure 2: Nociceptive and escape threshold of Saline-injected (SAL), inflammatory (CFA), sham-operated (SHAM) and cuff-operated (CUFF) animals. Mann Whitney, (***,\$\$\$) $p < 0.001$, (**) $p < 0.001$, (*;§) $p < 0.005$.

REFERENCES

- Allchorne, A.J., Broom, D.C. & Woolf, C.J. (2005) Detection of cold pain, cold allodynia and cold hyperalgesia in freely behaving rats. *Mol Pain*, **1**, 36.
- Aouad, M., Petit-Demouliere, N., Goumon, Y. & Poisbeau, P. (2014) Etifoxine stimulates allopregnanolone synthesis in the spinal cord to produce analgesia in experimental mononeuropathy. *Eur J Pain*, **18**, 258-268.
- Baliki, M., Calvo, O., Chialvo, D.R. & Apkarian, A.V. (2005) Spared nerve injury rats exhibit thermal hyperalgesia on an automated operant dynamic thermal escape task. *Mol Pain*, **1**, 18.
- Barrot, M. (2012) Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*, **211**, 39-50.
- Bushnell, M.C., Ceko, M. & Low, L.A. (2013) Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*, **14**, 502-511.
- Colleoni, M. & Sacerdote, P. (2010) Murine models of human neuropathic pain. *Biochim Biophys Acta*, **1802**, 924-933.
- Fields, H.L. (1999) Pain: an unpleasant topic. *Pain*, **Suppl 6**, S61-S69.
- Gregoire, S., Michaud, V., Chapuy, E., Eschalier, A. & Ardid, D. (2012) Study of emotional and cognitive impairments in mononeuropathic rats: effect of duloxetine and gabapentin. *Pain*, **153**, 1657-1663.
- Gregory, N.S., Harris, A.L., Robinson, C.R., Dougherty, P.M., Fuchs, P.N. & Sluka, K.A. (2013) An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. *J Pain*, **14**, 1255-1269.
- Jasmin, L., Kohan, L., Franssen, M., Janni, G. & Goff, J.R. (1998) The cold plate as a test of nociceptive behaviors: description and application to the study of chronic neuropathic and inflammatory pain models. *Pain*, **75**, 367-382.
- Kremer, M., Becker, L.J., Barrot, M. & Yalcin, I. (2021) How to study anxiety and depression in rodent models of chronic pain? *Eur J Neurosci*, **53**, 236-270.
- LaBuda, C.J. & Fuchs, P.N. (2001) Low dose aspirin attenuates escape/avoidance behavior, but does not reduce mechanical hyperalgesia in a rodent model of inflammatory pain. *Neurosci Lett*, **304**, 137-140.
- Matthies, B.K. & Franklin, K.B.J. (1992) Formalin pain is expressed in decerebrate rats but not attenuated by morphine. *Pain*, **51**, 199-206.
- Mauderli, A.P., Acosta-Rua, A. & Vierck, C.J. (2000) An operant assay of thermal pain in conscious, unrestrained rats. *J Neurosci Methods*, **97**, 19-29.
- Meints, S.M. & Edwards, R.R. (2018) Evaluating psychosocial contributions to chronic pain outcomes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **87**, 168-182.
- Navratilova, E., Xie, J.Y., King, T. & Porreca, F. (2013) Evaluation of reward from pain relief. *Ann N Y Acad Sci*, **1282**, 1-11.

Raja, S.N., Carr, D.B., Cohen, M., Finnerup, N.B., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F.J., Mogil, J.S., Ringkamp, M., Sluka, K.A., Song, X.J., Stevens, B., Sullivan, M.D., Tutelman, P.R., Ushida, T. & Vader, K. (2020) The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*, **161**, 1976-1982.

SFETD (2017) *Livre Blanc de la Douleur 2017*.

Stein, R.A. & Strickland, T.L. (1998) A review of the neuropsychological effects of commonly used prescription medications. *Arch Clin Neuropsychol*, **13**, 259-284.

Talbot, K., Madden, V.J., Jones, S.L. & Moseley, G.L. (2019) The sensory and affective components of pain: are they differentially modifiable dimensions or inseparable aspects of a unitary experience? A systematic review. *Br J Anaesth*, **123**, e263-e272.

Wilcox, C.E., Mayer, A.R., Teshiba, T.M., Ling, J., Smith, B.W., Wilcox, G.L. & Mullins, P.G. (2015) The Subjective Experience of Pain: An fMRI Study of Percept-Related Models and Functional Connectivity. *Pain Med*, **16**, 2121-2133.

Yalcin, I., Charlet, A., Freund-Mercier, M.J., Barrot, M. & Poisbeau, P. (2009) Differentiating thermal allodynia and hyperalgesia using dynamic hot and cold plate in rodents. *J Pain*, **10**, 767-773.

Yalcin, I., Megat, S., Barthas, F., Waltisperger, E., Kremer, M., Salvat, E. & Barrot, M. (2014) The sciatic nerve cuffing model of neuropathic pain in mice. *J Vis Exp*.

IV. DISCUSSION

A. Intégration thermique différentielle par les neurones convergents des couches profondes de la CDME

La première partie de ce travail de thèse a caractérisé de manière fine l'intégration des informations nociceptives chaudes et froides des neurones WDR des couches profondes de la CDME (article 1). Initialement décrits par Mendell (Mendell & Wall, 1965; Mendell, 1966), ces neurones ont la propriété de recevoir des informations convergentes à la fois nociceptives et non nociceptives.

Dans nos conditions expérimentales, la majorité (83%) des neurones mécanosensibles enregistrés ont répondu aux stimulations chaudes, et la moitié de ceux-ci ont également répondu aux stimulations froides. Ces résultats sont en accord avec la littérature qui décrit une grande proportion **de neurones multimodaux dans la CDME**, bien que la modalité au froid a rarement été étudiée en détail chez ces populations neuronales (Menetrey *et al.*, 1977; Menetrey *et al.*, 1979; Dado *et al.*, 1994; Khasabov *et al.*, 2001; Todd *et al.*, 2005; Ran *et al.*, 2016).

De manière surprenante, ces neurones WDR semblent être **nociceptifs spécifiques pour le chaud** avec un seuil d'activation de 43°C, contrairement au froid ou des stimulations non nociceptives ont provoqué des décharges de PA (seuils variables de 25°C à 9°C). Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que les neurones ont été sélectionnés sur la base de leur réponse à des stimulations mécaniques nociceptives ce qui a limité la population neuronale enregistrée à celle recevant des informations de fibres mécanosensibles à haut seuil d'activation. Il est donc possible qu'une autre population de neurones WDR à bas seuil d'activation soit responsable de la prise en charge des informations non nociceptive pour le chaud. Dans nos conditions expérimentales, nous ne pouvons pas non plus exclure l'existence de neurones WDR thermiques spécifiques mécano-insensibles.

Nous avons également pu mettre en évidence que les neurones WDR des couches profondes présentent un **profil de réponse différent entre le chaud et le froid**. Suite à des stimulations rapides à 52°C et 0°C, la latence d'apparition des premiers PA se fait **deux fois plus rapidement pour le froid (210ms) que pour le chaud (490ms)** alors que le nombre de PA émis est équivalent. Cette latence dépend de plusieurs paramètres : le temps de chauffe ou de refroidissement de la thermode micropeltier (vitesse de rampe fixée à 300°C/s), l'inertie de la peau jusqu'à ce que la température diffuse au niveau des nocicepteurs (environ 50µm en dessous de la peau), le temps d'activation du détecteur moléculaire pour générer un PA estimé à 35 ms pour les canaux TRP (Cesare & McNaughton, 1996) et la vitesse de propagation le long des fibres afférentes stimulées jusqu'à arriver au niveau du neurone WDR enregistré.

De précédentes études se sont efforcées à modéliser la réponse de fibres C en réponse à du chaud nociceptif. Elles reportent une latence 500ms pour déclencher un réflexe comportemental dans le test

de « tail-flick », avançant que les fibres A δ ne sont pas impliquées dans ce réflexe (Benoist *et al.*, 2008) et une latence de 600 ms dans la modélisation de la réponse d'une fibre C en contact avec un métal chauffé à 60°C (Xu *et al.*, 2010). La latence obtenue dans nos résultats pour la réponse au chaud est en adéquation avec ces modèles, en prenant en compte que la différence de source de chaleur (différent métal et chaleur radiante) pourrait expliquer la variabilité entre les délais observés. Parallèlement, si aucune modélisation du refroidissement de la peau par conduction n'existe à ce jour à notre connaissance, **le délai deux fois plus rapide de la réponse au froid n'est pas compatible avec une transmission par les fibres C** (i.e. vitesse lente de conduction) et suggère donc l'implication des fibres A δ mélinisées.

Un autre élément soutenant cette hypothèse provient des profils différentiels des neurones WDR en réponse à des stimulations thermiques répétées. Durant les premières secondes de stimulations itératives chaudes, **les neurones WDR présentent une facilitation de la réponse** réminiscente du phénomène de « wind-up » induite par une stimulation répétée des fibres C (Mendell & Wall, 1965). Cette facilitation de la réponse n'est en revanche pas observée dans le cas des stimulations répétées froides où la fréquence de décharge diminue progressivement durant toute la durée du protocole. Ces résultats font échos **aux propriétés adaptatives des fibres A δ sensibles au froid** décrites dans la littérature qui désensibilisent rapidement suite à des stimulations continues (Darian-Smith *et al.*, 1973). Il est également à noter que les stimulations chaudes ont provoqué systématiquement des « post-décharges » (i.e. activité neuronale qui persiste après la fin de la stimulation) qui est une propriété unique des fibres C, ce qui a rarement été le cas pour les stimulations froides. Ce phénomène est illustré dans l'article 2.

Dans la continuité de ces résultats, le profil de réponse des neurones WDR face à des stimulations longues (5 secondes) à des températures variables entre 0°C et 52°C illustre bien cette intégration spinale différente entre le chaud et le froid. Si dans le cas du chaud, la fréquence de décharge augmente avec l'intensité de la stimulation, un plateau de réponse est observé pour le froid. Ce profil, observé chez les fibres thermosensibles dans le nez du chat (Hensel & Kenshalo, 1969) a été caractérisé dans une élégante étude d'imagerie bi-photons de la CDME de Ran et collaborateurs. Ils mettent en avant une **intégration « adaptative » pour le froid** (i.e. pic de réponse au début de la stimulation suivi d'une adaptation) et une **intégration « absolue » pour le chaud** (i.e. l'amplitude de la réponse est proportionnelle à l'intensité de stimulation) par les neurones thermosensibles de la moelle épinière (Ran *et al.*, 2016). L'adaptation de la réponse « relative » au froid témoigne de la capacité des neurones sensoriels à détecter des baisses de températures cutanées, mais ne reflètent pas l'intensité de cette température. Wang et collaborateurs ont donc proposé l'hypothèse suivante : l'intensité du chaud nociceptif est codée par le nombre de neurones activés et l'amplitude de leur réponse au **chaud**

(**codage graduel**) tandis que l'intensité du froid découle de l'activité résultante d'une population de neurones répondant à différentes gammes de température froides (**codage combinatoire**) (Wang *et al.*, 2018).

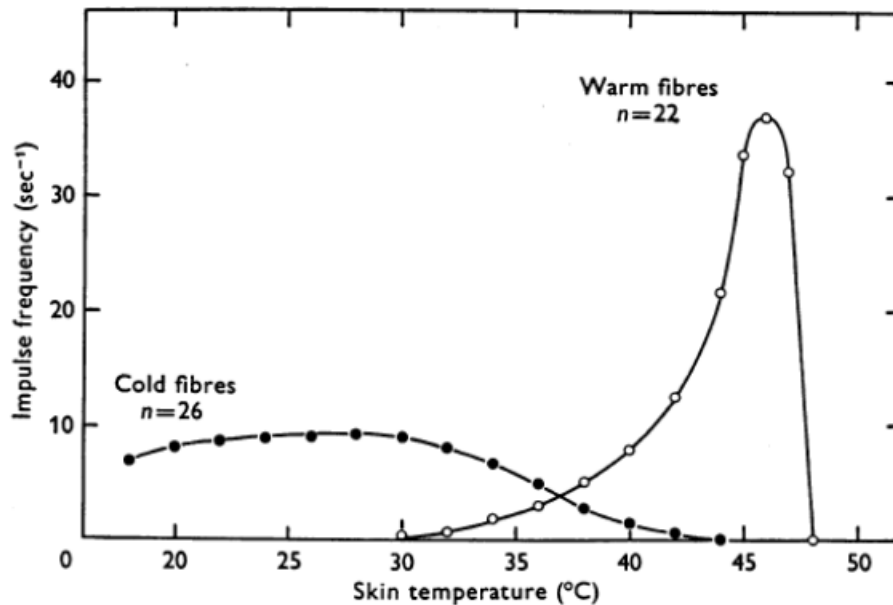


Figure 33 : Illustration de la réponse thermique de fibres dans le nez du chat (Hensel & Kenshalo, 1969)

Représentation de la réponse moyenne en PA de fibres thermosensibles dans le nez du chat en réponse à différentes températures.

Historiquement, il a souvent été considéré que **la détection des informations chaudes et froides est faite de manière séparée** (i.e théorie de la spécificité), les fibres C pour le chaud et les fibres A δ pour le froid. Cette idée a ensuite été confortée par l'identification des récepteurs TRPV1 et TRPM8, acteurs principaux de la thermosensibilité, exprimés en grande partie par des populations de fibres différentes (Dhaka *et al.*, 2008). De plus, l'ablation de ces récepteurs induit une perte de sensation thermique spécifique quasi-totale sans affecter la sensibilité mécanique. Cette hypothèse est contestée par la prévalence de neurones polymodaux dans les GRD (Wang *et al.*, 2018). Prescott et collaborateur argumentent donc en faveur d'une **théorie « combinatoire »**, similaire à la théorie des patrons de décharges, dans laquelle un *stimulus* active plusieurs neurones spécialisés dans une combinaison unique, et que c'est la résultante de cette co-activation de populations neuronales qui donne naissance à la sensation de douleur thermique (Prescott & Ratte, 2012).

Il est donc intéressant de noter que **l'intégration des informations thermiques dans le cortex insulaire**, désignée comme le cœur de l'intégration corticale thermique (Craig *et al.*, 2000), **se fait**

également de manière différentielle (Vestergaard *et al.*, 2023). C'est également le cas dans le cortex somatosensoriel. Des données psychologiques renforcent cette différence entre le chaud et le froid: les sujets humains **décrivent la sensation douloureuse froide de manière différente que celle le chaud**, à des intensités de stimulations similaires. Le froid est généralement plus difficile à décrire, requiert une plus grande différence de température pour éliciter une sensation douloureuse, et la sensation déplaisante de la stimulation persiste longtemps après la fin de l'expérience. Les auteurs proposent donc **une double intégration centrale** : une même voie transmettant les informations nociceptives chaudes et froides donnant une valence émotionnelle déplaisante à l'expérience, et des voies séparées comprenant les informations qualitatives sensori-discriminatives de chaque modalité (Morin & Bushnell, 1998).

Compte tenu de l'existence de neurones thermiques spécifiques et polymodaux au sein de la moelle épinière, il est possible d'imaginer un système spinal basé sur le même principe. Les informations chaudes et froides, portées par les nocicepteurs C et A δ , arrivent dans les couches superficielles ou profondes de la CDME. Dans les couches superficielles, des neurones nociceptifs spécifiques au chaud et au froid sont présents, les neurones pyramidaux COLD répondent au froid non nociceptif et inhibent l'activité des neurones multipolaires HPC. Lorsque l'activité nociceptive augmente, l'activité des neurones HPC surpasse l'activité inhibitrice et donne lieu à la transmission nociceptive thermique. Dans les couches profondes, nous avons pu mettre en évidence des neurones WDR-MH et WDR-MHC. Nous ne pouvons pas non plus exclure l'existence de neurones thermique spécifique mécano-insensibles, ou même de neurones WDR-MC. La résultante de l'activité du réseau d'interneurones active les neurones de projection (6% dans la couche I, 25% des neurones WDR dans la couche V) qui projettent dans les structures supraspinales selon deux voies ascendantes :

- **une voie multimodale** qui arrive dans les structures supraspinales impliquées dans la **réponse affectivo-émotionnelle de la douleur** (par exemple les noyaux thalamiques VMPO et intralaminaires)
- **une voie thermique spécifique**, ségrégeant les informations chaudes et froides qui sont ensuite intégrées au niveau supraspinal (par exemple par les noyaux thalamiques VPM/VPL) dans leur **composante sensori-discriminative**.

La différence d'information pour séparer les informations froides et chaudes proviendrait du codage même par les neurones spinaux et corticaux. Un codage « graduel » ou « absolu » serait la signature électrophysiologique du chaud tandis qu'un codage « combinatoire » ou « relatif » serait celle du froid. La question de l'existence de neurones de projection thermiques spécifiques ou polymodaux reste une question ouverte.

Ces résultats sous-tendent un rôle important, peut-être sous-estimé des neurones WDR dans l'intégration douloureuse. On peut donc s'interroger sur leur rôle en condition d'hypersensibilité douloureuse. Dans ce contexte, notre laboratoire a longuement étudié le modèle de Séparation Maternelle Néonatale (SMN), visant à étudier les conséquences d'une séparation parentale chez les enfants prématurés, qui induit à l'âge adulte des hypersensibilités nociceptives généralisées.

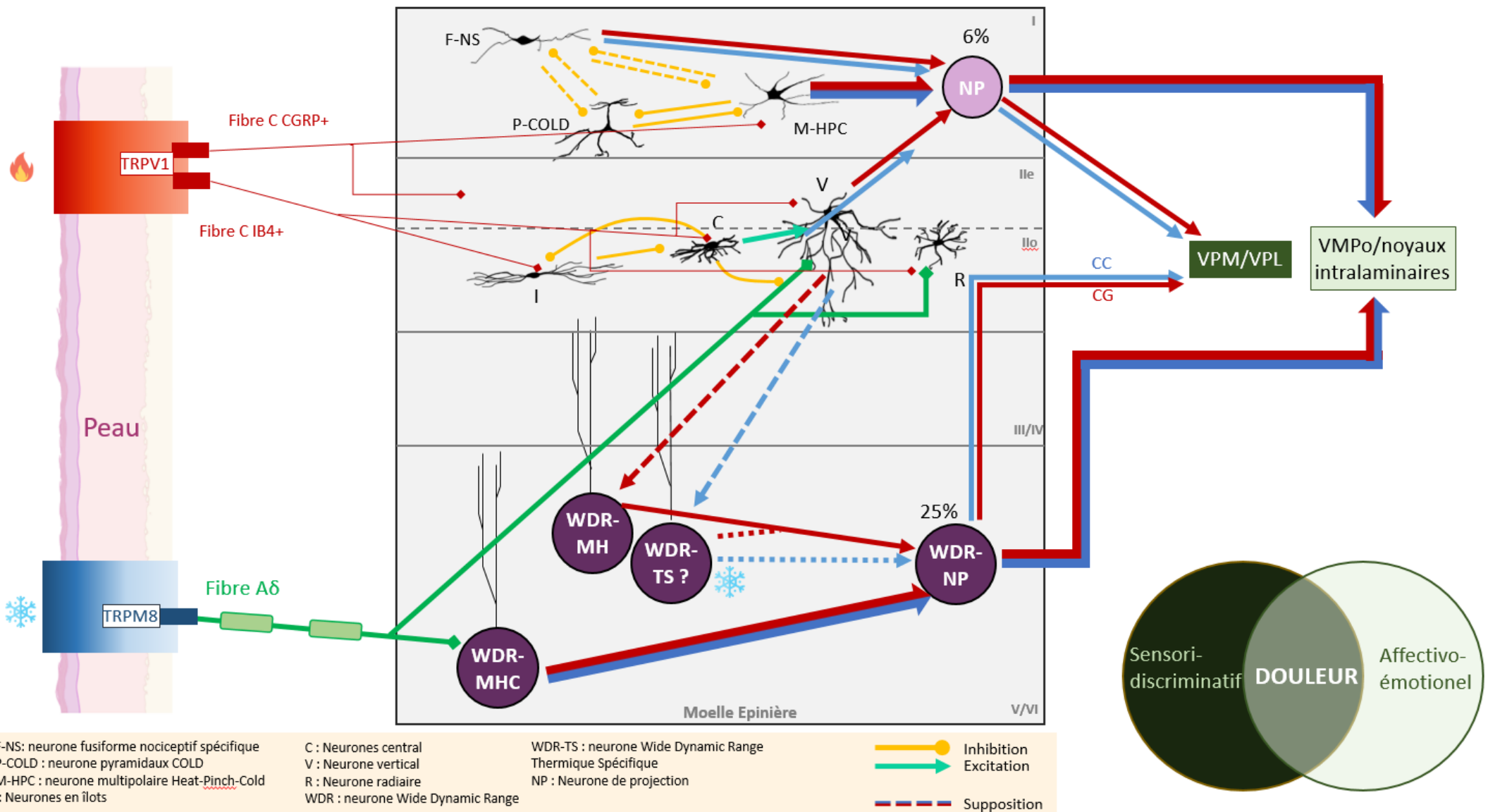


Figure 34 : Schéma hypothétique de la transmission des informations thermiques

Les informations nociceptives thermiques, préférentiellement portées par les fibres C peptidergiques (CGRP+) et non-peptidergiques (IB4+) pour le chaud (rouge) et par les fibres Aδ pour le froid (bleu) arrivent, i) au niveau des couches superficielles ii) directement ou indirectement aux neurones WDR des couches profondes. Les informations du chaud et du froid au niveau spinal sont transmises selon des voies séparées dans les noyaux thalamiques sensori-discriminatif (VPM, VPL) et des voies multimodales dans les noyaux thalamiques affectivo-émotionnels (VMPo, noyaux intralaminaires). Ces informations, suite à une intégration corticale (non représentée ici) donne naissance à la douleur thermique.

B. Impact d'une séparation maternelle néonatale sur l'intégration thermonociceptive des neurones WDR des couches profondes de la CDME

Il est maintenant bien accepté que la SMN provoque des conséquences à long-terme sur le développement du système nerveux nociceptif, découlant d'altérations fonctionnelles à la fois au niveau périphérique et au niveau central (Melchior *et al.*, 2021). La deuxième partie de ces travaux de thèse a caractérisé la réponse au chaud et au froid nociceptif des neurones WDR d'animaux SMN.

En accord avec les travaux précédents du laboratoire (Juif *et al.*, 2016; Melchior *et al.*, 2018; Gazzo *et al.*, 2021), **les animaux SMN sont hypersensibles** aux stimulations mécaniques et thermiques, **notamment au froid** ce qui a rarement été étudié dans ce modèle. Dans notre étude, nous avons pu corrélérer cette hypersensibilité nociceptive comportementale à une **hyperexcitabilité des neurones WDR**. Elle se traduit par une augmentation du nombre et de la fréquence de potentiels d'actions émis suite à des stimulations nociceptives, sans modification des latences de réponses ou des seuils d'activation.

Dans notre étude, l'expression des transcrits codant pour les détecteurs moléculaires dans les GRD et la ME n'est pas augmentée comme on pourrait s'y attendre, mais au contraire diminuée dans le cas des TRP. Si l'expression de Piezo2 reste inchangée, il n'est pas exclu que d'autres détecteurs moléculaires impliqués dans la transduction des informations mécaniques (Hill & Bautista, 2020) soient modifiés par la SMN. A condition que l'expression des protéines soit aussi pareillement diminuée, la baisse d'expression des TRP pourrait être une **tentative de compenser l'hyperexcitabilité des FAP** (Hu *et al.*, 2013; Juif *et al.*, 2016). La SMN cause une altération de la maturation des fibres C qui résulte en une surexpression des canaux $Na_v1.8$ (Juif *et al.*, 2016) et une sous-expression des canaux $K_v1.2$ (Luo *et al.*, 2011) qui perdurent à l'âge adulte, ainsi qu'une sensibilisation des fibres $A\delta$ (Paniagua *et al.*, 2020). Les latences et seuils d'activation étant similaires entre les rats SMN et les rats contrôles, et l'absence de différence dans la cinétique de réponse face à des stimulations courtes et longues tendent également à exclure une altération du fonctionnement des détecteurs moléculaires périphériques ou encore une modification de la vitesse de conduction des fibres dans l'hyperexcitabilité des neurones WDR enregistrés.

L'altération du codage chez les neurones WDR de rats SMN se manifeste par une augmentation de la fréquence de décharge pour une stimulation nociceptive donnée. Ce ne serait donc pas les propriétés passives des neurones qui seraient affectées par la SMN, mais les propriétés actives permettant la **génération de PA à haute fréquence**. Si l'expression d'un certain nombre de canaux « de fuite » K_2P

(Task1, Trek2, Tresk, Traak) responsables du potentiel de membrane au repos, est augmentée durant la période néonatale chez les animaux SMN, cette surexpression ne perdure pas à l'âge adulte, ce qui est cohérent avec l'absence de diminution de seuil d'activation des neurones WDR de rats SMN. D'autres **canaux potassiques voltage-dépendant (K_v)** jouent un rôle clé dans l'excitabilité neuronale (Pongs, 1999) et un grand nombre ont été mis en cause dans l'hyperexcitabilité et l'activité neuronale spontanée chez des animaux neuropathiques (Alles & Smith, 2021). Ces canaux sont donc de bons candidats à étudier pour tenter d'expliquer l'augmentation de la fréquence de décharges des neurones WDR de rats SMN.

Similairement, **les canaux calcium voltage-dépendant (Ca_v)** sont des modulateurs importants de l'excitabilité neuronale *via* la régulation de l'entrée de calcium durant la phase d'hyperpolarisation lors de la génération d'un PA. Leur activité permet de moduler les propriétés intrinsèques de décharge d'un neurone (Chemin *et al.*, 2002). Par exemple en conditions neuropathiques et inflammatoires, le canal Ca_v3.2 est surexprimé dans les GRD et la moelle épinière, facilite l'excitabilité neuronale et participe à l'hypersensibilité nociceptive de ces animaux (Cai *et al.*, 2021). La régulation de l'expression de Ca_v3.2 est placée sous le contrôle de médiateurs comme le facteur de croissance nerveuse (NGF) et TNF α surexprimés en conditions neuropathiques. Chez les animaux SMN, l'expression de NGF et de TNF α est altérée durant la période de développement des jeunes rats SMN (Juif *et al.*, 2016; Gazzo *et al.*, 2021) Si ce canal est également surexprimé chez les animaux SMN, il pourrait participer à l'hyperexcitabilité des neurones WDR mise en évidence dans cette étude.

Durant la période périnatale, **l'ocytocine (OT)** est un neuropeptide clé. Initialement découvert et nommé de par son implication dans la parturition (du grec « *ocy* » pour « rapide » et « *tocine* » pour « accouchement »), l'OT joue un rôle majeur de régulation dans de nombreuses fonctions telles que la lactation, le comportement maternel, les interactions sociales, les comportements anxio-dépressifs (Lee *et al.*, 2009). De manière notoire, l'OT exerce une action analgésique *via* le recrutement d'interneurones GABAergiques, l'hyperpolarisation des neurones des GRD ainsi qu'une action désensibilisante des canaux TRPV1 (Nersesyan *et al.*, 2017; Poisbeau *et al.*, 2018b). A l'instar du système nociceptif, le système OTergique mature au cours de la période néonatale et est fortement vulnérable aux stressseurs environnementaux (Grinevich *et al.*, 2014). Dans le modèle SMN, **les contrôles descendants OTergiques sont dysfonctionnels**. Corollairement, l'injection d'OT durant la période de séparation maternelle permet de restaurer le phénotype hypersensible des rats SMN (Melchior *et al.*, 2018) ainsi que les troubles sociaux et anxio-dépressifs (Gazzo *et al.*, 2021). L'hypothèse en vigueur de notre laboratoire met donc en avant un déficit OTergique durant la période de séparation maternelle qui affecte la maturation du système nociceptif et provoque chez les rats

SMN à l'âge adulte un phénotype hypersensible nociceptif ainsi que des conséquences psychopathologiques.

Dans ce contexte, l'OT est un **neuropeptide modulateur de l'excitabilité neuronale**. En périphérie, l'OT réduit l'excitabilité neuronale des fibres sensibilisées par une neuropathie *via* une hyperpolarisation de la membrane plasmique médiée par l'activation des canaux potassiques K_{ATP} (Gong *et al.*, 2015; Boada *et al.*, 2019). Dans la moelle épinière, l'OT provoque une diminution des courants transitoires I_A et courant rectifiant potassique voltage-dépendant, résultant en une diminution de la capacité de décharge des neurones des couches II (Breton *et al.*, 2009) et promeut dans un deuxième temps l'inhibition GABAergique. On pourrait alors imaginer que, durant la période critique de maturation du système nerveux, un déficit OTergique pourrait altérer le bon fonctionnement des canaux potassiques voltages dépendants, et ainsi modifier les propriétés d'émission de PA des neurones WDR. Pour vérifier cette hypothèse, une étude *in vitro* en patch-clamp permettrait de faire la caractérisation des propriétés électrophysiologiques des neurones WDR.

L'implication de l'inhibition GABAergique est d'autant plus pertinente dans le modèle de la SMN où une altération des canaux **cotransporteurs du chlorure** a été démontrée (Gazzo *et al.*, 2021) et confirmée dans notre étude. Chez les rats SMN, l'importeur de chlorure NKCC1 est surexprimé dans la moelle épinière tandis que l'exporteur KCC2 est sous exprimé dans les GRD. Ces transporteurs contrôlent l'import et l'export d'ions chlorure dans la cellule et sont des acteurs majeurs dans l'expression de symptômes douloureux (Kaila *et al.*, 2014). De manière notoire, leur expression est elle-même modulée par l'OT (Leonzino *et al.*, 2016). Durant la période de séparation maternelle, un traitement néonatal de bumétanide, inhibiteur de NKCC1, permet de restaurer les seuils nociceptifs et l'analgésie due au stress médiée par l'OT (Gazzo *et al.*, 2021) chez les animaux adultes. Ainsi, dans notre hypothèse de déficit OTergique durant la maturation du système nociceptif, l'expression de ces cotransporteurs seraient modulée par le manque d'OT, ce qui perturberait l'homéostasie chlorure spinale et détériorerait l'efficacité de l'inhibition GABAergique.

Dans un deuxième temps, de précédents travaux ont mis en évidence la **surexpression de médiateurs de l'inflammation au niveau spinal**. Cet état « sub-inflammatoire » est traduit par une surexpression des cytokines pro-inflammatoire IL-1 β , IL-6, TNF α et Cox-2, ainsi qu'une diminution de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Gazzo *et al.*, 2021). Ces médiateurs sont également de puissants modulateurs de l'excitabilité neuronale et pourraient donc affecter les capacités de décharges des neurones WDR (Ji *et al.*, 2018). IL1 β participe au développement de l'hyperalgésie inflammatoire en inhibant les courants potassium K^+ , TNF α induit une augmentation des courants sodium Na^+ des canaux $Na_v1.3$, $Na_v1.7$ et $Na_v1.8$ et module également l'activité de $Ca_v3.2$, et dans la moelle épinière, IL-6 agit agit sur $Na_v1.7$

(Vezzani & Viviani, 2015). Tous ces mécanismes pourraient favoriser l'excitabilité des neurones WDR spinaux chez les rats SMN. Un autre facteur de croissance tumorale, TGFβ1, est capable d'augmenter la fréquence de décharge neuronale *via* une voie de signalisation impliquant la protéine kinase (PKC) (Farr *et al.*, 1999) et pourrait être étudié dans le cas de la SMN.

Dans ces travaux de thèse, nous avons pu mettre en évidence une augmentation du nombre et de la fréquence de décharge des neurones WDR des couches profondes de la CDME en réponse à des stimulations thermiques nociceptives. Cette altération du codage nociceptif serait induite, au moins en partie, par une perturbation de l'homéostasie chlorure due à une surexpression de NKCC1 qui résulterait en une désinhibition spinale qui induirait *in fine* une hyperexcitabilité des neurones WDR spinaux, entretenue par un état « sub-inflammatoire ». En périphérie, la diminution de l'expression des détecteurs moléculaires serait une tentative de régulation compensatoire de l'organisme. Cette exacerbation du codage nociceptif central peut ainsi expliquer les symptômes d'hypersensibilités observés chez les animaux adultes avec une histoire de SMN.

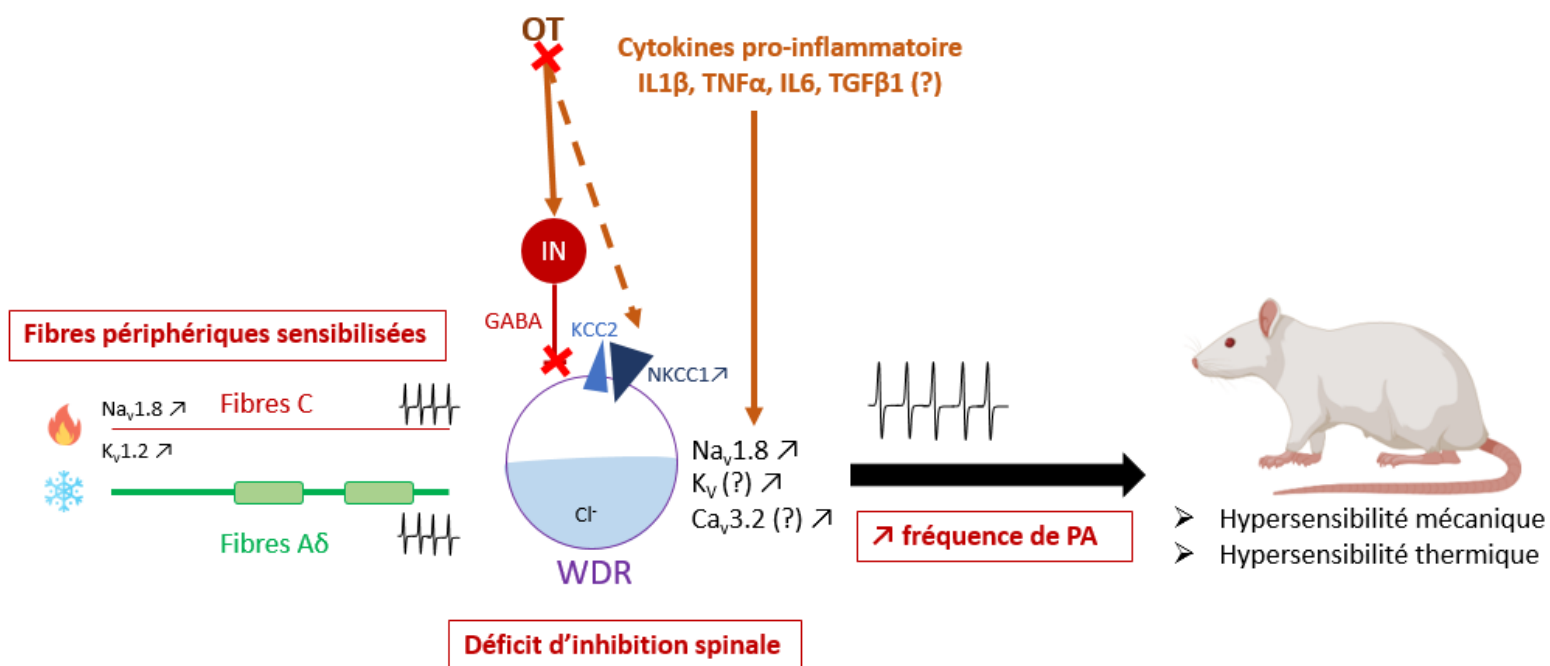


Figure 35 : Schéma hypothétique de l'impact de la SMN sur la transmission sensorispinale nociceptive

Les fibres périphériques Aδ et C sensibilisés transmettent les informations nociceptives aux neurones WDR des couches profondes. Durant la période néonatale, le déficit OTergique influe sur l'expression de l'importeur de chlorure NKCC1 qui induit une perturbation de l'homéostasie chlorure spinale. Parallèlement, l'inhibition GABA_Aerique est également affectée. Le tout résulte en une désinhibition spinale générale. L'état sub-inflammatoire des animaux provoque une augmentation l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL1β, TNFα, IL-6, TGFβ1 supposé) qui modulent l'activité des canaux voltage dépendant et permet la génération de potentiel d'action (PA) à haute fréquence. L'hyperactivité neuronale périphérique et spinale induit un phénotype hypersensible nociceptif chez les animaux SMN à l'âge adulte.

C. Evaluation multidimensionnelle de la douleur par un test de conditionnement de place thermique

L'un des plus grands défis de la recherche animale préclinique est d'assurer une bonne translation entre les découvertes de recherche fondamentale et l'amélioration des connaissances au profit de la santé humaine. La question est d'autant plus importante dans le domaine de la douleur où le besoin de trouver de nouveaux antalgiques efficaces est de plus en plus pressant. Les douleurs chroniques sont en effet largement réfractaires (pharmacorésistantes) aux antalgiques classiques, et l'utilisation de traitements de secondes intentions (i.e traitements anti-épileptiques, antidépresseurs) n'est pas toujours efficace, si bien que 2/3 des patients considèrent que leur douleur n'est pas suffisamment soulagée (Geurts *et al.*, 2017). La douleur, dans son expression, s'exprime par des composantes sensori-discriminatives, affectivo-émotionnelles et cognitivo-comportementales. **Pourtant, la majorité des études animales se restreignent encore à l'étude de reflexes nociceptifs** qui ne traduisent que la composante sensori-discriminative. Les autres composantes sont soit laissées de côté, soit étudiées de manière séparée dans certains modèles de douleurs pathologique.

Dans une volonté grandissante de prendre en compte la douleur dans toutes ses composantes, des tests comportementaux de préférences de place, opérants ou non, ont été développés. Ces tests laissent le choix aux animaux libres de leurs mouvements de **s'adapter face à une situation dangereuse** ou déplaisante. Ils permettent aussi de mesurer l'expression de « douleurs spontanées » sans les induire expérimentalement.

Durant ces travaux de thèse, j'ai participé au développement et à la caractérisation d'un nouveau test comportemental utilisant deux environnements aversifs (thermique et lumineux) dans lesquels les animaux sont libres de leurs mouvements. Ce test ne nécessite pas d'entraînement au préalable. Chez les animaux naïfs, les seuils classiques de nociception thermique (froid : 15°C/ chaud : 43°C) sont retrouvés lorsque les animaux sont exposés à des températures nociceptives. Ces mesures sont faites en observant un comportement nociceptif comme dans d'autres tests nociceptifs mais les animaux l'expriment sans être en contention. Ces seuils sont différents de ceux observés pour l'échappement du compartiment nociceptif (8°C/47°C). Cette observation souligne une distinction entre la nociception propre (composante sensori-discriminative) et la motivation à échapper à une stimulation nociceptive précédemment décrite dans la littérature (LaBuda & Fuchs, 2001). Lors de la réitération du test une heure plus tard, on observe un **conditionnement efficace du chaud et du froid** : les animaux sortent plus vite du compartiment nociceptif, parfois même avant que la température atteigne un seuil nociceptif. Cet apprentissage s'illustre aussi bien en comparant les températures d'échappement

(alors que les seuils nociceptifs ne changent pas) ainsi que le seuil de « demi-échappement » qui correspond à la température provoquant la sortie définitivement de 50% des animaux.

Pour l'analyse de ce test comprenant un grand nombre de variable, nous avons fait de choix de diviser le test en trois différentes phases : i) la « **baseline** », période d'exploration ou la température du sol est encore neutre (25°C), ii) l'**anticipation** qui correspond à la période de chauffe ou de refroidissement dans des gammes non nociceptives iii) et une fois que les seuils nociceptifs sont atteints, la période de « **tolérance** » jusqu'à l'échappement définitif des animaux dans le compartiment lumineux. Dans cette dernière période, la latence entre le seuil du premier réflexe nociceptif et la sortie définitive témoigne de la volonté des animaux à « se battre » contre la douleur jusqu'à ce que le besoin de se soustraire à la stimulation thermique devienne plus puissant.

La réponse de « **fight or flight** » (« se battre ou fuir ») est un comportement classique de la réponse au stress, engendré par l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) et le système noradrénergique du *Locus coeruleus* (LC) lors d'un stress aigu. La libération hypothalamique de CRH (corticotropin releasing factor) et de vasopressine stimule la sécrétion de l'hormone adrenocorticotropique par l'hypophyse. Cela stimule la libération de glucocorticoïdes par les glandes surrénales (McEwen, 2007). Parallèlement, les neurones noradrénergiques du LC libèrent de la noradrénaline (ou épinephrine) (Benarroch, 2018). Physiologiquement, ces cascades de signalisation engendrent des réponses centrales et périphériques : augmentation de l'attention et de la vigilance, augmentation de l'activité du système sympathique, augmentation du rythme cardiaque et de la pression artérielle, augmentation du rythme respiratoire et mobilisation des ressources énergétiques (Chrousos & Gold, 1992). L'adaptation au stress, soit les processus mis en place par l'organisme pour retourner dans une situation d'homéostasie, est également appelée « l'allostasie » (McEwen, 2000). Ce test permet donc **d'évaluer les stratégies d'adaptation** des animaux face à deux stressseurs, l'un douloureux et l'autre non.

Cette adaptation est affectée par les traitements aux d'anxiolytiques. Dans le cas d'un anxiolytique classique benzodiazépine (diazépam, DZP) et d'un autre type d'anxiolytique (étifoxine, ETX), **la prise de décision à sortir du compartiment nociceptif est retardée** alors que les seuils nociceptifs ne sont pas altérés. Durant la deuxième session, l'apprentissage est complètement gommé chez les animaux DZP qui ne présentent aucune différence de comportement par rapport à la session 1. L'effet de l'ETX est seulement partiel durant la phase de « baseline » et d'anticipation. Les anxiolytiques de type benzodiazépine ont des effets reportés sur les capacités cognitives (Stein & Strickland, 1998). Dans nos conditions expérimentales, il est cependant difficile de dire ce déficit d'adaptation est dû à une altération cognitive ou bien un soulagement de l'anxiété qui pousse les animaux à rester plus

longtemps dans le compartiment nociceptif. Dans le cas de l'ETX, cet anxiolytique non-benzodiazépine a montré des effets anti-nociceptifs dans de précédentes études *via* la stimulation de l'inhibition GABAergique (Poisbeau *et al.*, 2014; Gazzo *et al.*, 2019) et peu ou pas d'effets reportés sur les fonctions motrices et cognitives (Micallef *et al.*, 2001; Poisbeau *et al.*, 2018a). Il serait donc possible que le retard d'échappement des animaux ETX découle de cet effet analgésique, qui ne se traduit non pas sur une augmentation du seuil nociceptif au chaud, mais sur une augmentation de la tolérance à la stimulation nociceptive.

Chez l'Homme comme chez l'animal, **les douleurs persistantes comme les douleurs inflammatoires ou neuropathiques altèrent les capacités cognitives** (Moriarty *et al.*, 2011). Cette déficience est bien illustrée dans notre étude. Les animaux inflammatoires présentent sans surprise une diminution marquée du seuil nociceptif, témoignant d'une hyperalgésie au chaud bien décrite dans la littérature (Neugebauer *et al.*, 2007). Néanmoins, durant la première session, **ces animaux mettent plus de temps à quitter le compartiment nociceptif**. Durant la deuxième session, la douleur inflammatoire affecte la phase d'anticipation, qui pour ces animaux est déjà nociceptive. Pendant la période de chauffe, ces animaux ne sortent pas plus vite par rapport à la première session.

Dans le modèle de neuropathie, le conditionnement est similairement affecté. Si les animaux ne semblent pas présenter d'hypersensibilité au chaud au niveau des seuils nociceptifs, **leur réponse adaptative est altérée lors du conditionnement sur les trois phases du test**. Durant les périodes de « baseline », les animaux cuff passent un temps similaire dans le compartiment sombre par rapport aux animaux sham ($\approx 80\%$ pour la session 1 et $\approx 60\%$ pour la session 2). Il est donc peu probable que ce retard d'échappement soit dû à une anxiété accrue causée par la lumière, mais découle bien de l'impact de la douleur pathologique sur la composante émotionnelle (motivation à quitter un compartiment dangereux) et/ou cognitive (impact sur la mémorisation de l'expérience de la session 1).

Chez des animaux neuropathiques, des **altérations du cortex préfrontal (CPF)** ont été mises en cause pour expliquer leurs déficits cognitifs. La diminution du volume, du nombre de neurones, altérations de la morphologie dendritique et déficit de plasticité synaptique du CPF seraient responsables des troubles de flexibilité comportementale (Leite-Almeida *et al.*, 2009). Parallèlement, dans un modèle de monoarthrite, un dysfonctionnement de la voie CPF-amygdale résultant en une inhibition du CPF est tenu responsable des déficits cognitifs observés chez les animaux (Ji *et al.*, 2010). Une autre structure potentiellement mise en jeu serait l'ACC qui en condition pathologique est responsable d'une altération du conditionnement et d'apprentissage liée à une stimulation douloureuse (Johansen *et al.*, 2001; LaBuda & Fuchs, 2005). Pour confirmer ces hypothèses dans notre cas, il serait envisageable de

stimuler ou inhiber ces structures (par exemple avec des stimulations optogénétiques) tout en évaluant la réponse comportementale au paradigme.

Malgré la prévalence des allodynies et hyperalgésies au froid chez les patients neuropathiques, la sensibilité thermique froide est encore rarement évaluée dans les modèles animaux (Jasmin *et al.*, 1998). Les tests de la plaque froide statique ou dynamique restent néanmoins les tests les plus fiables quant à l'évaluation d'une réponse standardisée au froid chez des animaux douloureux (Yalcin *et al.*, 2009). Dans nos conditions, nous avons pu **mesurer la réponse adaptative des animaux sham et cuff face à un stimulus froid par rapport à une lumière aversive**. A l'instar de la rampe chaude, durant la période de « baseline », les animaux sham et cuff explorent librement les deux compartiments avec une préférence pour le compartiment noir jusqu'à ce que la température atteigne un seuil nociceptif (considéré à 15°C). On retrouve également une différence de température entre le premier réflexe nociceptif et la sortie définitive du compartiment nociceptif. Dans nos conditions expérimentales, le seuil nociceptif des animaux cuff tend à être plus élevé que les animaux sham sans atteindre une significativité statistique. Cependant, l'hypersensibilité au froid de ces animaux a été mesurée et confirmée par le test de l'acétone (*données non montrées*). Au contraire de la plaque chaude, ce test ne permet donc pas de mesurer l'hypersensibilité nociceptive au froid. Dans les tests classiques de plaque froide, les animaux sont testés sur plusieurs minutes sans possibilités d'échappement jusqu'à apparition de comportements nocifensifs. Chez des rats naïfs, le seuil nociceptif trouvé en plaque statique est en dessous de 4°C (Modi *et al.*, 2023) et est de 9°C pour la plaque dynamique. Chez les animaux neuropathiques, ce seuil augmente à 15°C (Allchorne *et al.*, 2005) ce qui est cohérent avec nos résultats. Ainsi, même chez des animaux non hypersensibles, **l'aversion due au froid est telle que la réaction de « flight » l'emporte sur le « fight »** et pousse les animaux à fuir plutôt que d'endurer la stimulation nociceptive.

Pour aller plus loin dans cette hypothèse, il serait intéressant d'enregistrer *in vivo* l'activité des zones cérébrales impliquées dans l'intégration sensori-discriminative (i.e noyaux thalamiques VPM/VPL) et émotionnelle et motivationnelle (VMPO, noyaux thalamiques intralaminaires, CPF, ACC) de la douleur durant ce test et de comparer ces activités durant le test au chaud et au froid.

Le conditionnement par le froid s'est révélé efficace dans les deux groupes d'animaux. La température de demi-échappement augmente drastiquement, de manière très marquée pour les animaux cuff, et les animaux quittent le compartiment précocement, souvent avant même que la température devienne nociceptive. A l'inverse du chaud, **la réponse adaptative au froid n'est pas impactée par la neuropathie**, et ces animaux semblent au contraire présenter une aversion encore plus marquée pour le froid que pour le chaud.

Cette aversion au froid est également présente chez les animaux sham. Cette différence d'adaptation comportementale entre le chaud et le froid a notamment été démontrée par Rossi et collaborateurs. Dans un paradigme de préférence de place, les animaux préfèrent une stimulation chaude nociceptive (45°C) par rapport à des stimulations froides non nociceptives et nociceptives (de 24°C à -4°C) (Rossi & Neubert, 2009).

Ce test propose donc une **nouvelle approche intégrée de l'évaluation de la douleur** chez l'animal et permet non seulement de mesurer les seuils nociceptifs à l'aide de plaque dynamique chaude et froide, mais prend également en compte un comportement intégré et motivé d'adaptation à une situation potentiellement dangereuse chez des animaux libres de leurs mouvements, sans entraînement ou habituation au préalable. Dans le cas d'utilisation de traitements pharmacologiques ou dans des conditions pathologiques, ce test permet additionally de mettre en évidence des déficits de cette réponse adaptative comportementale.

L'ensemble de ces travaux de thèse tente donc de mettre en relation le codage d'une information nociceptive, transmis au sein d'un organisme par la communication de neurones spécialisés, spécifiques ou multimodaux, dans un réseau d'intégration thermique complexe qui résulte en une adaptation comportementale face à un environnement aversif.

Dans les deux versants étudiés, à savoir des études électrophysiologiques s'intéressant au codage propre de l'information, et l'étude comportementale intégrée reposant sur un comportement motivé, nous avons pu voir une différence récurrente entre la prise en charge du chaud et du froid par l'organisme. La sensation thermique douloureuse découlerait donc d'une double intégration périphérique et centrale. L'intégration par les structures et neurones polymodaux donnerait naissance à la sensation aversive thermique générale, traduisant la composante émotionnelle, tandis que les informations sensori-discriminatives restent ségréguées et permettent de faire la différence entre la qualité de chaque stimulation. Au niveau central, cette prise en charge différentielle entre le froid et le chaud mène à des comportements adaptatifs de survie différents.

PAPIERS COMPLEMENTAIRES
ET REVUES

Les cônes marins, une ressource naturelle d'antalgiques venue du fond des mers : au-delà du ziconotide ?

Cone Snails, a Natural Resource of Analgesics from the Bottom of the Sea: Beyond the Ziconotide?

C. Gieré · S. Dutertre · P. Poisbeau

© Lavoisier SAS 2020

Résumé Les cônes marins sont des animaux remarquables qui ont développé au cours de l'évolution des outils leur permettant de survivre et de se nourrir sous la mer quels que soient le prédateur ou la proie auxquels ils pourraient être confrontés. Leurs venins de prédation et de défense contiennent des centaines de peptides bioactifs dont l' ω -conotoxine ziconotide, première conotoxine thérapeutique utilisée dans le traitement des douleurs chroniques intenses et pharmacorésistantes aux traitements antalgiques recommandés comme la morphine. Cette revue fait le point sur le mode d'action du ziconotide et met en valeur d'autres composés de venins de cônes ayant un potentiel thérapeutique pour traiter les douleurs pathologiques.

Mots clés Conotoxine · Conopeptide · Nociception · Venins de cônes

Abstract Cone snails are remarkable marine animals that have evolved tools to survive and feed under the sea, regardless of the predator or prey they might encounter. Their predatory and defense venoms contain hundreds of bioactive peptides including the ω -conotoxin ziconotide, known as the first therapeutic conotoxin used in the treatment of intense chronic pain, particularly in the case of pharmacoresistance to recommended analgesic treatments such as mor-

phine. This article describes the mode of action of ziconotide and highlights the other cone snail venom compounds with therapeutic potential for treating pathological pain.

Keywords Conotoxin · Conopeptide · Nociception · Cone snail venoms

L'étude des venins de cônes a débuté dans les années 1950–1960 avec les travaux pionniers de Kohn, et Endean et Rutkin [1–3]. La détermination de l'action létale du venin de *Conus geographus* a permis d'identifier les premières conotoxines ayant une action sur la transmission neuromusculaire comme les α - et les ω -conotoxines. C'est dans la famille des ω -conotoxines (environ 30 peptides matures identifiés à ce jour ; source : <http://www.conoserver.org/>) que la première conotoxine antalgique a été identifiée. En effet, les ω -conotoxines ont pour cible principale les canaux calcium voltage dépendants (Ca_v) responsables de l'exocytose des neurotransmetteurs dans la fente synaptique [4,5] et, chez les neurones sensoriels de ganglions rachidiens dorsaux, elles inhibent l'influx de calcium présynaptique [6], réduisant la sécrétion de neurotransmetteurs comme le glutamate et la substance P [7]. Le succès de ces recherches a abouti, deux décennies plus tard, à la mise sur le marché du ziconotide (ω -MVIIA, Prialt®) pour soulager les douleurs chroniques réfractaires aux opioïdes [8]. Dans cet article, les propriétés du ziconotide sont rappelées ainsi que celles d'autres conotoxines qui ont démontré un effet antalgique.

C. Gieré · P. Poisbeau (✉)

Institut des neurosciences cellulaires et intégratives (CNRS UPR 3212), Centre national de la recherche scientifique, université de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France
e-mail : poisbeau@unistra.fr

C. Gieré

École universitaire de recherche interdisciplinaire sur la douleur (EURIDOL Graduate School of Pain), université de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France

S. Dutertre

Institut des biomolécules Max-Mousseron (CNRS UMR 5247), Centre national de la recherche scientifique, université de Montpellier, F-34000 Montpellier, France

Le ziconotide : première conotoxine thérapeutique

Cette ω -MVIIA, issue du venin de *Conus magus*, inhibe sélectivement les Ca_v de type N, et plus particulièrement le sous-type $Ca_v2.2$ exprimé dans les couches superficielles de la moelle épinière qui intègrent la majorité des informations nociceptives [9]. Son mécanisme d'action inhibiteur

reposerait sur l'obstruction physique du canal $Ca_v2.2$, empêchant le flux d'ions Ca^{2+} , blocage facilité par la liaison de la conotoxine à l'intérieur du filtre de sélectivité du vestibule [10]. Après injection intrathécale, l'effet analgésique du ziconotide a été caractérisé dans plusieurs modèles animaux de douleurs inflammatoires et neuropathiques [11]. Selon le modèle utilisé, l'effet analgésique du ziconotide est 100 à 1 000 fois supérieur à la morphine [12].

Des études cliniques ont été par la suite conduites sur plus de 2 000 patients. Trois études de phase 3 entre 2004 et 2006, contrôlées contre placebo, ont permis la commercialisation du ziconotide (Prialt® pour « *Primary alternative to morphine* ») pour traiter les douleurs chroniques réfractaires, d'abord aux États-Unis en 2004 (Food and Drug Administration) puis en France [8]. Dans deux d'entre elles, les scores de douleur ont été réduits de 25 à 35 % si l'on tient compte de l'effet placebo [13,14]. Si le traitement au ziconotide ne semble pas provoquer de tolérance et permet de baisser les doses de morphine [15], son indice thérapeutique reste étroit et son utilisation limitée aux cas de douleurs chroniques les plus extrêmes comme les douleurs cancéreuses, neuropathiques et celles induites par le sida [16]. Comparativement à un traitement à court terme et à des doses faibles [17], un traitement prolongé avec élévation des doses peut conduire à l'apparition d'effets adverses bien documentés incluant des troubles sensoriels, moteurs et cognitifs [8,18].

Le ziconotide est l'un des traitements les plus innovants proposés ces dernières années aux patients douloureux chroniques, mais demande une administration intrarachidienne. Cette procédure lourde pour les soignants tout comme les patients pourrait être allégée avec le développement d'un composé passant la barrière hématoencéphalique (BHE) à condition de garder une bonne indication analgésique. Un composé chimérique incluant l' ω -MVIIA et une protéine de fusion passant la BHE a d'ailleurs été testé récemment dans une étude préclinique [19]. En dehors de cette approche, il est également théoriquement possible de travailler sur la structure du ziconotide pour augmenter son efficacité et optimiser son effet après injection intrarachidienne. Enfin, l'amélioration de la sélectivité de sous-types Ca_v est également une piste activement développée afin d'obtenir une fenêtre thérapeutique plus large. C'est le cas par exemple de la ω -conotoxine CVID qui offre un ratio analgésie/effets secondaires d'environ cinq fois supérieur au ziconotide [20].

Existe-t-il d'autres conotoxines antalgiques ?

Avant de répondre à cette question, rappelons quelques notions concernant la biologie des cônes et comment ils se sont adaptés au cours de l'évolution en perfectionnant leurs venins (Fig. 1). De façon originale, il semblerait que chaque espèce de cône soit capable de produire des venins contenant

des cocktails de conotoxines différents, selon que l'animal cherche à se nourrir ou se défendre. Ainsi, chaque venin de prédation ou de défense peut contenir jusqu'à 300 peptides bioactifs, et cette composition est spécifique à une espèce donnée [21]. Ces deux types de venins sont produits dans différentes régions du conduit à venin et injectés grâce à une radula modifiée en mini-harpon ou seringue hypodermique (Fig. 1). Dans la littérature, les peptides riches en cystéine sont habituellement appelés conotoxines (c'est-à-dire riches en ponts disulfure) par opposition aux conopeptides contenant peu ou pas de cystéine. Comme il existe plus de 1 000 espèces à travers le monde, au minimum entre 70 000 et 140 000 peptides bioactifs différents sont produits par les cônes marins et, à ce jour, seuls environ 2 000 d'entre eux ont été identifiés et parfois caractérisés (< 1 %). À côté du ziconotide, plusieurs peptides ont démontré un potentiel analgésique, car ils ont pour cible des acteurs moléculaires bien connus dans les processus nociceptifs et/ou impliqués dans les douleurs chroniques (Tableau 1 ; Fig. 2).

Peptides modulant l'excitabilité neuronale

Les canaux voltage-dépendants exprimés par les neurones jouent un rôle clé dans le codage de l'information nociceptive par les neurones sensoriels périphériques (c'est-à-dire nocicepteurs) jusqu'aux structures cérébrales qui mettent en forme la réponse douloureuse dans toutes ses composantes. Les canaux voltage-dépendants sont également essentiels pour déterminer le niveau d'excitabilité de chaque élément neuronal impliqué dans le circuit nociceptif. Parmi les exemples classiques, l'expression des canaux sodium voltage-dépendants $Na_v1.8$ et $Na_v1.9$ est spécifique des nocicepteurs, et elle est fortement altérée suite à une mutation dans certaines formes d'insensibilité congénitale à la douleur [23]. L'expression d'autres sous-unités, comme par exemple $Na_v1.7$, prédispose également des anomalies de la perception sensorielle nociceptive et à l'expression de douleurs chroniques [24]. De ce point de vue, certaines μ -conotoxines présentent un grand intérêt, car elles semblent spécifiques des Na_v exprimés par les neurones à la différence de ceux des cellules musculaires (classiquement, $Na_v1.4$) (Tableau 1). Plus précisément, les μ -conotoxines natives ou modifiées comme la PEG-SIIIA (conotoxine de synthèse modifiée) ciblant les canaux $Na_v1.2/1.6$ ont franchi avec succès les étapes précliniques [25]. De plus, les μ O-conotoxines offrent une meilleure sélectivité pour les sous-types de Na_v sensibles à la tétródotoxine (TTX), dont le $Na_v1.8$, et ont démontré une puissante activité analgésique [26]. Les difficultés de synthèse de ces peptides très hydrophobes ont initialement limité leur développement clinique, mais de nouvelles méthodes permettent des rendements encourageants et ouvrent de nouvelles perspectives [27].

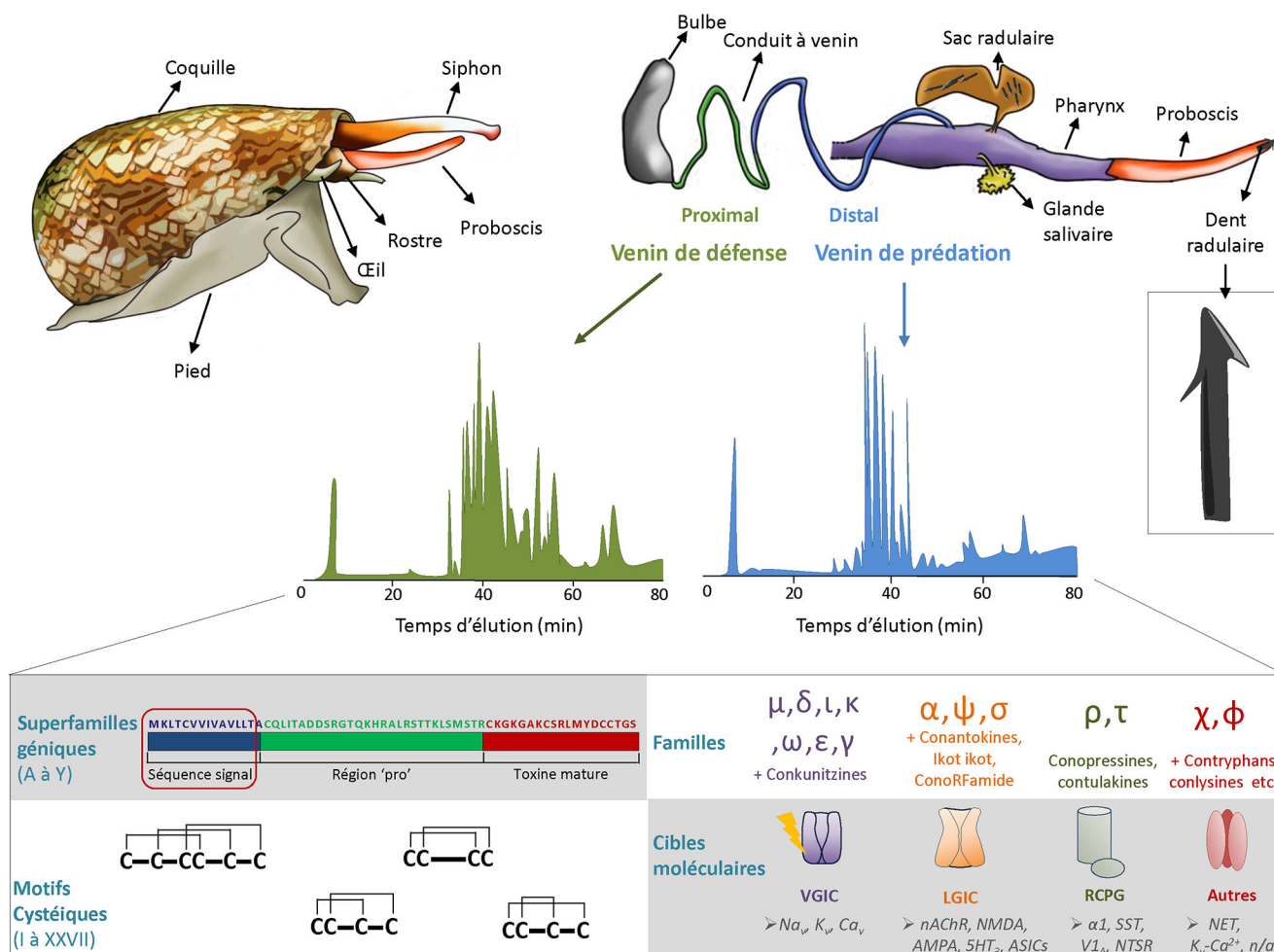


Fig. 1 Schéma présentant l’anatomie générale du cône, l’appareil venimeux, le profil d’éluéon d’un venin de défense et de prédation, et la nomenclature des peptides. Les cônes marins sont des mollusques nocturnes vivant principalement dans les eaux chaudes et peu profondes tropicales et subtropicales. Ce sont des gastéropodes de forme conique ovée ou cylindrique, protégés par une coquille calco-organique dont l’ornementation varie selon les espèces. Leur taille varie de quelques millimètres à plusieurs centimètres. Ils possèdent un pied musculieux leur permettant de se déplacer, un siphon à l’avant situé au-dessus de la pseudobouche (rostre) pour respirer. Leur appareil venimeux est composé de quatre parties majeures : i) le bulbe musculieux dont la contraction provoque l’éjection du venin ; ii) le conduit à venin, lui-même divisé en partie proximale qui produit le venin de défense et la partie distale qui produit le venin de prédation ; iii) le sac radulaire qui contient les dents radulaires, tubes chitineux creux en forme de harpon servant à l’inoculation du venin ; iv) et le proboscis, prolongement invaginable du pharynx qui est utilisé pour propulser la dent radulaire remplie de venin en direction de la proie ou du prédateur. Les profils d’un venin de prédation et de défense, séparés par HPLC, sont représentés ; chaque pic représente un composé de venins différent (adaptée de Dutertre et al. [21]). La nomenclature des conotoxines comprend : i) la superfamille génique à laquelle elles appartiennent, définie par la séquence signale de leur ARN précurseur (adapté de Bingham et al. [22]) ; ii) le motif (ou *pattern*) formé par les liaisons entre leurs résidus cystéiques ; iii) leur famille pharmacologique représentant leur cible moléculaire ; iv) et leur historique de synthèse (non représenté). Abréviations : VGIC : *voltage gated ionic channels* (canaux ioniques voltage dépendants) ; LGIC : *ligand gated ionic channels* (canaux ioniques activés par un ligand) ; RCPG : récepteur couplé aux protéines G ; $\text{Na}_v, \text{K}_v, \text{Ca}_v$: canaux sodium, potassium et calcium voltage dépendants ; nAChR : récepteur nicotinique de l’acétylcholine ; récepteur AMPA et NMDA du glutamate ; récepteur 5-HT₃ de la sérotonine ; ASICs : *acid sensing ion channels* ; $\alpha 1$: récepteur adrénérique $\alpha 1$; SST : récepteur à la somatostatine ; récepteur V1_A de la vasopressine ; NTSR : récepteur à la neurotensine ; NET : transporteur de la noradrénaline ; $\text{K}_v\text{-Ca}^{2+}$: canaux potassium calcium-dépendant ; n/a : cible encore inconnue ou non confirmée

Peptide	Nom d'usage	Cible	Statut
Peptide	Nom d'usage	Cible	Statut
ω -MVIIA	Ziconotide, Prialt, SNX-111	Ca _v 2.2	Sur le marché
ω -CVID	Leconotide, AM336	Ca _v 2.2	Phase 2
ω -GVIA	SNX-124	Ca _v 2.2	Arrêté
Conantokine G	CGX-1007, Con-G	NMDAR	Arrêté
Contulakine G	CGX-1160	NTSR	Arrêté
cVc1.1	AVC-1	nAChR α 9 α 10 GABA _B R (?)	Arrêté
α -RgIA4	KP-400	nAChR α 9 α 10	Préclinique
χ -MrIA	Xen2174	NET	Arrêté
μ O-MrVIB	CGX-1002	Na _v 1.8	Arrêté
PEG-SIIIA	PEG-SIIIA	Nav1.2/1.6	Préclinique

Peptides agissant sur la neurotransmission

Le ziconotide en fait partie puisqu'il inhibe les canaux calcium voltage-dépendants (Ca_v2.2) exprimés par les terminaisons neuronales présynaptiques et bloque la sécrétion des neurotransmetteurs au niveau de la moelle épinière. Les canaux calcium impliqués dans la neurotransmission sont également inhibés par d'autres conotoxines comme l' ω -CVID (dénommée leconotide/essai clinique en cours), l' ω -GVIA (dénommée SNX-124/essai clinique arrêté) et l' ω -SO-3 (brevetée sous embargo) [20,28,29]. À noter également que l' α -Vc1.1 pourrait moduler les récepteurs GABA_B dont l'expression est souvent présynaptique, permettant la régulation fine de la neurotransmission [30]. Le mode d'action de cette conotoxine responsable de l'effet analgésique reste cependant sujet à controverse, puisqu'elle cible également avec haute affinité un sous-type de récepteur nicotinique à l'acétylcholine de type neuronal (voir ci-après).

Plusieurs récepteurs postsynaptiques activés par des neurotransmetteurs modulant la réponse douloureuse peuvent être la cible des conotoxines. Le récepteur NMDA, bien connu pour son implication dans la sensibilisation centrale et la plasticité en général [31], est bloqué par les conantokines (c'est-à-dire conopeptides). L'action de la conantokine CGX-1007, isolée à partir de *Conus geographus*, a permis de réduire fortement les symptômes douloureux dans plusieurs modèles animaux de douleurs [32]. Son développement a été arrêté suite au dépôt de bilan de la compagnie promotrice (société Cognetix, Salt Lake City, Utah, États-Unis) malgré des résultats précliniques prometteurs. Moins puissant que le ziconotide, son index thérapeutique permettait en effet d'envisager un effet antinociceptif à une dose plus élevée [32].

Autres cibles potentielles

Le rôle des systèmes cholinergiques dans la modulation de la douleur aiguë et chronique est largement documenté [33]. Cette modulation implique des récepteurs nicotiques et muscariniques localisés dans des structures spinales et supraspinales du système nociceptif. Ces récepteurs sont également présents sur les cellules immunitaires périphériques (c'est-à-dire monocytes, macrophages, lymphocytes T et B) et centrales (c'est-à-dire microglies). Ils peuvent donc intervenir théoriquement dans la modulation de la composante inflammatoire de la douleur lorsqu'elle est présente. Pour les récepteurs nicotiques, de nombreux travaux ont été effectués sur les sous-types α 4 β 2, α 6 β 4, α 7 et α 9 [34]. L' α -conotoxine RgIA4, isolée à partir de *Conus regius*, inhibe le sous-type α 9 α 10 chez le rat et l'homme. Elle semble avoir un effet antinociceptif dans plusieurs modèles animaux de douleur [35–38]. L' α -conotoxine Vc1.1 semble également efficace pour réduire les symptômes douloureux dans les essais précliniques [30,39]. Ciblant également les sous-types α 9 α 10 du récepteur nicotinique, elle n'a cependant pas franchi les essais cliniques au-delà de la phase 2A pour une indication de douleur neuropathique [40]. La structure de la toxine a été retravaillée pour permettre une administration orale [41]. Dans un modèle de neuropathie chez le rat, 3 mg/kg de conotoxine cVc1.1 (forme cyclique administrée per os) provoque une analgésie semblable à un traitement de 30 mg/kg de gabapentine. Efficace sur les douleurs viscérales de la souris [42], son mécanisme d'action reste discuté avec un effet possible sur les récepteurs GABA_B.

La contulakine-G, isolée à partir du venin de *Conus geographus*, est un conopeptide qui partage une séquence C-terminal similaire à celle de la neurotensine dont le rôle analgésique est bien documenté [43,44]. La contulakine-G

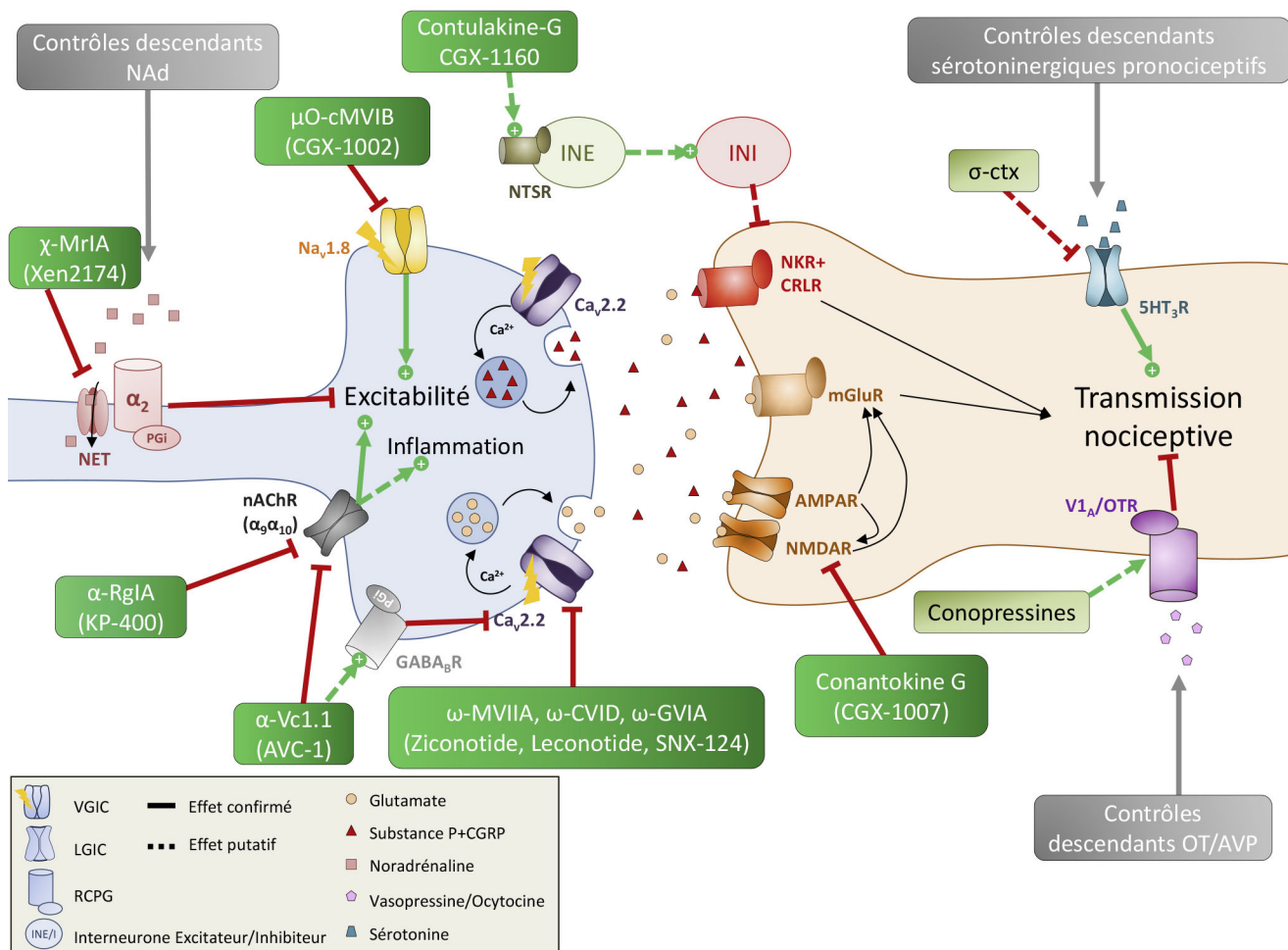


Fig. 2 Schéma illustrant les différentes cibles moléculaires des conotoxines/conopeptides (représentées en vert) aux synapses sensorispinales. Abréviations : VGIC : *voltage gated ionic channels* ; LGIC : *ligand gated ionic channels* ; RCPG : récepteur couplé aux protéines G ; NET : transporteur de la noradrénaline ; α₂ : récepteur adrénergique α₂ ; nAChR : récepteur nicotinique de l'acétylcholine ; Na_v et Ca_v : canaux sodium et calcium voltage dépendants ; GABA_BR : récepteur GABA_B ; NTSR : récepteur à la neurotensine ; NKR : récepteur à la neurokinine ; CRLR : récepteur *calcitonin-receptor like* ; mGluR : récepteur métabotrope du glutamate ; récepteur AMPA et NMDA du glutamate ; récepteur 5-HT₃ de la sérotonine ; récepteur V1_A de la vasopressine ; OTR : récepteur de l'ocytocine. Voir détails dans le texte

est donc considérée comme un analogue de la neurotensine, bien qu'ayant une affinité inférieure pour les récepteurs neurotensine de type 1 (humain, rat), type 2 (rat) et type 3 (souris) [45]. L'administration intrathécale de la contulakine-G synthétique (CGX-1160, non glycosylée) produit un effet antinociceptif supérieur à la morphine dans plusieurs modèles précliniques de douleurs tout en étant dépourvue d'effets adverses notables, en particulier sur le plan moteur [46,47]. Un premier essai de phase 1 chez l'homme a confirmé le potentiel analgésique du CGX-1160 après injection intrathécale [48]. Il sera cependant nécessaire de poursuivre cette évaluation avec un nombre de patients plus conséquent pour confirmer les premiers résultats encourageants obtenus. Le mécanisme par lequel la contulakine-G induit une analgésie

reste encore flou, car l'effet est atteint à une concentration 100 fois plus faible que son affinité de liaison pour le récepteur NTS1.

L'inhibition des transporteurs des monoamines par les antidépresseurs constitue un traitement de choix des douleurs neuropathiques. Le transporteur de la noradrénaline/norépinephrine semble être la cible privilégiée des χ -conotoxines MrIA et MrIB, isolées à partir de *Conus marmoreus* [49,50]. L'analogue synthétique Xen2174 de ces peptides inhibe de façon non compétitive et sélective le transporteur de la noradrénaline exprimé chez l'homme et le rat [51]. Après injection intrathécale, il réduit les symptômes douloureux neuropathiques [52] produits par une constriction chronique du nerf sciatique chez le rat. Son mécanisme d'action en

fait un composé très intéressant tout comme sa longue durée d'action après injection intrathécale. Après avoir amélioré sa stabilité, le composé Xen2174 a atteint les essais cliniques de phase 2B, mais les résultats n'ont pas satisfait les investisseurs

et les essais ont été stoppés. Il est à noter cependant que ces études reposaient sur des paradigmes de douleur aiguë et ne représentent pas forcément le potentiel thérapeutique du Xen2174 dans le traitement de douleurs chroniques [53].

Tableau 2 Potentiel thérapeutique des composés de venins de cônes			
Famille	Peptide	Cible	Application
ω-CTX	MVIIA, MVIIIC, GVIA	Ca _v 2.2, Ca _v 2.1 Ca _v 2.2, Ca _v 2.2 Cav1.3, Cav3	Diagnostic Lamber-Eaton Antiépileptique, anticonvulsant Sclérose en plaques
	MVIIA cyclisée	N/A	Antibactérien
α-CTX	α-MII, LvIA/LvD2	β2	Anxiété
	α3/5-CTX	α6, α3β2	Parkinson
	α-ImI	nAChRs neuronaux	Alzheimer
	α-TxIB, α-MII, LvIA/ LvD21	nAChRs musculaires	Bloquant neuromusculaire
	RgIA, ImI, GeXIVA	α9α10	Cancer
	Lo1a, LvIA/LvD21	α6β2, α3β2	Addiction
αAS-CTX	OIVA	α9α10 α7, α3β2 nAChRs sous-unité γ fœtale	Sclérose en plaques Schizophrénie, démences Outil diagnostique, transporteur de substances anticancéreuses
δ-CTX	δ-EVIA	Inhibition inactivation Na _v	Arythmie Épilepsie
μ-CTX	CnIIIC-A	Na _v 1.2, 1.6	Sclérose en plaques
		Na _v 1.4	Anesthésique/myorelaxant
		Na _v 1.5	Arythmie
		Na _v 1.2, 1.3, 1.7	Épilepsie
κ-CTX		K _v 11.1	Arythmie
		K _v 1.3	Immunosuppresseur
		K _v 1.3	Sclérose en plaques
σ-CTX	σ-GVIII A	5HT ₃ -R	IBS
ρ-CTX	ρ-TIA	α1 adrénergique	Antivomitif
		α1 _B	Hypertension
Conopressine		V1 _A	Neurodégénérescence apoptotique
Conodipine	Cdpi-P1 à P3 Cdpi-P1 à P3	Activité PLA ₂	Régulation pression sanguine
		Activité PLA ₂	Injection virale et bactérienne
		Activité PLA ₂	Activité hémolytique
		Activité PLA ₂	Cancer
		Activité PLA ₂	Schizophrénie
Con-ikot-ikot		AMPA	Alzheimer
		AMPA	Dysfonction cognitive
Conohyal	Conohyal-P1, Conohyal- Cn1	Acide hyaluronidique	Sclérose en plaques
		Acide hyaluronidique	Amélioration diffusion de substance Dermatologie, cosmétique, ophtalmologie, FIV
Conoinsuline	Con-Ins-G	IR (?)	Diabète
Conkunitzine	Conk-S1	K _v 1.7	Diabète
Peptidomimétiques		GLP1-R	Diabète
Conolysines	MxXXVIII A	Membrane plasmique	Cancer
Contryphans	Contryphan-R	SrtB	Antibactérien

Le rôle de la σ -conotoxine GVIIIA dans l'inhibition du récepteur canal cationique non sélectif 5-HT₃ a également été mis en évidence [54]. L'importance de ce récepteur canal a été démontrée dans l'intégration spinale de la douleur, car il contribue en effet à l'efficacité des contrôles descendants sérotoninergiques comme par exemple lors de la modulation conditionnée de la douleur [55,56]. Cette toxine possède dix cystéines (cinq ponts disulfure), un bromotryptophane et n'a jamais été synthétisée à ce jour, limitant son potentiel thérapeutique.

Pour terminer, l'émergence de nombreux travaux décrivant le rôle antalgique de l'ocytocine et de la vasopressine [57,58] rend pertinent de se pencher sur les conopressines G et S, isolées respectivement du venin de *Conus geographus* et de *Conus striatus* [59]. Leur injection intracérébroventriculaire entraîne une activité de grattage chez la souris qui n'est pas sans rappeler que les mécanismes nociceptifs partagent de nombreux points communs avec ceux du prurit [60]. Le mécanisme d'action des conopressines est encore mal connu, mais il semble affecter l'excitabilité neuronale et promouvoir les activités oscillatoires spontanées comme l'attestent les travaux sur l'escargot d'eau douce *Lymnaea stagnalis* [61]. La conopressine T, récemment isolée du venin de *Conus tulipa*, semble être un antagoniste entier des récepteurs V1_A de la vasopressine et un antagoniste partiel du récepteur de l'ocytocine (OTR) [62].

Perspectives thérapeutiques et conclusions

Le ziconotide fait partie des rares antalgiques qui ont pu être mis sur le marché ces dernières années pour traiter les douleurs intenses et réfractaires aux opioïdes. De nombreux autres peptides issus des cônes marins pourraient être utilisés compte tenu de leurs cibles moléculaires en lien avec la nociception. Malgré les difficultés évidentes liées à leur identification, leur purification, leur synthèse et leur optimisation, certains d'entre eux sont entrés en phase clinique avec un certain succès [63]. Comme souvent, certains auteurs, promoteurs après les essais précliniques, ont dû arrêter en raison de leur inefficacité chez l'homme ou de leur faible indice thérapeutique.

Les peptides bioactifs issus des cônes marins sont extrêmement nombreux et constituent une richesse incroyable pour l'étude des cibles moléculaires impliquées dans la nociception et le développement de nouveaux traitements contre la douleur mais également d'autres pathologies (Tableau 2). L'amélioration des techniques de purification et de synthèse devrait permettre des progrès à l'avenir si des solutions sont trouvées pour améliorer la biodisponibilité de ces peptides rapidement dégradés après administration in vivo, la capacité à traverser la BHE et les effets

secondaires délétères associés. Nul doute que ces obstacles pourraient être levés en identifiant les composés les plus prometteurs.

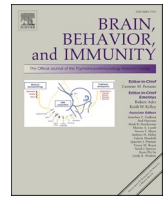
Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt.

Références

- Kohn A (1959) The ecology of *Conus* in Hawaii. *Ecol Monogr* 29:47–90
- Endean R, Rutkin C (1963) Studies of the venom of some Conidae. *Toxicon* 1:49–54
- Endean R, Rudkin C (1965) Further studies of the venoms of Conidae. *Toxicon* 2:225–49
- Olivera BM, McIntosh JM, Cruz LJ, et al (1984) Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from *Conus geographus* venom. *Biochemistry* 23:5087–90
- Rivier J, Galyean R, Gray WR, et al (1987) Neuronal calcium channel inhibitors. Synthesis of omega-conotoxin GVIA and effects on 45Ca uptake by synaptosomes. *J Biol Chem* 262:1194–8
- Kerr LM, Yoshikami D (1984) A venom peptide with a novel presynaptic blocking action. *Nature* 308:282–4
- Holz GG, Dunlap K, Kream RM (1988) Characterization of the electrically evoked release of substance P from dorsal root ganglion neurons: methods and dihydropyridine sensitivity. *J Neurosci* 8:463–71
- McGivern JG (2007) Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain. *Neuropsychiatr Dis Treat* 3:69–85
- Gohil K, Bell JR, Ramachandran J, Miljanich GP (1994) Neuroanatomical distribution of receptors for a novel voltage-sensitive calcium-channel antagonist, SNX-230 (omega-conopeptide MVIIC). *Brain Res* 653:258–66
- Lewis RJ, Dutertre S, Vetter I, Christie MJ (2012) *Conus* venom peptide pharmacology. *Pharmacol Rev* 64:259–98
- Miljanich GP (2004) Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain. *Curr Med Chem* 11:3029–40
- Bowersox SS, Gadbois T, Singh T, et al (1996) Selective N-type neuronal voltage-sensitive calcium channel blocker, SNX-111, produces spinal antinociception in rat models of acute, persistent and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 279:1243–9
- Staats PS, Yearwood T, Charapata SG, et al (2004) Intrathecal ziconotide in the treatment of refractory pain in patients with cancer or AIDS: a randomized controlled trial. *JAMA* 291:63–70
- Wallace MS, Charapata SG, Fisher R, et al (2006) Intrathecal ziconotide in the treatment of chronic nonmalignant pain: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Neuro-modulation* 9:75–86
- Webster LR, Fakata KL, Charapata S, et al (2008) Open-label, multicenter study of combined intrathecal morphine and ziconotide: addition of morphine in patients receiving ziconotide for severe chronic pain. *Pain Med* 9:282–90
- Safavi-Hemami H, Brogan SE, Olivera BM (2019) Pain therapeutics from cone snail venoms: from ziconotide to novel non-opioid pathways. *J Proteomics* 190:12–20
- Atanassoff PG, Hartmannsgruber MW, Thrasher J, et al (2000) Ziconotide, a new N-type calcium channel blocker, administered intrathecally for acute postoperative pain. *Reg Anesth Pain Med* 25:274–8
- Webster LR, Fisher R, Charapata S, Wallace MS (2009) Long-term intrathecal ziconotide for chronic pain: an open-label study. *J Pain Symptom Manage* 37:363–72

19. Yu S, Li Y, Chen J, et al (2019) TAT-modified omega-Conotoxin MVIIA for crossing the blood-brain barrier. *Mar Drugs* 17:286
20. Scott DA, Wright CE, Angus JA (2002) Actions of intrathecal omega-conotoxins CVID, GVIA, MVIIA, and morphine in acute and neuropathic pain in the rat. *Eur J Pharmacol* 451:279–86
21. Dutertre S, Jin AH, Vetter I, et al (2014) Evolution of separate predation- and defence-evoked venoms in carnivorous cone snails. *Nat Commun* 5:3521
22. Bingham JP, Mitsunaga E, Bergeron ZL (2010) Drugs from slugs—past, present and future perspectives of omega-conotoxin research. *Chem Biol Interact* 183:1–18
23. Bennett DL, Woods CG (2014) Painful and painless channelopathies. *Lancet Neurol* 13:587–99
24. Cardoso FC, Lewis RJ (2018) Sodium channels and pain: from toxins to therapies. *Br J Pharmacol* 175:2138–57
25. Green BR, Catlin P, Zhang MM, et al (2007) Conotoxins containing nonnatural backbone spacers: cladistic-based design, chemical synthesis, and improved analgesic activity. *Chem Biol* 14:399–407
26. Ekberg J, Jayamanne A, Vaughan CW, et al (2006) muO-conotoxin MrVIB selectively blocks Na_v1.8 sensory neuron specific sodium channels and chronic pain behavior without motor deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17030–5
27. de Araujo AD, Callaghan B, Nevin ST, et al (2011) Total synthesis of the analgesic conotoxin MrVIB through selenocysteine-assisted folding. *Angew Chem Int Ed Engl* 50:6527–9
28. Dai Q, Liu F, Zhou Y, et al (2003) The synthesis of SO-3, a conopeptide with high analgesic activity derived from *Conus striatus*. *J Nat Prod* 66:1276–9
29. Wen L, Yang S, Qiao H, et al (2005) SO-3, a new O-superfamily conopeptide derived from *Conus striatus*, selectively inhibits N-type calcium currents in cultured hippocampal neurons. *Br J Pharmacol* 145:728–9
30. Sandall DW, Satkunanathan N, Keays DA, et al (2003) A novel alpha-conotoxin identified by gene sequencing is active in suppressing the vascular response to selective stimulation of sensory nerves in vivo. *Biochemistry* 42:6904–11
31. Poisbeau P (2016) Spinal cord mechanisms in acute and chronic pain states. In: Sommer CL, Wallace MS, Cohen SP, et al (eds). *Pain 2016: refresher courses*. International Association for the Study of Pain (IASP Press), Washington DC, USA, pp 15–21
32. Malmberg AB, Gilbert H, McCabe RT, Basbaum AI (2003) Powerful antinociceptive effects of the cone snail venom-derived subtype-selective NMDA receptor antagonists conantokin G and T. *Pain* 101:109–16
33. Naser PV, Kuner R (2018) Molecular, cellular and circuit basis of cholinergic modulation of pain. *Neuroscience* 387:135–48
34. Hone AJ, McIntosh JM (2018) Nicotinic acetylcholine receptors in neuropathic and inflammatory pain. *FEBS Lett* 592:1045–62
35. Vincler M, Wittenauer S, Parker R, et al (2006) Molecular mechanism for analgesia involving specific antagonism of alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17880–4
36. Di Cesare Mannelli L, Cinci L, Micheli L, et al (2014) Alpha-conotoxin RgIA protects against the development of nerve injury-induced chronic pain and prevents both neuronal and glial derangement. *Pain* 155:1986–95
37. Romero HK, Christensen SB, Di Cesare Mannelli L, et al (2017) Inhibition of alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptors prevents chemotherapy-induced neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E1825–E1832
38. Huynh PN, Giuvelis D, Christensen S, et al (2019) RgIA4 Accelerates recovery from paclitaxel-induced neuropathic pain in rats. *Mar Drugs* 18(1):12
39. Satkunanathan N, Livett B, Gayler K, et al (2005) Alpha-conotoxin Vc1.1 alleviates neuropathic pain and accelerates functional recovery of injured neurones. *Brain Res* 1059:149–58
40. Azam L, McIntosh JM (2012) Molecular basis for the differential sensitivity of rat and human alpha9alpha10 nAChRs to alpha-conotoxin RgIA. *J Neurochem* 122:1137–44
41. Clark RJ, Jensen J, Nevin ST, et al (2010) The engineering of an orally active conotoxin for the treatment of neuropathic pain. *Angew Chem Int Ed Engl* 49:6545–8
42. Castro J, Grundy L, Deiteren A, et al (2018) Cyclic analogues of alpha-conotoxin Vc1.1 inhibit colonic nociceptors and provide analgesia in a mouse model of chronic abdominal pain. *Br J Pharmacol* 175:2384–98
43. Clineschmidt BV, McGuffin JC (1977) Neurotensin administered intracisternally inhibits responsiveness of mice to noxious stimuli. *Eur J Pharmacol* 46:395–6
44. Kleczkowska P, Lipkowski AW (2013) Neurotensin and neurotensin receptors: characteristic, structure-activity relationship and pain modulation: a review. *Eur J Pharmacol* 716:54–60
45. Craig AG, Norberg T, Griffin D, et al (1999) Contulakin-G, an O-glycosylated invertebrate neurotensin. *J Biol Chem* 274:13752–59
46. Allen JW, Hofer K, McCumber D, et al (2007) An assessment of the antinociceptive efficacy of intrathecal and epidural contulakin-G in rats and dogs. *Anesth Analg* 104:1505–13 (table of contents)
47. Kern SE, Allen J, Wagstaff J, et al (2007) The pharmacokinetics of the conopeptide contulakin-G (CGX-1160) after intrathecal administration: an analysis of data from studies in beagles. *Anesth Analg* 104:1514–20 (table of contents)
48. Sang CN, Barnabe KJ, Kern SE (2016) Phase IA clinical trial evaluating the tolerability, pharmacokinetics, and analgesic efficacy of an intrathecally administered neurotensin A analogue in central neuropathic pain following spinal cord injury. *Clin Pharmacol Drug Dev* 5:250–8
49. Bryan-Lluka LJ, Bonisch H, Lewis RJ (2003) Chi-Conopeptide MrIA partially overlaps desipramine and cocaine binding sites on the human norepinephrine transporter. *J Biol Chem* 278:40324–9
50. Sharpe IA, Palant E, Schroeder CI, et al (2003) Inhibition of the norepinephrine transporter by the venom peptide chi-MrIA. Site of action, Na⁺ dependence, and structure-activity relationship. *J Biol Chem* 278:40317–23
51. Sharpe IA, Gehrmann J, Loughnan ML, et al (2001) Two new classes of conopeptides inhibit the alpha1-adrenoceptor and norepinephrine transporter. *Nat Neurosci* 4:902–7
52. Nielsen CK, Lewis RJ, Alewood D, et al (2005) Anti-allodynic efficacy of the chi-conopeptide, Xen2174, in rats with neuropathic pain. *Pain* 118:112–24
53. Okkerse P, Hay JL, Sitsen E, et al (2017) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intrathecally administered Xen2174, a synthetic conopeptide with norepinephrine reuptake inhibitor and analgesic properties. *Br J Clin Pharmacol* 83:751–63
54. England LJ, Imperial J, Jacobsen R, et al (1998) Inactivation of a serotonin-gated ion channel by a polypeptide toxin from marine snails. *Science* 281:575–8
55. Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM (1979) Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. *Pain* 6:283–304
56. Bannister K, Patel R, Goncalves L, et al (2015) Diffuse noxious inhibitory controls and nerve injury: restoring an imbalance between descending monoamine inhibitions and facilitations. *Pain* 156:1803–11
57. Juif PE, Poisbeau P (2013) Neurohormonal effects of oxytocin and vasopressin receptor agonists on spinal pain processing in male rats. *Pain* 154:1449–56

58. Poisbeau P, Grinevich V, Charlet A (2018) Oxytocin signaling in pain: cellular, circuit, system, and behavioral levels. *Curr Top Behav Neurosci* 35:193–211
59. Cruz LJ, de Santos V, Zafaralla GC, et al (1987) Invertebrate vasopressin/oxytocin homologs. Characterization of peptides from *Conus geographus* and *Conus straitus* venoms. *J Biol Chem* 262:15821–4
60. Akiyama T, Carstens E (2014) Spinal coding of itch and pain. In: Carstens E, Akiyama T (eds) *Itch: mechanisms and treatment*. Boca Raton (FL):CRC Press/Taylor & Francis
61. van Soest PF, Kits KS (1998) Conopressin affects excitability, firing, and action potential shape through stimulation of transient and persistent inward currents in molluscan neurons. *J Neurophysiol* 79:1619–32
62. Dutertre S, Croker D, Daly NL, et al (2008) Conopressin-T from *Conus tulipa* reveals an antagonist switch in vasopressin-like peptides. *J Biol Chem* 283:7100–8
63. Gao B, Peng C, Yang J, et al (2017) Cone snails: a big store of conotoxins for novel drug discovery. *Toxins* 9:397



Overexpression of chloride importer NKCC1 contributes to the sensory-affective and sociability phenotype of rats following neonatal maternal separation

Géraldine Gazzo, Meggane Melchior, Andréa Caussaint, Clémence Gieré, Vincent Lelièvre, Pierrick Poisbeau*

Centre National de la Recherche Scientifique and University of Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, 67000 Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Neonatal maternal separation
Oxytocin
Pain
Chloride homeostasis
Anxiety
Sociability

ABSTRACT

Background: Early life stress is known to affect the development of the nervous system and its function at a later age. It increases the risk to develop psychiatric disorders as well as chronic pain and its associated affective comorbidities across the lifespan. GABAergic inhibition is important for the regulation of central function and related behaviors, including nociception, anxiety or social interactions, and requires low intracellular chloride levels. Of particular interest, the oxytocinergic (OTergic) system exerts potent anxiolytic, analgesic and prosocial properties and is known to be involved in the regulation of chloride homeostasis and to be impaired following early life stress.

Methods: We used behavioral measures to evaluate anxiety, social interactions and pain responses in a rat model of neonatal maternal separation (NMS). Using quantitative PCR, we investigated whether NMS was associated with alterations in the expression of chloride transporters in the cerebrum and spinal cord. Finally, we evaluated the contribution of OTergic signaling and neuro-inflammatory processes in the observed phenotype.

Results: NMS animals displayed a long-lasting upregulation of chloride importer Na-K-Cl cotransporter type 1 (NKCC1) expression in the cerebrum and spinal cord. Neonatal administration of the NKCC1 inhibitor bumetanide or oxytocin successfully normalized the anxiety-like symptoms and the lack of social preference observed in NMS animals. Phenotypic alterations were associated with a pro-inflammatory state which could contribute to NKCC1 upregulation.

Conclusions: This work suggests that an impaired chloride homeostasis, linked to oxytocin signaling dysfunction and to neuro-inflammatory processes, could contribute to the sensory-affective phenotype following NMS.

1. Introduction

Early life stress induces long-term consequences on brain functions, neuroendocrine reactivity and behaviors (Weinstock, 2001; Talge et al., 2007; Bolton et al., 2017). During the early life, the intense neurodevelopmental plasticity is essential for optimal brain maturation but renders the brain particularly vulnerable to environmental influences. From a developmental point of view, cerebral maturation of the rat at birth is similar to that of the human fetus at the beginning of the third trimester of gestation (Romijn et al., 1991). This period coincides in particular with the maturation of the nociceptive system (Verriotis et al., 2016) and with the maturation of chloride homeostasis, underlying a shift from excitatory to inhibitory GABA function (Rivera et al., 1999;

Stil et al., 2009). Two chloride transporters concentrate most of the attention: the cellular membrane expressed chloride ion importer NKCC1 (Na-K-Cl cotransporter type 1) and the chloride ion exporter KCC2 (K-Cl cotransporter type 2), which are responsible for chloride import and export in neural cells, respectively. This maturation process is associated with the release of neurotransmitters involved in the setting of emotions and psychosocial behaviors, such as oxytocin (OT), which are claimed to be inefficient in some neurodevelopmental disorders associated with increased anxiety or autistic spectrum disorders (Young and Barrett, 2015; Gottschalk and Domschke, 2018; Tobon et al., 2018).

In line, many of the neuropsychiatric symptoms associated with neurodevelopmental disorders may result from reduced brain inhibition

* Corresponding author at: Institute of Cellular and Integrative Neuroscience, CNRS UPR-3212, 8 allée du Général Rouvillois, 67000 Strasbourg, France.

E-mail address: poisbeau@inci-cnrs.unistra.fr (P. Poisbeau).

<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.12.010>

Received 10 September 2020; Received in revised form 4 December 2020; Accepted 8 December 2020

Available online 11 December 2020

0889-1591/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

and an alteration of transmembrane chloride fluxes through GABA_A and glycine receptor channels (Doyon et al., 2016). In particular, functional alterations of NKCC1 and KCC2 transporters seem involved in chronic pain states (Kaila et al., 2014). Downregulation of KCC2 and/or increases in NKCC1 activity, inducing synaptic disinhibition in the dorsal horn of the spinal cord, play a major role in the development and maintenance of pain symptoms (Sung et al., 2000; Coull et al., 2003; Galan and Cervero, 2005; Nomura et al., 2006; Valencia-de Ita et al., 2006; Miletic and Miletic, 2008; Zhang et al., 2008; Hasbargen et al., 2010; Eto et al., 2012; Janssen et al., 2012; Chen et al., 2014; Okada-Ogawa et al., 2015). If the underlying mechanisms of action are still under investigation, evidence suggests a strong link between chloride homeostasis and neuro-inflammatory processes, which actively regulate chloride transporter expression and function (Kaila et al., 2014). In the context of neuropathic pain, it was suggested that activated microglia could release brain-derived neurotrophic factor which could contribute to KCC2 downregulation in spinal neurons and allodynia, even if these results are still controversial (Coull et al., 2005). Furthermore, NKCC1 levels are regulated by inflammatory cytokines and growth factors like tumor necrosis factor- α (TNF- α) (Huang et al., 2014; Weidenfeld and Kuebler, 2017), which can lead to an altered GABAergic activity following inflammatory insults (Price et al., 2005).

Interestingly, disruption of chloride homeostasis due to genetic variation and/or alteration of chloride transporter expression is also seen in several neuropsychiatric disorders, such as schizophrenia (Lewis et al., 2003; Hyde et al., 2011; Sullivan et al., 2015), depressive disorder (Tao et al., 2012), autistic spectrum disorders (Merner et al., 2015) and other affective disorders. In animal models of autistic spectrum disorders, alteration of the excitatory/inhibitory balance is observed (Gibson et al., 2008; Goncalves et al., 2013) and associated with a prolonged depolarizing effect of GABA in juvenile animals (Tyzio et al., 2014). It is also worth mentioning that OT-mediated GABA inhibition during delivery is abolished in these models and contributes to the autistic spectrum disorders-like phenotype (Tyzio et al., 2014). Altogether, these studies strongly suggest that abnormal GABAergic transmission is involved in the pathology of several neuropsychiatric and affective disorders (Luscher et al., 2011; Sibille et al., 2011).

Neonatal maternal separation (NMS) is a well-established animal model of early-life stress in which pups are separated from the dam during the early postnatal period. Long-term consequences of NMS include alterations of the stress response characterized by hyper-reactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, anxiety-like symptoms (Plotsky and Meaney, 1993), and social deficits (Lukas et al., 2011; Holland et al., 2014). If visceral hypersensitivity has been commonly observed after NMS (Chung et al., 2007; Moloney et al., 2015), our laboratory also recently demonstrated the presence of long-lasting somatic hypersensitivities to thermal hot and mechanical stimuli (Juif et al., 2016) as well as a deficit in OTergic analgesic controls (Melchior et al., 2018).

While OT appears to be a critical determinant in the long-term consequences of NMS on pain responses and associated comorbidities (Melchior et al., 2018), it has also been involved in chloride homeostasis during development. Early OT signaling enables neuronal maturation through upregulation of KCC2 expression counteracting the function of NKCC1 (Leonzino et al., 2016). As reviewed recently, OT-mediated analgesia mainly relies on an increased GABAergic inhibition in the spinal cord (Poisbeau et al., 2018), and can for example be activated after a forced swim stress (Wotjak et al., 1998; Melchior et al., 2018). This helps to understand that an alteration of chloride homeostasis could impair the beneficial action of OT via chloride mediated GABA_A receptor-channels (Bonin and De Koninck, 2013).

In this study, we used behavioral measures to evaluate the long-term consequences of NMS on the sensory-affective components of pain in adult rats. Complementary to our previous results (Juif et al., 2016; Melchior et al., 2018), we investigated whether impaired chloride transporter expression and OT signaling might contribute to the

observed alteration in pain sensitivity and associated affective comorbidities and investigated a possible link with underlying inflammatory reactivity.

2. Methods and materials

2.1. Animals

Pregnant female Wistar rats (Chronobiotron, Strasbourg, France) were used in this study and carefully monitored for delivery. Day of birth was referred to as postnatal day 0 (P0). Mother and pups were housed in a temperature (22 °C) and humidity (50 ± 20%) controlled room, under a 12 h light–dark cycle (lights on at 7:00 am), with *ad libitum* access to food and tap water. Pups were weaned at P21 and housed in collective cages according to sex. Males and females were used in this study, and results were pooled when no sex-specific difference was observed. All procedures were conducted in accordance with EU regulations and approved by the regional ethical committee (CREMEAS authorization numbers APAFIS#7678–20 16,112,223,027,528 v2 and APAFIS#10215–201706131614598 v3).

2.2. Neonatal maternal separation protocol

Dams and their litter were randomly assigned to the control or NMS group upon parturition. Litters from the NMS group were separated from their home cage for three hours per day, from postnatal day 2 (P2) to postnatal day 12 (P12), and placed in a separate room under a heating lamp to maintain their temperature. Litters from the control group remained undisturbed.

2.3. Behavioral testing

Animals were tested between P45 and P55 and chosen randomly in at least two different litters. Experiments were performed during the light phase, between 9:00a.m. and 4:00p.m. Prior to behavioral testing, animals were habituated to the experimenter with three days of handling.

2.3.1. Evaluation of anxiety-like symptoms with the elevated plus maze

Apparatus consisted in two open arms (45 × 10 cm) and two closed arms (walls 30 cm high) arranged in a plus shape and elevated at a height of 50 cm. Animals were placed in the center of the elevated plus maze with their head facing the open arm opposite the experimenter. Animals were video-tracked for 5 min and analyzed with the ANY-maze 5.2 software (Ugo Basile, Gemonio, Italy).

2.3.2. Evaluation of sociability with the three-chamber test

Apparatus consisted in three chambers (80 × 40 × 40 cm) connected by doors (15 × 10 cm). Rats were placed in the center chamber and left to freely explore the apparatus for habituation. After 10 min, an empty cylindrical wire box was placed in one of the side compartments, and a similar box containing a stranger animal (previously habituated to the box) was placed in the other side compartment. Time spent in both compartments was video recorded during 10 min and analyzed using the ANY-maze 5.2 software (Ugo Basile, Gemonio, Italy) to assess sociability.

2.3.3. Evaluation of mechanical nociception with the calibrated forceps

Habituated rats were loosely restrained with a towel masking their eyes. Tips of the calibrated forceps (Bioseb, Vitrolles, France) were placed at each side of the hindpaw, and a gradually increasing force was applied until withdrawal of the paw, following a validated procedure (Luis-Delgado et al., 2006). Pressure eliciting withdrawal of the paw was considered as the mechanical nociceptive threshold value.

2.3.4. Swim stress-induced OTergic analgesia

Rats were exposed to a forced swim stress protocol known to induce

recruitment of OTergeric descending controls of pain (Wotjak et al., 1998; Melchior et al., 2018). Animals were placed in a Plexiglas™ cylinder (diameter 30 cm) filled with 20 °C water. After 10 min, rats were gently dried. Mechanical nociceptive thresholds were assessed before the swim and 15 min afterwards using calibrated forceps. Stress-induced analgesia was evaluated as the delta between threshold values after and before exposure to swim stress.

2.4. Nerve tissue sampling and RT-qPCR

The lumbar segment of the spinal cord was collected as well as the cerebrum (cerebral hemispheres and diencephalon), reconstituted in a guanidine thiocyanate/ β -mercaptoethanol preparation using ultraturax and stored at -80 °C. Total RNA was extracted using a protocol adapted from the original procedure of Chomczynski and Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987) consisting in 2 independent total RNA extractions separated by a DNase I treatment (TURBO™ DNase; Ambion, Life technologies, Saint Aubin, France), as previously described in detail (Lelievre et al., 2002). 800 ng RNA were reverse transcribed with the RT iScript kit (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Quantitative PCR was performed using SYBR Green Supermix (Bio-Rad), on the iQ5 Real Time PCR System (Bio-Rad). Amplifications were carried out in 42 cycles (20 s at 95 °C, 20 s at 60 °C, and 20 s at 72 °C). Standardization was done using standard curves made from serial dilutions of samples, and amplification data are shown as relative gene expression, calculated as the ratio between cDNA concentration of the gene of interest and that of the housekeeping gene. Here, hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase (HPRT) was selected as the housekeeping gene since its transcripts remained highly stable among the different samples. Primer sets for all genes of interest were designed using Oligo6.0 and M-fold softwares (primer sequences in Supplementary Table 1). Samples were accurately dispensed in duplicates using a robotic workstation (Freedom EVO100; Tecan, Lyon, France), and amplification efficacy given by standard curves was always close to 100% ($\pm 2\%$), while amplification specificity was assessed by a melting curve study.

2.5. Pharmacological treatments

Neonatal treatments: Drugs were freshly prepared each day and administered to pups from P2 to P12, at the start of the NMS protocol (for bumetanide [BTD] and OT), and for half of the litter at a time in control animals (VU0463271) in order to avoid maternal stress and prolonged withdrawal from the home cage. The NKCC1 inhibitor BTD (Merck, USA) was dissolved in mineral oil and administered subcutaneously (s.c.; 10 μ L / 10 g of animal weight) at a final dose of 0.5 mg / kg. OT (Bachem, Switzerland) was diluted in NaCl 0.9% to reach the dose of 1 mg / kg and injected intraperitoneally (i.p.; 0.1 mL / 10 g of animal weight). The KCC2 inhibitor VU0463271 (Tocris Bioscience, UK) was dissolved in 20% dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck, USA) and 80% mineral oil and injected s.c. at a dose of 2 mg / kg.

Adult treatment: In a subset of experiments, BTD was diluted in 10% DMSO and injected intrathecally (i.t.; 90 μ g / 20 μ L) in NMS animals. Animals were then subjected to pain assessment 30 min after i.t. injection.

2.6. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6 software (La Jolla, USA). For each experiment, normal distribution of values was verified with the Shapiro-Wilk normality test prior to performing parametric analysis. One-way analysis of variance tests (ANOVA) followed by Tukey's post hoc multiple comparison test was used to compare anxiety-like symptoms, nociceptive thresholds and efficacy of stress-induced analgesia between groups. Two-way (condition \times chamber) ANOVA (2wANOVA) followed by Sidak's post hoc test was used to

assess social preference in the three-chamber test. 2wANOVA (condition \times time) was used to compare transcript expression of several genes at different time points and followed by Sidak or Tukey's post hoc test. Differences were considered to be statistically significant for $p < 0.05$.

3. Results

3.1. NMS-induced alterations in chloride transporter expression in the cerebrum and spinal cord

To highlight possible alterations in chloride homeostasis in the cerebrum and spinal cord of NMS rats, we analyzed the expression of chloride transporters NKCC1 and KCC2, responsible for most of the chloride import and export in neural cells, respectively (Fig. 1).

As shown in Fig. 1A, NKCC1 mRNA expression in the cerebrum was significantly higher in NMS animals (2wANOVA, condition \times time, $F_{(3,32)} = 11.46$, $p < 0.0001$) from P14 (CTRL: 1.49 ± 0.05 ; NMS: 2.30 ± 0.07) to P100 (CTRL: 0.54 ± 0.05 ; NMS: 0.94 ± 0.07). In the case of KCC2, mRNA expression in the cerebrum was significantly lower in NMS animals (2wANOVA, condition \times time, $F_{(3,40)} = 4.83$, $p = 0.0058$) from P24 (CTRL: 1.66 ± 0.03 ; NMS: 1.34 ± 0.04) to P45 (CTRL: 2.12 ± 0.07 ; NMS: 1.65 ± 0.06), but not at P14 (CTRL: 1.30 ± 0.05 ; NMS: 1.13 ± 0.1) nor P100 (CTRL: 2.25 ± 0.10 ; NMS: 2.25 ± 0.04). We also used the spinal cord as a target tissue being at the crossroads of ascending pain information processing, descending modulatory control and behavioral motor responses (including autonomic). As shown in Fig. 1B, spinal NKCC1 mRNA expression was significantly higher in NMS animals (2wANOVA, condition \times time, $F_{(3,24)} = 29.50$, $p < 0.0001$) from P14 (CTRL: 1.30 ± 0.05 ; NMS: 1.92 ± 0.09) to P100 (CTRL: 0.54 ± 0.03 ; NMS: 1.13 ± 0.07). In comparison to NKCC1, we found no significant difference in KCC2 transcript expression at any of the ages studied (Fig. 1A; 2wANOVA, condition \times time, $F_{(3,24)} = 0.828$, $p = 0.4914$). Accordingly, the ratio in favor of NKCC1 likely suggests an alteration in the maturation of chloride homeostasis and reduced spinal and supraspinal inhibition in NMS animals.

To illustrate the functional consequences of NKCC1 overexpression on the NMS phenotype, we evaluated the effect of a single i.t. injection of BTD (90 μ g/20 μ L) on the previously described nociceptive hypersensitivity in NMS animals at adulthood (Juif et al., 2016). Intrathecal BTD induced a significant increase in mechanical nociceptive thresholds 30 min after injection, from 283.0 ± 8.18 g to 383.13 ± 16.88 g (Fig. 2A; 1wANOVA, $F_{(3,36)} = 37.16$, $p < 0.0001$). Mean mechanical thresholds however still remained significantly lower in BTD-injected NMS animals compared to controls (428.1 ± 31.6 g). In CTRL animals, BTD did not change baseline mechanical thresholds.

We also evaluated if NKCC1 overexpression could be involved in the alteration of the OTergeric analgesic controls that we recently described with a protocol of stress-induced analgesia (Melchior et al., 2018). Here, i.t. BTD injection had no significant effect in CTRL animals but fully restored OTergeric analgesia, as demonstrated by the significant increase in nociceptive thresholds (1wANOVA, $F_{(3,29)} = 13.71$, $p < 0.0001$) observed 15 min after the swim stress (Fig. 2B; CTRL: delta 261.78 ± 18.65 g; NMS: 17.88 ± 11.66 g; NMS after BTD i.t.: 257.25 ± 55.56 g). These results strongly suggest that the alteration of chloride homeostasis due to NKCC1 hyperactivity contributes to the NMS nociceptive phenotype as well as failure of OTergeric analgesic controls.

3.2. Neonatal treatment with BTD

To confirm the critical role of chloride transporters in complex supraspinal behaviors and in the ontogeny of the NMS phenotype, we treated NMS pups with BTD from P2 to P12 and evaluated their anxiety and social behavior at adulthood (Fig. 3).

NMS animals showed at P45 a significant decrease in the time spent in the open arms of an elevated plus maze (Fig. 3A; 1wANOVA, $F_{(3,51)} = 11.92$, $p < 0.0001$) compared to controls (CTRL: 89.43 ± 9.54 s; NMS:

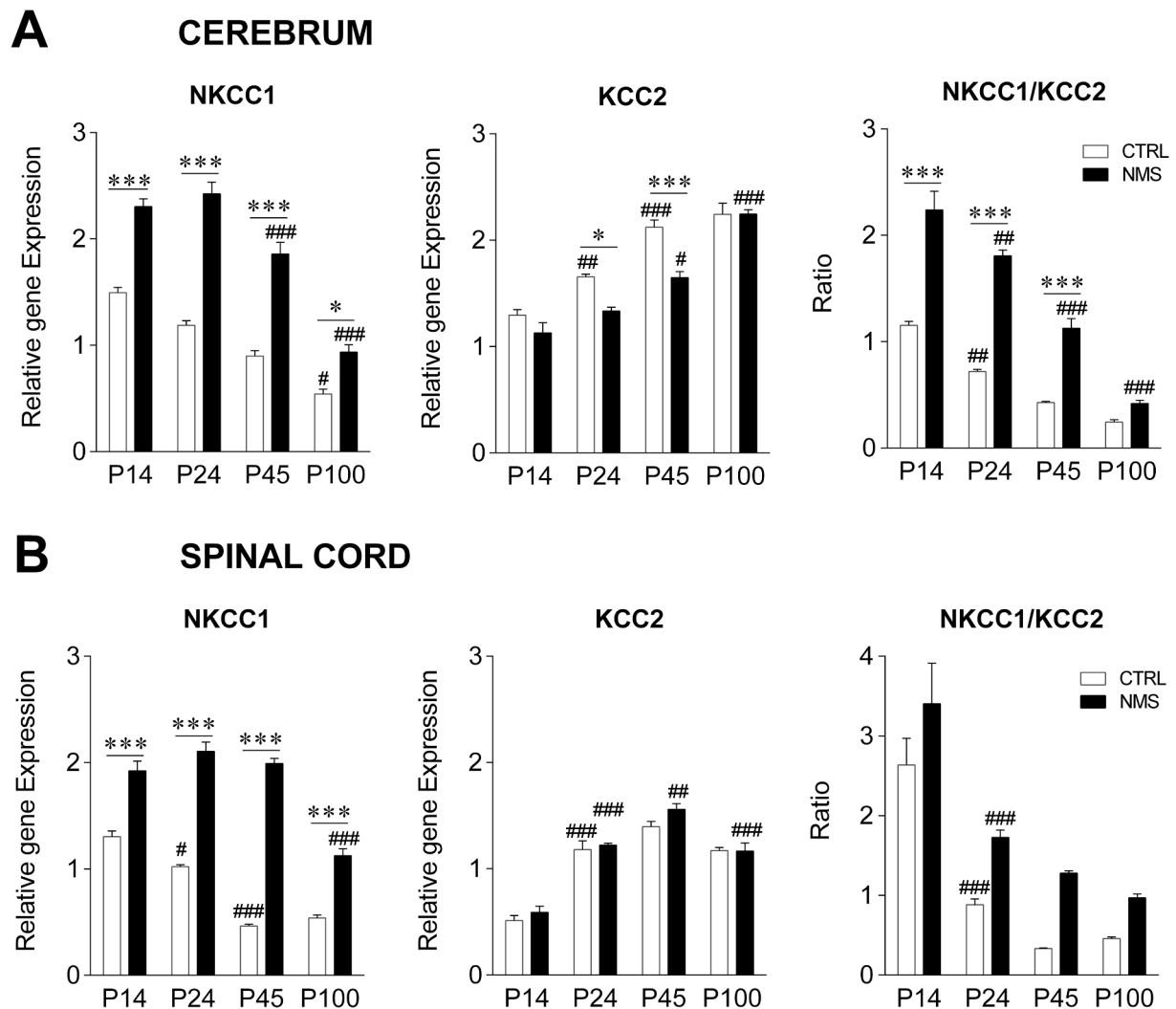


Fig. 1. Changes in relative expression of spinal transcripts coding for NKCC1 and KCC2 in CTRL and NMS animals as measured with RT-qPCR from P14 to P100 in the cerebrum (A; $n = 6$ per group) and spinal cord (B; $n = 4$ per group), and the corresponding ratio of NKCC1/KCC2 expression. A. NMS was associated with a significant increase in cerebral NKCC1 mRNA expression at all time points measured and to a decrease in KCC2 at P24 and P45. B. NMS was associated with a significant increase in spinal NKCC1 mRNA expression at all time points measured and no change in spinal KCC2 mRNA expression. Statistical significance was assessed with Sidak's multiple comparison post-hoc test, illustrated as follows: $p < 0.005$ (*) or $p < 0.001$ (***) for CTRL vs NMS and $p < 0.005$ (#), $p < 0.01$ (##) or $p < 0.001$ (###) for intragroup comparison vs preceding time point.

36.92 ± 8.76 s), suggesting increased anxiety-like symptoms of NMS rats as described in the literature. Neonatal BTd treatment restored mean values that were similar with those of controls (NMS + BTd: 92.91 ± 6.53 s).

In the three-chamber test, we found that NMS animals did not display any significant social preference and spent as much time in the animal- and object-containing chambers (Fig. 3B; time spent with the new animal 255.3 ± 27.92 s, time spent with new objects 256.2 ± 33.55 s, preference ratio 1.27 ± 0.17). This was in sharp contrast with the control group (time spent with the new animal 318.3 ± 14.56 s, time spent with the new object 180.9 ± 10.48 s, preference ratio 1.99 ± 0.20 ; 2wANOVA, condition \times chamber, $F_{(3,108)} = 8.936$, $p < 0.0001$). Interestingly, neonatal BTd treatment fully restored social interactions, with animals displaying again a marked preference for the animal-containing chamber compared to the object-containing one, (time spent with the new animal 311.4 ± 27.63 s, time spent with new objects 179.9 ± 23.02 s, preference ratio of 2.2 ± 0.44 s).

In another set of experiments, we evaluated if KCC2 inhibition would be sufficient to induce NMS-like consequences in control animals. We thus performed neonatal injections of the KCC2 inhibitor VU0463271 (s.c.; 2 mg/kg) from P2 to P12 in control pups. As shown in Fig. 3, we found

that neonatal blockade of KCC2 resulted in anxiety-like symptoms similar to those observed in NMS animals. Both groups displayed a reduced time spent in the open arm (Fig. 3A; CTRL + VU: 46.83 ± 5.39 s). In contrast, VU0463271 neonatal treatment of CTRL animals failed to result in any alterations in social interactions (Fig. 3B; time spent with the new animal 366.9 ± 10.82 s, time spent with new objects 144.2 ± 9.91 s, preference ratio 2.7 ± 0.26).

3.3. Neonatal OT treatment rescues NMS-induced alterations of the affective phenotype

As mentioned above, NMS rats exhibited long-lasting nociceptive hypersensitivity and a blunted adaptation to stressful conditions associated with impaired OTerGic stress-induced analgesia, which could be restored with neonatal OT treatment (Melchior et al., 2018). After neonatal OT treatment, NMS animals displayed mean nociceptive thresholds similar to control animals, as measured with the calibrated forceps, and a fully functional analgesia after forced swim stress. In an effort to strengthen the crucial role of OT in the neurodevelopment and maintenance of optimal chloride homeostasis, we analyzed the consequence of a neonatal OT treatment on the affective phenotype in NMS

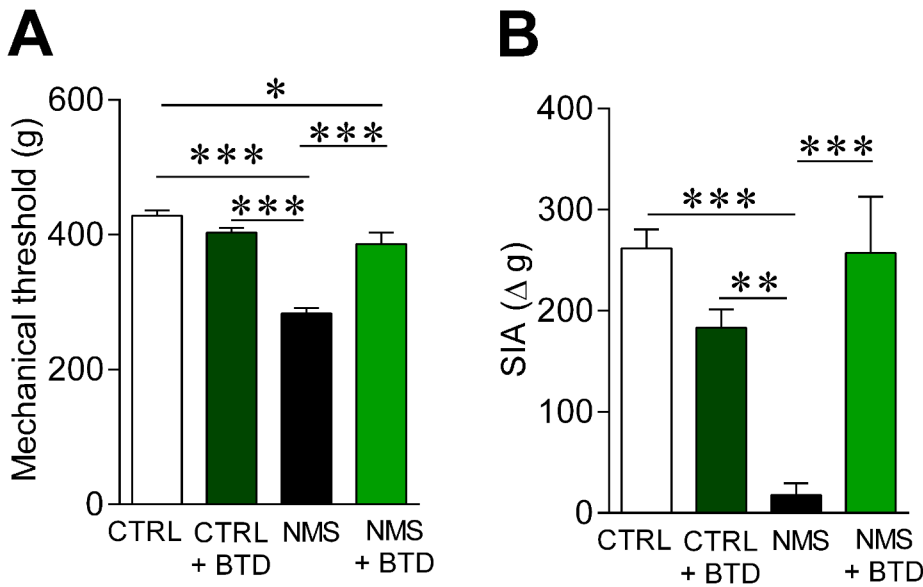


Fig. 2. Effect of a single i.t. BTD injection at adulthood (90 μg/20 μL) on mechanical nociception and OT analgesia induced by swim stress (n = 8 per group). A. Intrathecal BTD in NMS animals induced a rapid increase in mechanical nociceptive thresholds as evaluated with calibrated forceps. B. Intrathecal BTD in NMS animals restored OTergetic stress-induced analgesia (SIA). Statistical significance was assessed with Tukey’s multiple comparison test, illustrated as follows: p < 0.01 (**) or p < 0.001 (***).

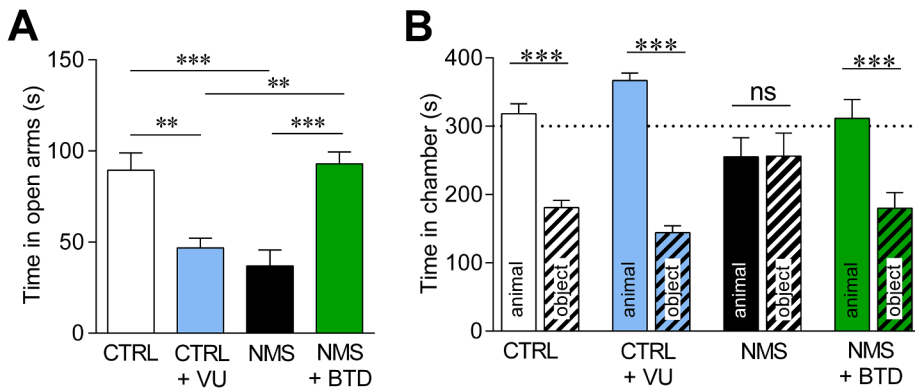


Fig. 3. Effect of a neonatal treatment with BTD (0.5 mg/kg, s.c.) in NMS animals and VU0463271 (2 mg/kg, s.c.) in CTRL animals on anxiety-like symptoms and social interactions at adulthood. A. Neonatal BTD treatment in NMS animals restores CTRL values on the time spent in the open arms of an elevated plus maze at P45, while VU0463271 induces anxiety-like symptoms in CTRL animals (CTRL: n = 17, CTRL + VU: n = 10, NMS: n = 13, NMS + BTD: n = 15). Statistical significance was assessed with Tukey’s multiple comparison test, illustrated as follows: p < 0.01 (**) or p < 0.001 (***). B. NMS-induced social preference deficit in the three-chamber test can be restored with neonatal BTD treatment, but neonatal VU0463271 failed to induce social interaction deficits in CTRL animals (CTRL: n = 22, CTRL + VU: n = 11, NMS: n = 14, NMS + BTD: n = 11). Statistical significance was assessed with Sidak’s multiple comparison test, illustrated as follows: p < 0.001 (***).

animals, evaluating anxiety levels and sociability.

In the elevated plus maze, OT-treated NMS animals displayed a mean time spent in the open arms similar to that of the control group at P45

(Fig. 4A; CTRL: 89.43 ± 9.54 s; NMS + OT: 73.53 ± 6.44 s), in sharp contrast with the anxiety-like profile observed in NMS animals (1wANOVA, $F_{(2,41)} = 9.611$; p = 0.0004). Neonatal OT treatment also

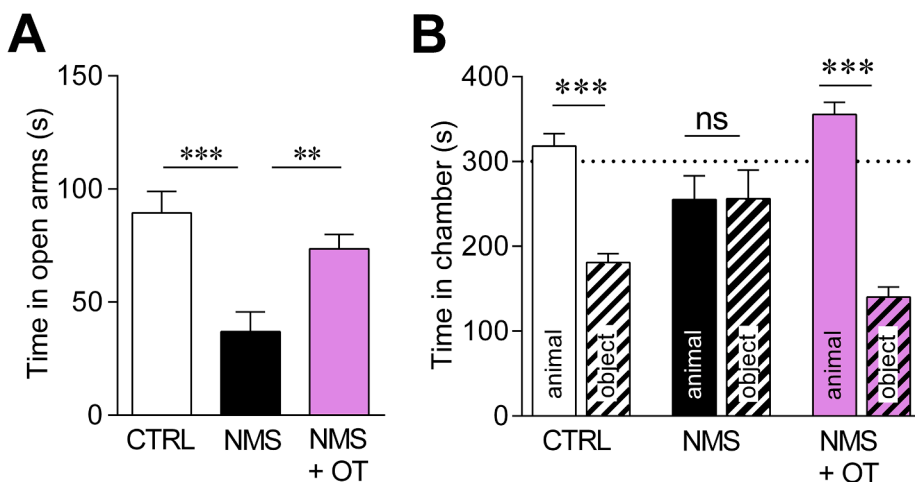


Fig. 4. Neonatal treatment with OT (1 mg/kg, i.p.) from P2 to P12 can rescue NMS-induced anxiety-like symptoms and social interaction deficits. A. Neonatal OT treatment in NMS animals restores CTRL values on the time spent in the open arms of an elevated plus maze at P45 (CTRL: n = 17, NMS: n = 13, NMS + OT: n = 14). Statistical significance was assessed with Tukey’s multiple comparison post-hoc test, illustrated as follows: p < 0.01 (**) or p < 0.001 (***). B. NMS induces a deficit in social preference in the three-chamber test, which can be restored with neonatal OT treatment (CTRL: n = 22, NMS: n = 14, NMS + OT: n = 14). Statistical significance was assessed with Sidak’s multiple comparison post-hoc test, illustrated as follows: p < 0.001 (***).

fully restored social preference values in the three-chamber test (2wANOVA, condition \times chamber, $F_{(1,94)} = 14.20$; $p < 0.0001$; time spent with the new animal 355.4 ± 14.33 s, time spent with new objects 140.1 ± 12.16 s, preference ratio 2.9 ± 0.40).

3.4. NMS leads to a pro-inflammatory state

As chloride transporter levels can be regulated by inflammatory factors (Huang et al., 2014; Kaila et al., 2014; Weidenfeld and Kuebler, 2017), we analyzed the expression of several inflammatory mediators in the cerebrum and spinal cord as possible underlying molecular mechanisms contributing to the altered maturation of chloride transporter in NMS animals (Figs. 5 and 6).

In the cerebrum, interleukin-1 α (IL-1 α) levels were not different between groups (Fig. 5A, 2wANOVA, condition \times time, $F_{(3,40)} = 0.576$; $p = 0.6341$), but we found a transient up-regulation in interleukin-1 β (IL-1 β), detected only at P24 (Fig. 5B; 2wANOVA, condition \times time, $F_{(3,40)} = 44.32$; $p < 0.0001$), and a durable up-regulation of interleukin-6 (IL-6; Fig. 5C; 2wANOVA, condition \times time, $F_{(3,40)} = 4.150$; $p = 0.0119$) from P14 to P100 in NMS animals, and of TNF- α from P14 to P45 (Fig. 5D; 2wANOVA, condition \times time, $F_{(3,40)} = 10.23$; $p < 0.0001$). Cyclooxygenase-2 (Cox-2) levels were also higher in NMS animals from P24 until adulthood (Fig. 5E; 2wANOVA, condition \times time, $F_{(3,40)} = 28.68$; $p < 0.0001$). As a mirror image with the changes of pro-

inflammatory mediators, levels of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 (IL-10) were decreased at P24 and P45 in NMS animals (Fig. 5F; 2wANOVA, condition \times time, $F_{(3,40)} = 8.364$; $p = 0.0002$).

In the spinal cord, IL-1 α levels were also not different between groups (Fig. 6A; 2wANOVA, condition \times time, $F_{(3,24)} = 0.581$; $p = 0.6672$), but we found a durable upregulation of IL-1 β (Fig. 6B; 2wANOVA, condition \times time, $F_{(3,32)} = 12.29$; $p < 0.0001$) and IL-6 (Fig. 6C; 2wANOVA, condition \times time, $F_{(3,32)} = 25.86$; $p < 0.0001$) transcripts from P14 to P100 in NMS animals. TNF- α mRNA levels were significantly higher in the early postnatal period (Fig. 6D; 2wANOVA, condition \times time, $F_{(3,24)} = 7.121$; $p = 0.0014$), while spinal Cox-2 levels were significantly higher in NMS animals from P24 until adulthood (Fig. 6E; 2wANOVA, condition \times time, $F_{(3,32)} = 25.61$; $p < 0.0001$). Levels of IL-10 were decreased throughout all times assessed (Fig. 6F; 2wANOVA, condition \times time, $F_{(3,32)} = 11.81$; $p < 0.0001$).

These results likely suggest a pro-inflammatory state in the nervous system of NMS animals, possibly explaining the tonic deleterious action of increased NKCC1 activity on anxiety, social and nociceptive behaviors.

4. Discussion

This work provides functional evidence indicating that NMS induces long-term alterations of the sensory-affective state in adult rats. As

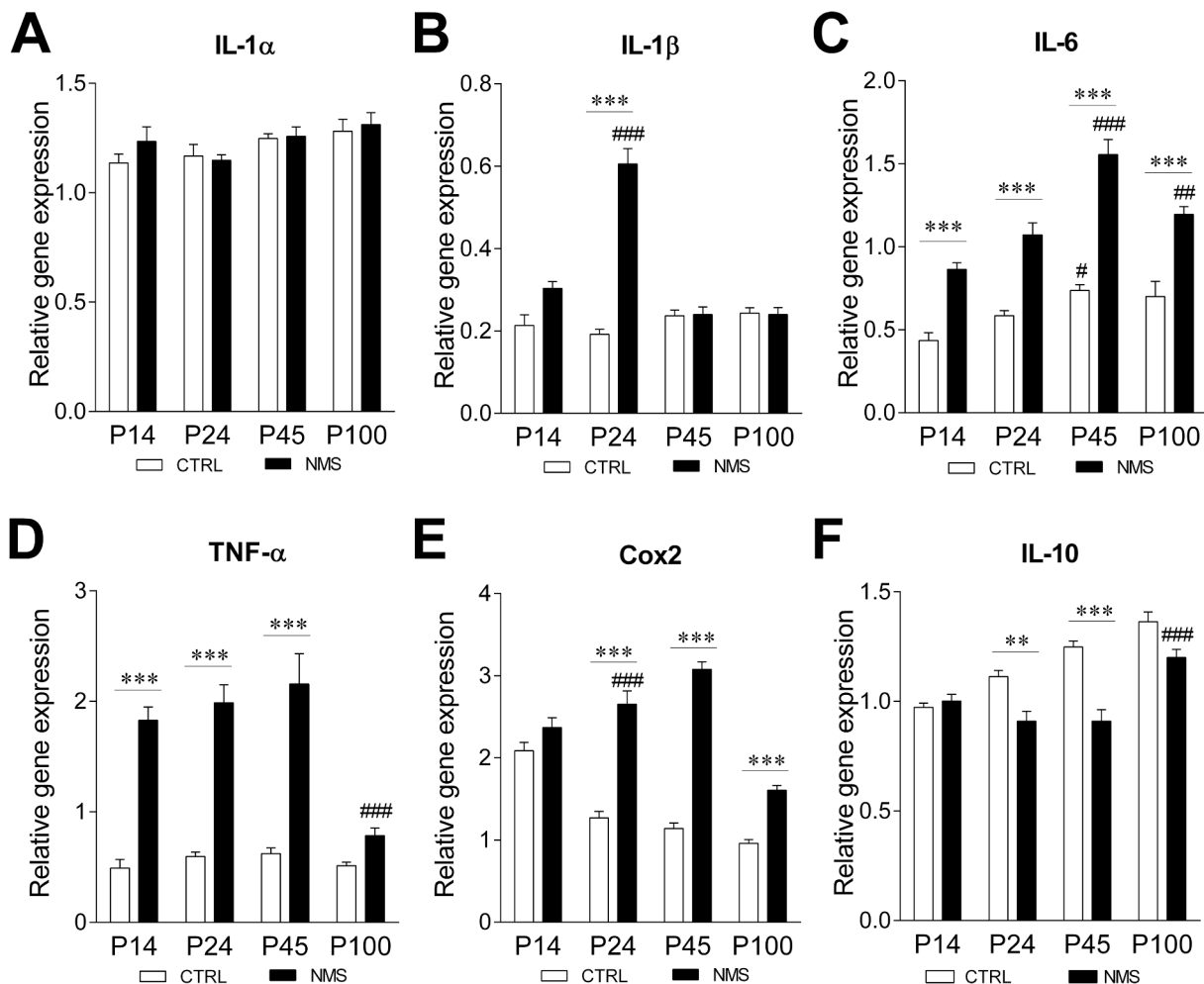


Fig. 5. Relative gene expression (gene of interest / housekeeping gene HPRT) of several inflammatory mediators in cerebrum of CTRL and NMS rats as measured by RT-qPCR: interleukin-1 α (A, $n = 6$ per group), interleukin-1 β (B, $n = 6$ per group), interleukin-6 (C, $n = 6$ per group), tumor necrosis factor α (D, $n = 6$ per group), cyclooxygenase-2 (E, $n = 6$ per group) and interleukin-10 (F, $n = 6$ per group). Statistical significance was assessed with Tukey's multiple comparison post-hoc test, illustrated as follows: $p < 0.01$ (**) or $p < 0.001$ (***) for CTRL vs NMS and $p < 0.05$ (#), $p < 0.01$ (##) or $p < 0.001$ (###) for intragroup comparison vs preceding time point.

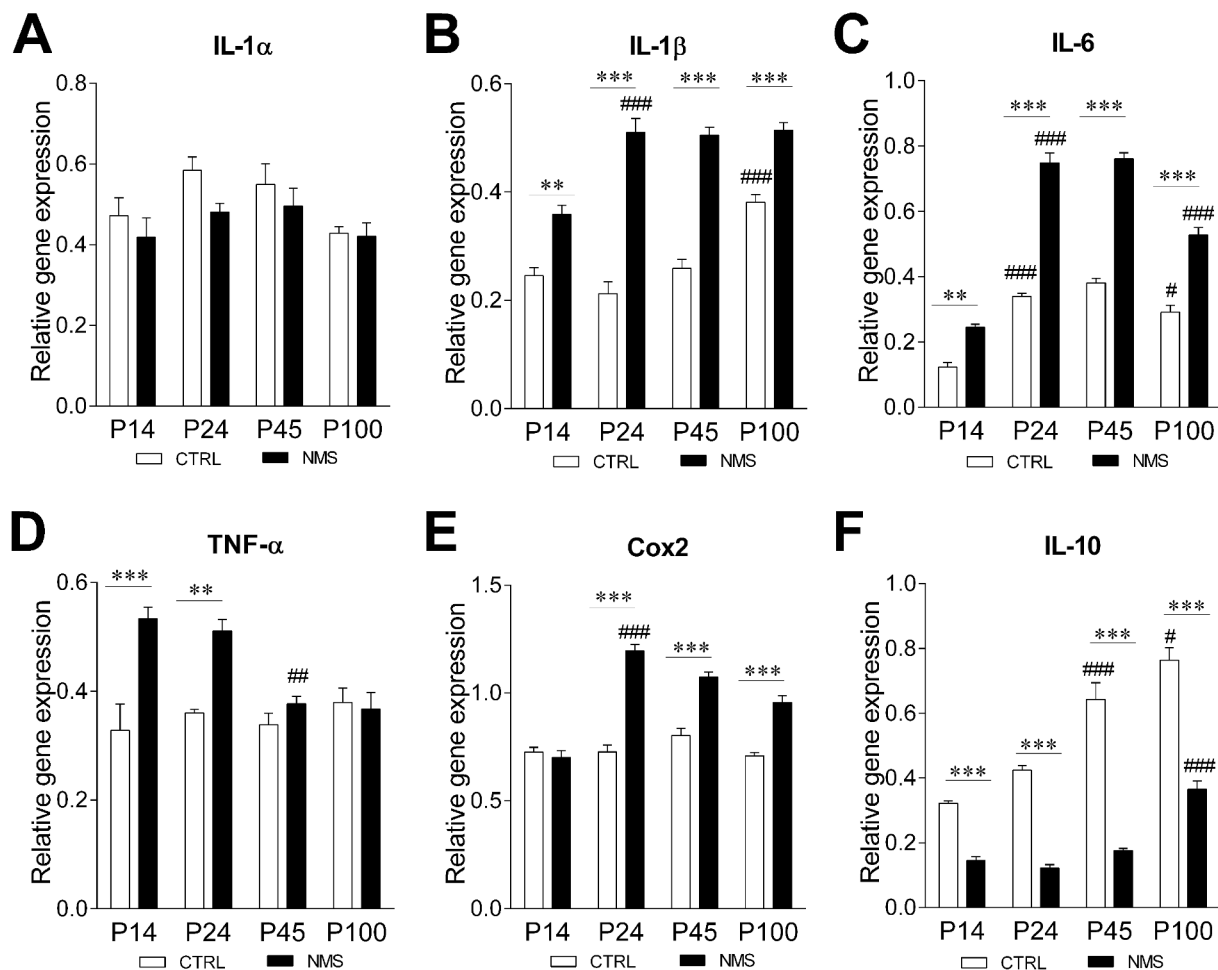


Fig. 6. Relative gene expression (gene of interest / housekeeping gene HPRT) of several inflammatory mediators in the spinal cord of CTRL and NMS rats as measured by RT-qPCR: interleukin-1 α (A, n = 4 per group), interleukin-1 β (B, n = 5 per group), interleukin-6 (C, n = 5 per group), tumor necrosis factor α (D, n = 4 per group), cyclooxygenase-2 (E, n = 5 per group) and interleukin-10 (F, n = 5 per group). Statistical significance was assessed with Tukey's multiple comparison post-hoc test, illustrated as follows: p < 0.01 (**), p < 0.001 (***) for CTRL vs NMS and p < 0.05 (#), p < 0.01 (##) or p < 0.001 (###) for intragroup comparison vs preceding time point.

illustrated by the overexpression of the NKCC1 chloride importer in the spinal and supraspinal levels and by the benefits of its neonatal blockade by BTM, we propose these long-term alterations to result from a dysregulated chloride homeostasis. A reduced inhibitory control in the central nervous system as a result of over-expression of pro-inflammatory mediators could be responsible for the expression of somatic hypersensitivities to pain, increased anxiety and sociability impairments. Based on our results and on the recent literature in the field, we propose neonatal OT deficits to be a critical determinant for these symptoms. A summary of this working hypothesis is shown in Fig. 7.

In early life, chloride homeostasis is subjected to critical developmental changes, controlling the switch from depolarizing to hyperpolarizing GABAergic currents (Wang et al., 2002; Watanabe and Fukuda, 2015). In the spinal cord, GABA action matures during the first 3 postnatal weeks (Cordero-Erausquin et al., 2005). In supraspinal regions a developmental GABA shift has been observed around P8-10 (Tyzio et al., 2007). Following NMS, this neonatal shift in chloride homeostasis and GABAergic function seems impaired. In particular, transcripts coding for the chloride importer NKCC1 are durably upregulated suggesting a prolonged immaturity state of neurons and reduced GABAergic inhibition in the cerebrum and spinal cord. The increase in KCC2 levels seems delayed in the cerebrum of NMS animals, with lower levels at P24 and P45 compared to control animals, but not in the spinal cord. This delayed shift has been previously observed in the hippocampus of NMS mice and was linked to a decreased KCC2 expression

(Furukawa et al., 2017). Similarly, following a single episode of NMS combined with neonatal anesthesia, rats displayed a long lasting increase in hypothalamic NKCC1 expression and decrease in KCC2 (Ju et al., 2017).

These observations may explain the nociceptive hypersensitivity, anxiety and impaired sociability phenotype of NMS rats. Corroborating our results, gain of function of NKCC1 is also observed in several neuropathic pain models (Hasbargen et al., 2010; Chen et al., 2014) as well as in neuropsychiatric disorders such as schizophrenia (Merner et al., 2016). Similarly, in a model of chemotherapy-induced neuropathic pain, BTM treatment attenuated pain symptoms (Chen et al., 2014). It is also important to note that the impaired behaviors are not suggested to be linked to an altered motor function, which might affect the performance in the elevated-plus maze or three-chamber test. Many studies have demonstrated that NMS animals display similar weight gain as CTRL animals, have similar performance in the rotarod test, and travel similar distances in the open field test, confirming that NMS animals display normal motor function and were able to perform the behavioral tasks (Paternain et al., 2012; Toda et al., 2014; Tata et al., 2015).

In our study, inhibiting NKCC1 function with BTM during the neonatal period successfully normalized the affective phenotype in NMS animals. This is consistent with previous studies in which the depressive and anxiety-like behavior of early-life stressed animals were rescued by neonatal BTM treatment, together with the expression of chloride

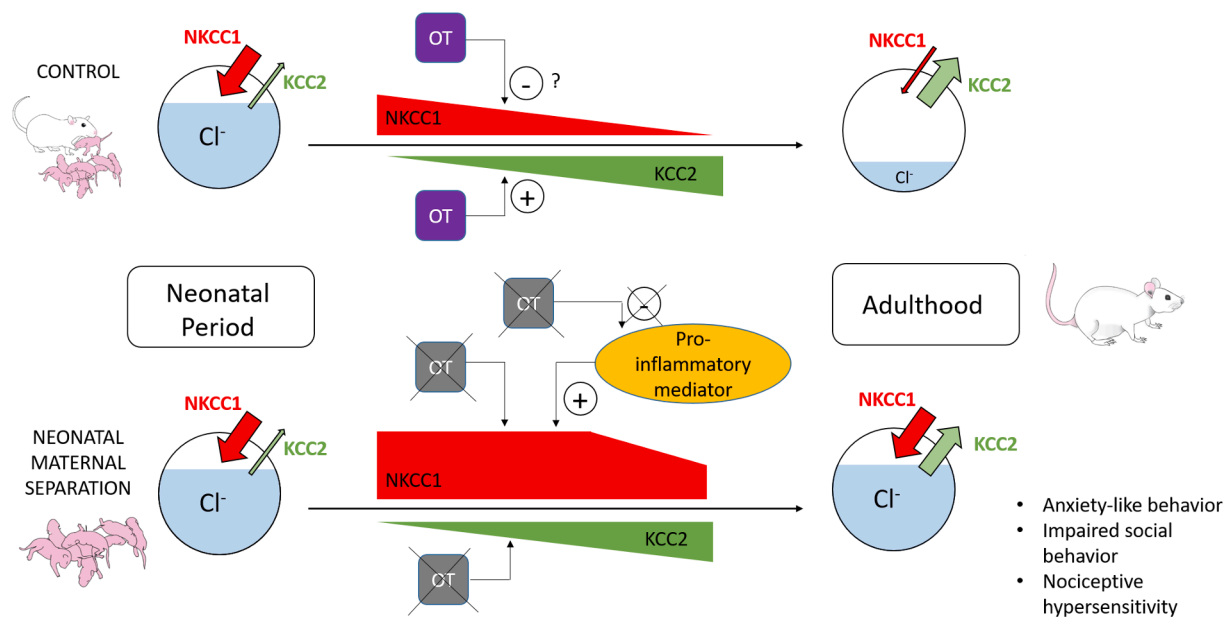


Fig. 7. Proposed mechanism to explain the behavioral impairment detected at adulthood following neonatal maternal separation. The over-expression of pro-inflammatory factors and deficit in oxytocin in the neonatal period is suggested to dysregulate the ratio between NKCC1 and KCC2 transporter expression/function in favor of NKCC1. This may lead to an imbalance in chloride homeostasis in spinal and supraspinal nervous structures.

transporters in the hypothalamus (Ju et al., 2017) or in the hippocampus (Hu et al., 2017). Clinical trials have also highlighted the therapeutic potential of BTB to improve social behaviors in children with autistic spectrum disorders (Lemonnier et al., 2012). Altogether, disruption of chloride homeostasis appears as a key player in the apparition of several sensori-affective disorders commonly associated with early-life stress.

Based on the well-demonstrated analgesic properties of OT and our recent results demonstrating that neonatal OT is a key determinant of mechanical and thermal hot nociception (Melchior et al., 2018), we show here that neonatal OT also rescues anxiety and social deficits resulting from NMS. It is well known that OT has anxiolytic properties (Gottschalk and Domschke, 2018) and may be useful to treat psychosocial deficits following early-life stress, such as autistic spectrum disorders-like signs (Yamasue and Domes, 2018). Indeed, skin to skin contact, favoring OT release (Hardin et al., 2020), has been proven to relieve pain and to have beneficial consequences on the social and behavioral outcomes of preterm birth (Johnston et al., 2003; Charpak et al., 2017). Our working hypothesis is that OT levels could be reduced following NMS, possibly because of an alteration of maternal care, and could impact the proper development of chloride homeostasis and GABAergic function. In good agreement with this idea, early-life stress in humans has been associated with reduced endogenous OT in the cerebrospinal fluid (Heim et al., 2009). A link between OT and chloride homeostasis has been demonstrated in the past as OT stimulates the upregulation of KCC2 exporters optimizing the inhibitory action of GABAergic neurons (Leonzino et al., 2016). In a mouse model, the effect of OT on the GABAergic shift in hippocampal and neocortical neurons at birth has been shown to be mimicked and occluded by BTB, suggesting a possible involvement of NKCC1 (Khazipov et al., 2008). In our study, we could not link the NMS phenotype and associated deficit in OT with an altered expression of KCC2 in the spinal cord but showed a transient decrease in KCC2 levels until P45 in the cerebrum, suggesting that OT is indeed a critical determinant of chloride transporter function and chloride homeostasis.

Moreover, NKCC1 expression and function has sometimes been shown to be altered in the spinal cord following inflammation, in particular in animal models of inflammatory pain (Zhang et al., 2008). In our study, we found that several pro-inflammatory cytokines are upregulated as well as the inducible Cox-2 favoring the synthesis of

prostaglandins E2. Together with the downregulation of anti-inflammatory IL-10, it is then tempting to speculate that this “sub-inflammatory state” is tonically maintaining high levels of NKCC1, being responsible for the NMS phenotype. This working hypothesis is further supported by several reports indicating that NKCC1 expression and activity is definitely regulated by inflammatory processes including those driven by microglia (Morales-Aza et al., 2004; Hasbargen et al., 2010; Huang et al., 2014; Weidenfeld and Kuebler, 2017). It is thus worth mentioning that OT possesses potent anti-inflammatory properties and is involved in the development, function and regulation of the immune system (Li et al., 2016). Recently, a study has demonstrated that intrathecal injection of OT relieved bone cancer pain symptoms in a rat model by suppressing the upregulation of several proinflammatory cytokines in the spinal cord (Mou et al., 2020). Administration of carbetocin, a selective agonist of the OT receptor, has also been shown to reduce microglial activation, providing a long-term neuroprotection following perinatal brain injury (Mairesse et al., 2019), highlighting the benefits of OT signaling in the limitation of neuro-inflammatory processes. Of course, the main limit of our study is that the direct link between OT, inflammatory factors, and NKCC1 expression has not been investigated so far. Further studies would then be required to evaluate the effect of a neonatal OT treatment on inflammatory factors levels in the different brain areas, as well as the activation state of astrocytes and microglia. Another possibility would be to evaluate the impact of adult and/or neonatal treatments of NMS animals with anti-inflammatory factors on their later behavior and chloride transporters levels.

After NMS, we propose that neonatal OT deficits impair chloride homeostasis favoring the activity of NKCC1, indirectly via upregulation of inflammatory mediators. Further experiments will be necessary to identify the detailed molecular pathway involved in nerve cells of newborns. This proposal is strongly supported by the neonatal effect of BTB and OT on pain hypersensitivity, anxiety and sociability. Further experiments would thus be necessary to assess chloride balance in supraspinal regions in which OT acts on anxiety and social behavior, such as the amygdala or the bed nucleus of the stria terminalis.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial

interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We thank Stéphane Doridot and Edouard Gottschalk for providing animal care at the Chronobiotron facility and our past collaborators, Pierre-Eric Juif and Adrien Lacaud, who contributed to the project at its early stage. This work was funded by Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg and Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC 2019). Dr Gazzo and Dr Melchior were supported by a PhD scholarship from the French Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur at the time of the study. PP is a senior fellow of the Institut Universitaire de France. We thank the following research programs of excellence for their support: FHU Neurogeny, Fondation Université de Strasbourg through the Strasbourg Pain Initiative and French National Research Agency (ANR) through the Programme d'Investissement d'Avenir (contract ANR-17-EURE-0022, EURIDOL Graduate school of pain).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.12.010>.

References

- Bolton, J.L., Molet, J., Ivy, A., Baram, T.Z., 2017. New insights into early-life stress and behavioral outcomes. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 14, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2016.12.012>.
- Bonin, R.P., De Koninck, Y., 2013. Restoring ionotropic inhibition as an analgesic strategy. *Neurosci. Lett.* 557, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.09.047>.
- Charpak, N., Tessier, R., Ruiz, J.G., Hernandez, J.T., Uriza, F., Villegas, J., Nadeau, L., Mercier, C., Maheu, F., Marin, J., Cortes, D., Gallego, J.M., Maldonado, D., 2017. Twenty-year Follow-up of Kangaroo Mother Care Versus Traditional Care. *Pediatrics* 139 (1), e20162063. <https://doi.org/10.1542/peds.2016-2063>.
- Chen, S.R., Zhu, L., Chen, H., Wen, L., Laumet, G., Pan, H.L., 2014. Increased spinal cord Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter-1 (NKCC1) activity contributes to impairment of synaptic inhibition in paclitaxel-induced neuropathic pain. *J. Biol. Chem.* 289, 31111–31120.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 (1), 156–159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2).
- Chung, E.K.Y., Zhang, X.-J., Xu, H.-X., Sung, J.J.Y., Bian, Z.-X., 2007. Visceral hyperalgesia induced by neonatal maternal separation is associated with nerve growth factor-mediated central neuronal plasticity in rat spinal cord. *Neuroscience* 149 (3), 685–695. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.07.055>.
- Cordero-Erausquin, M., Coull, J.A., Boudreau, D., Rolland, M., De Koninck, Y., 2005. Differential maturation of GABA action and anion reversal potential in spinal lamina I neurons: impact of chloride extrusion capacity. *J. Neurosci.* 25, 9613–9623.
- Coull, J.A.M., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S.A., Nault, F., Sfik, A., Koninck, P.D., Koninck, Y.D., 2003. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 424 (6951), 938–942. <https://doi.org/10.1038/nature01868>.
- Coull, J.A.M., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M.W., De Koninck, Y., 2005. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438 (7070), 1017–1021. <https://doi.org/10.1038/nature04223>.
- Doyon, N., Vinay, L., Prescott, S.A., De Koninck, Y., 2016. Chloride Regulation: A Dynamic Equilibrium Crucial for Synaptic Inhibition. *Neuron* 89, 1157–1172.
- Eto, K., Ishibashi, H., Yoshimura, T., Watanabe, M., Miyamoto, A., Ikenaka, K., Moorhouse, A.J., Nabekura, J., 2012. Enhanced GABAergic activity in the mouse primary somatosensory cortex is insufficient to alleviate chronic pain behavior with reduced expression of neuronal potassium-chloride cotransporter. *J. Neurosci.* 32, 16552–16559.
- Furukawa, M., Tsukahara, T., Tomita, K., Iwai, H., Sonomura, T., Miyawaki, S., Sato, T., 2017. Neonatal maternal separation delays the GABA excitatory-to-inhibitory functional switch by inhibiting KCC2 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 493, 1243–1249.
- Galan, A., Cervero, F., 2005. Painful stimuli induce in vivo phosphorylation and membrane mobilization of mouse spinal cord NKCC1 co-transporter. *Neuroscience* 133, 245–252.
- Gibson, J.R., Bartley, A.F., Hays, S.A., Huber, K.M., 2008. Imbalance of neocortical excitation and inhibition and altered UP states reflect network hyperexcitability in the mouse model of fragile X syndrome. *J. Neurophysiol.* 100, 2615–2626.
- Goncalves, J.T., Anstey, J.E., Golshani, P., Portera-Cailliau, C., 2013. Circuit level defects in the developing neocortex of Fragile X mice. *Nat. Neurosci.* 16, 903–909.
- Gottschalk, M.G., Domschke, K., 2018. Oxytocin and Anxiety Disorders. *Curr. Top Behav. Neurosci.* 35, 467–498.
- Hardin, J.S., Jones, N.A., Mize, K.D., Platt, M., 2020. Parent-Training with Kangaroo Care Impacts Infant Neurophysiological Development & Mother-Infant Neuroendocrine Activity. *Infant Behav. Dev.* 58, 101416.
- Hasbargen, T., Ahmed, M.M., Miranpuri, G., Li, L., Kahle, K.T., Resnick, D., Sun, D., 2010. Role of NKCC1 and KCC2 in the development of chronic neuropathic pain following spinal cord injury. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1198, 168–172.
- Heim, C., Young, L.J., Newport, D.J., Mletzko, T., Miller, A.H., Nemeroff, C.B., 2009. Lower CSF oxytocin concentrations in women with a history of childhood abuse. *Mol. Psychiatry* 14, 954–958.
- Holland, F.H., Ganguly, P., Potter, D.N., Chartoff, E.H., Brenhouse, H.C., 2014. Early life stress disrupts social behavior and prefrontal cortex parvalbumin interneurons at an earlier time-point in females than in males. *Neurosci. Lett.* 566, 131–136.
- Hu, D., Yu, Z.L., Zhang, Y., Han, Y., Zhang, W., Lu, L., Shi, J., 2017. Bumetanide treatment during early development rescues maternal separation-induced susceptibility to stress. *Sci. Rep.* 7, 11878.
- Huang, L.Q., Zhu, G.F., Deng, Y.Y., Jiang, W.Q., Fang, M., Chen, C.B., Cao, W., Wen, M.Y., Han, Y.L., Zeng, H.K., 2014. Hypertonic saline alleviates cerebral edema by inhibiting microglia-derived TNF-alpha and IL-1beta-induced Na-K-Cl Cotransporter up-regulation. *J. Neuroinflammation* 11, 102.
- Hyde, T.M., Lipska, B.K., Ali, T., Mathew, S.V., Law, A.J., Metitiri, O.E., Straub, R.E., Ye, T., Colantuoni, C., Herman, M.M., Bigelow, L.B., Weinberger, D.R., Kleinman, J.E., 2011. Expression of GABA signaling molecules KCC2, NKCC1, and GAD1 in cortical development and schizophrenia. *J. Neurosci.* 31, 11088–11095.
- Janssen, S.P., Gerard, S., Rajmakers, M.E., Truin, M., Van Kleef, M., Joosten, E.A., 2012. Decreased intracellular GABA levels contribute to spinal cord stimulation-induced analgesia in rats suffering from painful peripheral neuropathy: the role of KCC2 and GABA(A) receptor-mediated inhibition. *Neurochem. Int.* 60, 21–30.
- Johnston, C.C., Stevens, B., Pinelli, J., Gibbins, S., Filion, F., Jack, A., Steele, S., Boyer, K., Veilleux, A., 2003. Kangaroo care is effective in diminishing pain response in preterm neonates. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 157, 1084–1088.
- Ju, L.S., Yang, J.J., Gravenstein, N., Seubert, C.N., Morey, T.E., Summers, C., Vasilopoulos, T., Yang, J.J., Martynuk, A.E., 2017. Role of environmental stressors in determining the developmental outcome of neonatal anesthesia. *Psychoneuroendocrinology* 81, 96–104.
- Juif, P.E., Salio, C., Zell, V., Melchior, M., Lacaud, A., Petit-Demouliere, N., Ferrini, F., Darbon, P., Hanesch, U., Anton, F., Merighi, A., Lelievre, V., Poisbeau, P., 2016. Peripheral and central alterations affecting spinal nociceptive processing and pain at adulthood in rats exposed to neonatal maternal deprivation. *Eur. J. Neurosci.* 44, 1952–1962.
- Kaila, K., Price, T.J., Payne, J.A., Puskarjov, M., Voipio, J., 2014. Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 637–654.
- Khazipov, R., Tyzio, R., Ben-Ari, Y., 2008. Effects of oxytocin on GABA signalling in the foetal brain during delivery. *Prog. Brain Res.* 170, 243–257.
- Lelievre, V., Hu, Z., Byun, J.Y., Ioffe, Y., Waschek, J.A., 2002. Fibroblast growth factor-2 converts PACAP growth action on embryonic hindbrain precursors from stimulation to inhibition. *J. Neurosci. Res.* 67, 566–573.
- 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.
- Leonzio, M., Busnelli, M., Antonucci, F., Verderio, C., Mazzanti, M., Chini, B., 2016. The Timing of the Excitatory-to-Inhibitory GABA Switch Is Regulated by the Oxytocin Receptor via KCC2. *Cell Rep* 15, 96–103.
- Lewis, C.M., et al., 2003. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.* 73, 34–48.
- Li, T., Wang, P., Wang, S.C., Wang, Y.F., 2016. Approaches mediating oxytocin regulation of the immune system. *Front. Immunol.* 7, 693.
- Luis-Delgado, O.E., Barrot, M., Rodeau, J.L., Schott, G., Benbouzid, M., Poisbeau, P., Freund-Mercier, M.J., Lasbennes, F., 2006. Calibrated forceps: a sensitive and reliable tool for pain and analgesia studies. *J. Pain* 7, 32–39.
- Lukas, M., Bredewold, R., Landgraf, R., Neumann, I.D., Veenema, A.H., 2011. Early life stress impairs social recognition due to a blunted response of vasopressin release within the septum of adult male rats. *Psychoneuroendocrinology* 36, 843–853.
- Luscher, B., Shen, Q., Sahir, N., 2011. The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. *Mol. Psychiatry* 16, 383–406.
- Mairesse, J., Zinni, M., Pansiot, J., Hassan-Abdi, R., Demene, C., Colella, M., Charriaud-Marlangue, C., Rideau Batista Novais, A., Tanter, M., Maccari, S., Gressens, P., Vaiman, D., Soussi-Yanicostas, N., Baud, O., 2019. Oxytocin receptor agonist reduces perinatal brain damage by targeting microglia. *Glia* 67, 345–359.
- Melchior, M., Juif, P.E., Gazzo, G., Petit-Demouliere, N., Chavant, V., Lacaud, A., Goumon, Y., Charlet, A., Lelievre, V., Poisbeau, P., 2018. Pharmacological rescue of nociceptive hypersensitivity and oxytocin analgesia impairment in a rat model of neonatal maternal separation. *Pain* 159, 2630–2640.
- Merner, N.D., Chandler, M.R., Bourassa, C., Liang, B., Khanna, A.R., Dion, P., Rouleau, G.A., Kahle, K.T., 2015. Regulatory domain or CpG site variation in SLC12A5, encoding the chloride transporter KCC2, in human autism and schizophrenia. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 386.
- Merner, N.D., Mercado, A., Khanna, A.R., Hodgkinson, A., Bruat, V., Awadalla, P., Gamba, G., Rouleau, G.A., Kahle, K.T., 2016. Gain-of-function missense variant in SLC12A2, encoding the bumetanide-sensitive NKCC1 cotransporter, identified in human schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* 77, 22–26.
- Miletic, G., Miletic, V., 2008. Loose ligation of the sciatic nerve is associated with TrkB receptor-dependent decreases in KCC2 protein levels in the ipsilateral spinal dorsal horn. *Pain* 137, 532–539.

- Moloney, R.D., Stilling, R.M., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2015. Early-life stress-induced visceral hypersensitivity and anxiety behavior is reversed by histone deacetylase inhibition. *Neurogastroenterol. Motil.* 27, 1831–1836.
- Morales-Aza, B.M., Chillingworth, N.L., Payne, J.A., Donaldson, L.F., 2004. Inflammation alters cation chloride cotransporter expression in sensory neurons. *Neurobiol. Dis.* 17, 62–69.
- Mou, X., Fang, J., Yang, A., Du, G., 2020. Oxytocin ameliorates bone cancer pain by suppressing toll-like receptor 4 and proinflammatory cytokines in rat spinal cord. *J. Neurogenet.* 1–7.
- Nomura, H., Sakai, A., Nagano, M., Umino, M., Suzuki, H., 2006. Expression changes of cation chloride cotransporters in the rat spinal cord following intraplantar formalin. *Neurosci. Res.* 56, 435–440.
- Okada-Ogawa, A., Nakaya, Y., Imamura, Y., Kobayashi, M., Shinoda, M., Kita, K., Sessle, B.J., Iwata, K., 2015. Involvement of medullary GABAergic system in extraterritorial neuropathic pain mechanisms associated with inferior alveolar nerve transection. *Exp. Neurol.* 267, 42–52.
- Paternain, L., Martisova, E., Milagro, F.I., Ramirez, M.J., Martinez, J.A., Campion, J., 2012. Postnatal maternal separation modifies the response to an obesogenic diet in adulthood in rats. *Dis. Model Mech.* 5, 691–697.
- Plotsky, P.M., Meaney, M.J., 1993. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 18, 195–200.
- Poisbeau, P., Grinevich, V., Charlet, A., 2018. Oxytocin Signaling in Pain: Cellular, Circuit, System, and Behavioral Levels. *Curr. Top Behav. Neurosci.* 35, 193–211.
- Price, T.J., Cervero, F., de Koninck, Y., 2005. Role of cation-chloride-cotransporters (CCC) in pain and hyperalgesia. *Curr. Top. Med. Chem.* 5, 547–555.
- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J.A., Ruusuvaari, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarna, M., Kaila, K., 1999. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397, 251–255.
- Romijn, H.J., Hofman, M.A., Gramsbergen, A., 1991. At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby? *Early Hum Dev* 26, 61–67.
- Sibille, E., Morris, H.M., Kota, R.S., Lewis, D.A., 2011. GABA-related transcripts in the dorsolateral prefrontal cortex in mood disorders. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 14, 721–734.
- Stil, A., Liabeuf, S., Jean-Xavier, C., Brocard, C., Viemari, J.C., Vinay, L., 2009. Developmental up-regulation of the potassium-chloride cotransporter type 2 in the rat lumbar spinal cord. *Neuroscience* 164, 809–821.
- Sullivan, C.R., Funk, A.J., Shan, D., Haroutunian, V., McCullumsmith, R.E., 2015. Decreased chloride channel expression in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. *PLoS ONE* 10, e0123158.
- Sung, K.W., Kirby, M., McDonald, M.P., Lovinger, D.M., Delpire, E., 2000. Abnormal GABA receptor-mediated currents in dorsal root ganglion neurons isolated from Na-K-2Cl cotransporter null mice. *J. Neurosci.* 20, 7531–7538.
- N.M. Talge, C. Neal, V. Glover, T.R. Early Stress, Prevention Science Network F, Neonatal Experience on C, Adolescent Mental H, 2007. Antenatal maternal stress and long-term effects on child neurodevelopment: how and why? *J. Child. Psychol. Psychiatry* 48:245-261.
- Tao, R., Li, C., Newburn, E.N., Ye, T., Lipska, B.K., Herman, M.M., Weinberger, D.R., Kleinman, J.E., Hyde, T.M., 2012. Transcript-specific associations of SLC12A5 (KCC2) in human prefrontal cortex with development, schizophrenia, and affective disorders. *J. Neurosci.* 32, 5216–5222.
- Tata, D.A., Markostamou, I., Ioannidis, A., Gkioka, M., Simeonidou, C., Anogianakis, G., Spandou, E., 2015. Effects of maternal separation on behavior and brain damage in adult rats exposed to neonatal hypoxia-ischemia. *Behav. Brain Res.* 280, 51–61.
- Tobon, A.L., Newport, D.J., Nemeroff, A., 2018. The Role of Oxytocin in Early Life Adversity and Later Psychopathology: a Review of Preclinical and Clinical Studies. *Current Treatment Options in Psychiatry* 5, 401–415.
- Toda, H., Boku, S., Nakagawa, S., Inoue, T., Kato, A., Takamura, N., Song, N., Nibuya, M., Koyama, T., Kusumi, I., 2014. Maternal separation enhances conditioned fear and decreases the mRNA levels of the neurotensin receptor 1 gene with hypermethylation of this gene in the rat amygdala. *PLoS ONE* 9, e97421.
- Tyzio, R., Holmes, G.L., Ben-Ari, Y., Khazipov, R., 2007. Timing of the developmental switch in GABA(A) mediated signaling from excitation to inhibition in CA3 rat hippocampus using gramicidin perforated patch and extracellular recordings. *Epilepsia* 48 (Suppl 5), 96–105.
- Tyzio, R., Nardou, R., Ferrari, D.C., Tsintsadze, T., Shahrokhi, A., Eftekhari, S., Khalilov, I., Tsintsadze, V., Brouchoud, C., Chazal, G., Lemonnier, E., Lozovaya, N., Burnashev, N., Ben-Ari, Y., 2014. Oxytocin-mediated GABA inhibition during delivery attenuates autism pathogenesis in rodent offspring. *Science* 343, 675–679.
- Valencia-de Ita, S., Lawand, N.B., Lin, Q., Castaneda-Hernandez, G., Willis, W.D., 2006. Role of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in the development of capsaicin-induced neurogenic inflammation. *J. Neurophysiol.* 95, 3553–3561.
- Verriotes, M., Chang, P., Fitzgerald, M., Fabrizio, L., 2016. The development of the nociceptive brain. *Neuroscience* 338, 207–219.
- Wang, C., Shimizu-Okabe, C., Watanabe, K., Okabe, A., Matsuzaki, H., Ogawa, T., Mori, N., Fukuda, A., Sato, K., 2002. Developmental changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNA expressions in the rat brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 139, 59–66.
- Watanabe, M., Fukuda, A., 2015. Development and regulation of chloride homeostasis in the central nervous system. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 371.
- Weidenfeld, S., Kuebler, W.M., 2017. Cytokine-Regulation of Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-Cl⁽⁻⁾ Cotransporter 1 and Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Potential Role in Pulmonary Inflammation and Edema Formation. *Front. Immunol.* 8, 393.
- Weinstock, M., 2001. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Prog. Neurobiol.* 65, 427–451.
- Wotjak, C.T., Ganster, J., Kohl, G., Holsboer, F., Landgraf, R., Engelmann, M., 1998. Dissociated central and peripheral release of vasopressin, but not oxytocin, in response to repeated swim stress: new insights into the secretory capacities of peptidergic neurons. *Neuroscience* 85, 1209–1222.
- Yamasue, H., Domes, G., 2018. Oxytocin and Autism Spectrum Disorders. *Curr Top Behav Neurosci* 35, 449–465.
- Young, L.J., Barrett, C.E., 2015. Neuroscience. Can oxytocin treat autism? *Science* 347, 825–826.
- Zhang, W., Liu, L.Y., Xu, T.L., 2008. Reduced potassium-chloride co-transporter expression in spinal cord dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity in rats. *Neuroscience* 152, 502–510.

Références

- (1979) Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. *Pain*, **6**, 249.
- Ab Aziz, C.B. & Ahmad, A.H. (2006) The role of the thalamus in modulating pain. *Malays J Med Sci*, **13**, 11-18.
- Aby, F., Lorenzo, L.E., Grivet, Z., Bouali-Benazzouz, R., Martin, H., Valerio, S., Whitestone, S., Isabel, D., Idi, W., Bouchatta, O., De Deurwaerdere, P., Godin, A.G., Herry, C., Fioramonti, X., Landry, M., De Koninck, Y. & Fossat, P. (2022) Switch of serotonergic descending inhibition into facilitation by a spinal chloride imbalance in neuropathic pain. *Sci Adv*, **8**, eabo0689.
- Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Rio, J. & Ramirez, M.J. (2007) Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*, **32**, 256-266.
- Allchorne, A.J., Broom, D.C. & Woolf, C.J. (2005) Detection of cold pain, cold allodynia and cold hyperalgesia in freely behaving rats. *Mol Pain*, **1**, 36.
- Allen, H.N., Bobnar, H.J. & Kolber, B.J. (2021) Left and right hemispheric lateralization of the amygdala in pain. *Prog Neurobiol*, **196**, 101891.
- Alles, S.R.A. & Smith, P.A. (2021) Peripheral Voltage-Gated Cation Channels in Neuropathic Pain and Their Potential as Therapeutic Targets. *Front Pain Res (Lausanne)*, **2**, 750583.
- Alloui, A., Zimmermann, K., Mamet, J., Duprat, F., Noel, J., Chemin, J., Guy, N., Blondeau, N., Voilley, N., Rubat-Coudert, C., Borsotto, M., Romey, G., Heurteaux, C., Reeh, P., Eschalier, A. & Lazdunski, M. (2006) TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J*, **25**, 2368-2376.
- Anand, K.J. & Hickey, P.R. (1987) Pain and its effects in the human neonate and fetus. *N Engl J Med*, **317**, 1321-1329.
- Andrew, D. & Greenspan, J.D. (1999) Peripheral coding of tonic mechanical cutaneous pain: comparison of nociceptor activity in rat and human psychophysics. *J Neurophysiol*, **82**, 2641-2648.
- Andrews, K. & Fitzgerald, M. (2002) Wound sensitivity as a measure of analgesic effects following surgery in human neonates and infants. *Pain*, **99**, 185-195.
- Aouad, M., Petit-Demouliere, N., Goumon, Y. & Poisbeau, P. (2014) Etifoxine stimulates allopregnanolone synthesis in the spinal cord to produce analgesia in experimental mononeuropathy. *Eur J Pain*, **18**, 258-268.
- Balayssac, D., Ling, B., Ferrier, J., Pereira, B., Eschalier, A. & Authier, N. (2014) Assessment of thermal sensitivity in rats using the thermal place preference test: description and application in the study of oxaliplatin-induced acute thermal hypersensitivity and inflammatory pain models. *Behav Pharmacol*, **25**, 99-111.

- Baliki, M., Calvo, O., Chialvo, D.R. & Apkarian, A.V. (2005) Spared nerve injury rats exhibit thermal hyperalgesia on an automated operant dynamic thermal escape task. *Mol Pain*, **1**, 18.
- Bandell, M., Story, G.M., Hwang, S.W., Viswanath, V., Eid, S.R., Petrus, M.J., Earley, T.J. & Patapoutian, A. (2004) Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron*, **41**, 849-857.
- Bannister, K. & Dickenson, A.H. (2017) The plasticity of descending controls in pain: translational probing. *J Physiol*, **595**, 4159-4166.
- Bannister, K., Lockwood, S., Goncalves, L., Patel, R. & Dickenson, A.H. (2017) An investigation into the inhibitory function of serotonin in diffuse noxious inhibitory controls in the neuropathic rat. *Eur J Pain*, **21**, 750-760.
- Barrot, M. (2012) Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*, **211**, 39-50.
- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G. & Julius, D. (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, **139**, 267-284.
- Basbaum, A.I. & Fields, H.L. (1984) Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci*, **7**, 309-338.
- Bautista, D.M., Jordt, S.E., Nikai, T., Tsuruda, P.R., Read, A.J., Poblete, J., Yamoah, E.N., Basbaum, A.I. & Julius, D. (2006) TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell*, **124**, 1269-1282.
- Benarroch, E.E. (2018) Locus coeruleus. *Cell Tissue Res*, **373**, 221-232.
- Benbouzid, M., Pallage, V., Rajalu, M., Waltisperger, E., Doridot, S., Poisbeau, P., Freund-Mercier, M.J. & Barrot, M. (2008) Sciatic nerve cuffing in mice: a model of sustained neuropathic pain. *Eur J Pain*, **12**, 591-599.
- Bennett, G.J. & Xie, Y.K. (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, **33**, 87-107.
- Benoist, J.M., Pinede, I., Ballantyne, K., Plaghki, L. & Le Bars, D. (2008) Peripheral and central determinants of a nociceptive reaction: an approach to psychophysics in the rat. *PLoS One*, **3**, e3125.
- Bliss, T.V., Collingridge, G.L., Kaang, B.K. & Zhuo, M. (2016) Synaptic plasticity in the anterior cingulate cortex in acute and chronic pain. *Nat Rev Neurosci*, **17**, 485-496.
- Boada, M.D., Gutierrez, S. & Eisenach, J.C. (2019) Peripheral oxytocin restores light touch and nociceptor sensory afferents towards normal after nerve injury. *Pain*, **160**, 1146-1155.
- Bonica, J.J. (1990) *The management of pain*. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Bourgeois, J.R., Feustel, P.J. & Kopec, A.M. (2022) Sex differences in choice-based thermal nociceptive tests in adult rats. *Behav Brain Res*, **429**, 113919.

- Bourinet, E., Alloui, A., Monteil, A., Barrere, C., Couette, B., Poirot, O., Pages, A., McRory, J., Snutch, T.P., Eschalier, A. & Nargeot, J. (2005) Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *EMBO J*, **24**, 315-324.
- Brenner, D.S., Golden, J.P. & Gereau, R.W.t. (2012) A novel behavioral assay for measuring cold sensation in mice. *PLoS One*, **7**, e39765.
- Breton, J.D., Poisbeau, P. & Darbon, P. (2009) Antinociceptive action of oxytocin involves inhibition of potassium channel currents in lamina II neurons of the rat spinal cord. *Mol Pain*, **5**, 63.
- Breton, J.D., Veinante, P., Uhl-Bronner, S., Vergnano, A.M., Freund-Mercier, M.J., Schlichter, R. & Poisbeau, P. (2008) Oxytocin-induced antinociception in the spinal cord is mediated by a subpopulation of glutamatergic neurons in lamina I-II which amplify GABAergic inhibition. *Mol Pain*, **4**, 19.
- Burgess, P.R. & Perl, E.R. (1967) Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. *J Physiol*, **190**, 541-562.
- Burgess, P.R., Petit, D. & Warren, R.M. (1968) Receptor types in cat hairy skin supplied by myelinated fibers. *J Neurophysiol*, **31**, 833-848.
- Bushnell, M.C., Ceko, M. & Low, L.A. (2013) Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*, **14**, 502-511.
- Cai, S., Gomez, K., Moutal, A. & Khanna, R. (2021) Targeting T-type/CaV3.2 channels for chronic pain. *Transl Res*, **234**, 20-30.
- Campbell, J.N. & Meyer, R.A. (2006) Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron*, **52**, 77-92.
- Caporoso, J., Moses, M., Koper, K., Tillman, T.S., Jiang, L., Brandon, N., Chen, Q., Tang, P. & Xu, Y. (2020) A Thermal Place Preference Test for Discovery of Neuropathic Pain Drugs. *ACS Chem Neurosci*, **11**, 1006-1012.
- Carlton, S.M., Dougherty, P.M., Pover, C.M. & Coggeshall, R.E. (1991) Neuroma formation and numbers of axons in a rat model of experimental peripheral neuropathy. *Neurosci Lett*, **131**, 88-92.
- Casey, K.L. (1980) Reticular formation and pain: toward a unifying concept. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*, **58**, 93-105.
- Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I. & Julius, D. (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, **288**, 306-313.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D. & Julius, D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **389**, 816-824.
- Cazala, F., Vienney, N. & Stoleru, S. (2015) The cortical sensory representation of genitalia in women and men: a systematic review. *Socioaffect Neurosci Psychol*, **5**, 26428.
- Cesare, P. & McNaughton, P. (1996) A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 15435-15439.

- Charlet, A., Rodeau, J.L. & Poisbeau, P. (2011) Radiotelemetric and symptomatic evaluation of pain in the rat after laparotomy: long-term benefits of perioperative ropivacaine care. *J Pain*, **12**, 246-256.
- Chatt, A.B. & Kenshalo, D.R. (1977) Cerebral evoked responses to skin warming recorded from human scalp. *Exp Brain Res*, **28**, 449-455.
- Chemin, J., Monteil, A., Perez-Reyes, E., Bourinet, E., Nargeot, J. & Lory, P. (2002) Specific contribution of human T-type calcium channel isoforms ($\alpha(1G)$, $\alpha(1H)$ and $\alpha(1I)$) to neuronal excitability. *J Physiol*, **540**, 3-14.
- Chen, A., Chen, Y., Tang, Y., Bao, C., Cui, Z., Xiao, M. & Lin, C. (2017) Hippocampal AMPARs involve the central sensitization of rats with irritable bowel syndrome. *Brain Behav*, **7**, e00650.
- Chen, J. (2015) The evolutionary divergence of TRPA1 channel: heat-sensitive, cold-sensitive and temperature-insensitive. *Temperature (Austin)*, **2**, 158-159.
- Chen, J., Kang, D., Xu, J., Lake, M., Hogan, J.O., Sun, C., Walter, K., Yao, B. & Kim, D. (2013) Species differences and molecular determinant of TRPA1 cold sensitivity. *Nat Commun*, **4**, 2501.
- Chen, T., Taniguchi, W., Chen, Q.Y., Tozaki-Saitoh, H., Song, Q., Liu, R.H., Koga, K., Matsuda, T., Kaito-Sugimura, Y., Wang, J., Li, Z.H., Lu, Y.C., Inoue, K., Tsuda, M., Li, Y.Q., Nakatsuka, T. & Zhuo, M. (2018) Top-down descending facilitation of spinal sensory excitatory transmission from the anterior cingulate cortex. *Nat Commun*, **9**, 1886.
- Chesler, E.J., Wilson, S.G., Lariviere, W.R., Rodriguez-Zas, S.L. & Mogil, J.S. (2002) Influences of laboratory environment on behavior. *Nat Neurosci*, **5**, 1101-1102.
- Cho, H., Yang, Y.D., Lee, J., Lee, B., Kim, T., Jang, Y., Back, S.K., Na, H.S., Harfe, B.D., Wang, F., Raouf, R., Wood, J.N. & Oh, U. (2012) The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons. *Nat Neurosci*, **15**, 1015-1021.
- Chocyk, A., Bobula, B., Dudys, D., Przyborowska, A., Majcher-Maslanka, I., Hess, G. & Wedzony, K. (2013) Early-life stress affects the structural and functional plasticity of the medial prefrontal cortex in adolescent rats. *Eur J Neurosci*, **38**, 2089-2107.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.
- Christensen, B.N. & Perl, E.R. (1970) Spinal neurons specifically excited by noxious or thermal stimuli: marginal zone of the dorsal horn. *J Neurophysiol*, **33**, 293-307.
- Chrousos, G.P. & Gold, P.W. (1992) The Concepts of Stress and Stress System Disorders: Overview of Physical and Behavioral Homeostasis. *JAMA*, **267**, 1244-1252.
- Chung, E.K., Zhang, X., Li, Z., Zhang, H., Xu, H. & Bian, Z. (2007a) Neonatal maternal separation enhances central sensitivity to noxious colorectal distention in rat. *Brain Res*, **1153**, 68-77.
- Chung, E.K., Zhang, X.J., Xu, H.X., Sung, J.J. & Bian, Z.X. (2007b) Visceral hyperalgesia induced by neonatal maternal separation is associated with nerve growth factor-mediated central neuronal plasticity in rat spinal cord. *Neuroscience*, **149**, 685-695.

- Clapham, D.E., Runnels, L.W. & Strubing, C. (2001) The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 387-396.
- Coghill, R.C., Mayer, D.J. & Price, D.D. (1993) Wide dynamic range but not nociceptive-specific neurons encode multidimensional features of prolonged repetitive heat pain. *J Neurophysiol*, **69**, 703-716.
- Colburn, R.W., Lubin, M.L., Stone, D.J., Jr., Wang, Y., Lawrence, D., D'Andrea, M.R., Brandt, M.R., Liu, Y., Flores, C.M. & Qin, N. (2007) Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron*, **54**, 379-386.
- Colleoni, M. & Sacerdote, P. (2010) Murine models of human neuropathic pain. *Biochim Biophys Acta*, **1802**, 924-933.
- Colloca, L., Ludman, T., Bouhassira, D., Baron, R., Dickenson, A.H., Yarnitsky, D., Freeman, R., Truini, A., Attal, N., Finnerup, N.B., Eccleston, C., Kalso, E., Bennett, D.L., Dworkin, R.H. & Raja, S.N. (2017) Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Primers*, **3**, 17002.
- Coutinho, S.V., Plotsky, P.M., Sablad, M., Miller, J.C., Zhou, H., Bayati, A.I., McRoberts, J.A. & Mayer, E.A. (2002) Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **282**, G307-316.
- Craig, A.D. & Bushnell, M.C. (1994) The thermal grill illusion: unmasking the burn of cold pain. *Science*, **265**, 252-255.
- Craig, A.D., Bushnell, M.C., Zhang, E.T. & Blomqvist, A. (1994) A thalamic nucleus specific for pain and temperature sensation. *Nature*, **372**, 770-773.
- Craig, A.D., Chen, K., Bandy, D. & Reiman, E.M. (2000) Thermosensory activation of insular cortex. *Nat Neurosci*, **3**, 184-190.
- D'Amour & Smith (1941) A METHOD FOR DETERMINING LOSS OF PAIN SENSATION. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **72**, 74-79.
- Dado, R.J., Katter, J.T. & Giesler, G.J., Jr. (1994) Spinothalamic and spinohypothalamic tract neurons in the cervical enlargement of rats. II. Responses to innocuous and noxious mechanical and thermal stimuli. *J Neurophysiol*, **71**, 981-1002.
- Dalm, B.D., Reddy, C.G., Howard, M.A., Kang, S. & Brennan, T.J. (2015) Conditioned place preference and spontaneous dorsal horn neuron activity in chronic constriction injury model in rats. *Pain*, **156**, 2562-2571.
- Dantzer, R., O'Connor, J.C., Freund, G.G., Johnson, R.W. & Kelley, K.W. (2008) From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*, **9**, 46-56.
- Darian-Smith, I., Johnson, K.O. & Dykes, R. (1973) "Cold" fiber population innervating palmar and digital skin of the monkey: responses to cooling pulses. *J Neurophysiol*, **36**, 325-346.
- Davis, J.B., Gray, J., Gunthorpe, M.J., Hatcher, J.P., Davey, P.T., Overend, P., Harries, M.H., Latcham, J., Clapham, C., Atkinson, K., Hughes, S.A., Rance, K., Grau, E., Harper, A.J., Pugh, P.L., Rogers,

- D.C., Bingham, S., Randall, A. & Sheardown, S.A. (2000) Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*, **405**, 183-187.
- Davoody, L., Quiton, R.L., Lucas, J.M., Ji, Y., Keller, A. & Masri, R. (2011) Conditioned place preference reveals tonic pain in an animal model of central pain. *J Pain*, **12**, 868-874.
- De Vry, J., Kuhl, E., Franken-Kunkel, P. & Eckel, G. (2004) Pharmacological characterization of the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*, **491**, 137-148.
- Decosterd, I. & Woolf, C.J. (2000) Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*, **87**, 149-158.
- Descartes, R. (1664) *L'Homme et un traité de la formation du foetus* Charles Angot Paris.
- Devor, M. (2006) Chapter 19 Pathophysiology of nerve injury. *Handb Clin Neurol*, **81**, 261-IV.
- Dhaka, A., Earley, T.J., Watson, J. & Patapoutian, A. (2008) Visualizing cold spots: TRPM8-expressing sensory neurons and their projections. *J Neurosci*, **28**, 566-575.
- Dhaka, A., Murray, A.N., Mathur, J., Earley, T.J., Petrus, M.J. & Patapoutian, A. (2007) TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron*, **54**, 371-378.
- Dhaka, A., Viswanath, V. & Patapoutian, A. (2006) Trp ion channels and temperature sensation. *Annu Rev Neurosci*, **29**, 135-161.
- Dimsdale, J.E. & Dantzer, R. (2007) A biological substrate for somatoform disorders: importance of pathophysiology. *Psychosom Med*, **69**, 850-854.
- Djoughri, L. & Lawson, S.N. (2004) Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res Brain Res Rev*, **46**, 131-145.
- Dubin, A.E. & Patapoutian, A. (2010) Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest*, **120**, 3760-3772.
- Dubuisson, D. & Dennis, S.G. (1977) The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, **4**, 161-174.
- Fajardo, O., Meseguer, V., Belmonte, C. & Viana, F. (2008) TRPA1 channels mediate cold temperature sensing in mammalian vagal sensory neurons: pharmacological and genetic evidence. *J Neurosci*, **28**, 7863-7875.
- Farr, M., Mathews, J., Zhu, D.F. & Ambron, R.T. (1999) Inflammation causes a long-term hyperexcitability in the nociceptive sensory neurons of Aplysia. *Learn Mem*, **6**, 331-340.
- Fenwick, A.J., Wu, S.W. & Peters, J.H. (2014) Isolation of TRPV1 independent mechanisms of spontaneous and asynchronous glutamate release at primary afferent to NTS synapses. *Front Neurosci*, **8**, 6.
- Fields, H.L. (1999) Pain: an unpleasant topic. *Pain*, **Suppl 6**, S61-S69.
- Filingeri, D. (2016) Neurophysiology of Skin Thermal Sensations. *Compr Physiol*, **6**, 1429.

- Fischer, C.W., Elfving, B., Lund, S. & Wegener, G. (2015) Behavioral and systemic consequences of long-term inflammatory challenge. *J Neuroimmunol*, **288**, 40-46.
- Fisher, J.P., Hassan, D.T. & Connor, N.O. (1995) Minerva. *BMJ*, **310**, 70.
- Fitzgerald, M. (2005) The development of nociceptive circuits. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 507-520.
- Fuchs, P.N. & McNabb, C.T. (2012) The place escape/avoidance paradigm: a novel method to assess nociceptive processing. *J Integr Neurosci*, **11**, 61-72.
- Gabay, E. & Tal, M. (2004) Pain behavior and nerve electrophysiology in the CCI model of neuropathic pain. *Pain*, **110**, 354-360.
- Gazzo, G., Girard, P., Kamoun, N., Verleye, M. & Poisbeau, P. (2019) Analgesic and anti-edemic properties of etifoxine in models of inflammatory sensitization. *Eur J Pharmacol*, **843**, 316-322.
- Gazzo, G., Melchior, M., Caussaint, A., Giere, C., Lelievre, V. & Poisbeau, P. (2021) Overexpression of chloride importer NKCC1 contributes to the sensory-affective and sociability phenotype of rats following neonatal maternal separation. *Brain Behav Immun*, **92**, 193-202.
- Gees, M., Owsianik, G., Nilius, B. & Voets, T. (2012) TRP channels. *Compr Physiol*, **2**, 563-608.
- Geurts, J.W., Willems, P.C., Lockwood, C., van Kleef, M., Kleijnen, J. & Dirksen, C. (2017) Patient expectations for management of chronic non-cancer pain: A systematic review. *Health Expect*, **20**, 1201-1217.
- Giere, C., Melchior, M., Dufour, A. & Poisbeau, P. (2021) Spinal integration of hot and cold nociceptive stimuli by wide-dynamic-range neurons in anesthetized adult rats. *Pain Rep*, **6**, e983.
- Gong, L., Gao, F., Li, J., Li, J., Yu, X., Ma, X., Zheng, W., Cui, S., Liu, K., Zhang, M., Kunze, W. & Liu, C.Y. (2015) Oxytocin-induced membrane hyperpolarization in pain-sensitive dorsal root ganglia neurons mediated by Ca(2+)/nNOS/NO/KATP pathway. *Neuroscience*, **289**, 417-428.
- Gosselin, R.D., O'Connor, R.M., Tramullas, M., Julio-Pieper, M., Dinan, T.G. & Cryan, J.F. (2010) Riluzole normalizes early-life stress-induced visceral hypersensitivity in rats: role of spinal glutamate reuptake mechanisms. *Gastroenterology*, **138**, 2418-2425.
- Gregoire, S., Michaud, V., Chapuy, E., Eschalier, A. & Ardid, D. (2012) Study of emotional and cognitive impairments in mononeuropathic rats: effect of duloxetine and gabapentin. *Pain*, **153**, 1657-1663.
- Gregory, N.S., Harris, A.L., Robinson, C.R., Dougherty, P.M., Fuchs, P.N. & Sluka, K.A. (2013) An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. *J Pain*, **14**, 1255-1269.
- Grinevich, V., Desarmenien, M.G., Chini, B., Tauber, M. & Muscatelli, F. (2014) Ontogenesis of oxytocin pathways in the mammalian brain: late maturation and psychosocial disorders. *Front Neuroanat*, **8**, 164.
- Grunau, R.E., Holsti, L. & Peters, J.W. (2006) Long-term consequences of pain in human neonates. *Semin Fetal Neonatal Med*, **11**, 268-275.

- Gunn, A., Bobeck, E.N., Weber, C. & Morgan, M.M. (2011) The influence of non-nociceptive factors on hot-plate latency in rats. *J Pain*, **12**, 222-227.
- Hallin, R.G., Torebjork, H.E. & Wiesenfeld, Z. (1982) Nociceptors and warm receptors innervated by C fibres in human skin. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **45**, 313-319.
- Han, P., Zhao, J., Liu, S.B., Yang, C.J., Wang, Y.Q., Wu, G.C., Xu, D.M. & Mi, W.L. (2013) Interleukin-33 mediates formalin-induced inflammatory pain in mice. *Neuroscience*, **241**, 59-66.
- Han, Z.S., Zhang, E.T. & Craig, A.D. (1998) Nociceptive and thermoreceptive lamina I neurons are anatomically distinct. *Nat Neurosci*, **1**, 218-225.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C. & Joris, J. (1988) A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, **32**, 77-88.
- Harte, S.E., Meyers, J.B., Donahue, R.R., Taylor, B.K. & Morrow, T.J. (2016) Mechanical Conflict System: A Novel Operant Method for the Assessment of Nociceptive Behavior. *PLoS One*, **11**, e0150164.
- Hasbargen, T., Ahmed, M.M., Miranpuri, G., Li, L., Kahle, K.T., Resnick, D. & Sun, D. (2010) Role of NKCC1 and KCC2 in the development of chronic neuropathic pain following spinal cord injury. *Ann N Y Acad Sci*, **1198**, 168-172.
- Hellon, R.F., Misra, N.K. & Provins, K.A. (1973) Neurones in the somatosensory cortex of the rat responding to scrotal skin temperature changes. *J Physiol*, **232**, 401-411.
- Hensel, H. (1981) Thermoreception and temperature regulation. *Monogr Physiol Soc*, **38**, 1-321.
- Hensel, H. & Boman, K.K. (1960) Afferent impulses in cutaneous sensory nerves in human subjects. *J Neurophysiol*, **23**, 564-578.
- Hensel, H. & Kenshalo, D.R. (1969) Warm receptors in the nasal region of cats. *J Physiol*, **204**, 99-112.
- Hensel, H. & Zotterman, Y. (1951) The response of mechanoreceptors to thermal stimulation. *J Physiol*, **115**, 16-24.
- Hill, R.Z. & Bautista, D.M. (2020) Getting in Touch with Mechanical Pain Mechanisms. *Trends Neurosci*, **43**, 311-325.
- Ho Kim, S. & Mo Chung, J. (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*, **50**, 355-363.
- Hoffmann, T., Kistner, K., Miermeister, F., Winkelmann, R., Wittmann, J., Fischer, M.J., Weidner, C. & Reeh, P.W. (2013) TRPA1 and TRPV1 are differentially involved in heat nociception of mice. *Eur J Pain*, **17**, 1472-1482.
- Hu, S., Xiao, Y., Zhu, L., Li, L., Hu, C.Y., Jiang, X. & Xu, G.Y. (2013) Neonatal maternal deprivation sensitizes voltage-gated sodium channel currents in colon-specific dorsal root ganglion neurons in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **304**, G311-321.

- Hua le, H., Strigo, I.A., Baxter, L.C., Johnson, S.C. & Craig, A.D. (2005) Anteroposterior somatotopy of innocuous cooling activation focus in human dorsal posterior insular cortex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **289**, R319-R325.
- Hugel, S., Inquimbert, P. & Schlichter, R. (2022) Réseaux spinaux et transmission nociceptive. *Douleur et Analgésie*, **35**, 180-187.
- Hunnskaar, S., Berge, O.G. & Hole, K. (1986) A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. *Behav Brain Res*, **21**, 101-108.
- Hunnskaar, S. & Hole, K. (1987) The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, **30**, 103-114.
- Huzard, D., Martin, M., Maingret, F., Chemin, J., Jeanneteau, F., Mery, P.F., Fossat, P., Bourinet, E. & Francois, A. (2022) The impact of C-tactile low-threshold mechanoreceptors on affective touch and social interactions in mice. *Sci Adv*, **8**, eabo7566.
- Iadarola, M.J., Brady, L.S., Draisci, G. & Dubner, R. (1988) Enhancement of dynorphin gene expression in spinal cord following experimental inflammation: stimulus specificity, behavioral parameters and opioid receptor binding. *Pain*, **35**, 313-326.
- Iannetti, G.D. & Mouraux, A. (2010) From the neuromatrix to the pain matrix (and back). *Exp Brain Res*, **205**, 1-12.
- Ilggo, A. (1969) Cutaneous thermoreceptors in primates and sub-primates. *J Physiol*, **200**, 403-430.
- Inoue, H., Asaka, T., Nagata, N. & Koshihara, Y. (1997) Mechanism of mustard oil-induced skin inflammation in mice. *Eur J Pharmacol*, **333**, 231-240.
- Jaggi, A.S., Jain, V. & Singh, N. (2011) Animal models of neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol*, **25**, 1-28.
- Jasmin, L., Kohan, L., Franssen, M., Janni, G. & Goff, J.R. (1998) The cold plate as a test of nociceptive behaviors: description and application to the study of chronic neuropathic and inflammatory pain models. *Pain*, **75**, 367-382.
- Ji, G., Sun, H., Fu, Y., Li, Z., Pais-Vieira, M., Galhardo, V. & Neugebauer, V. (2010) Cognitive impairment in pain through amygdala-driven prefrontal cortical deactivation. *J Neurosci*, **30**, 5451-5464.
- Ji, R.R., Nackley, A., Huh, Y., Terrando, N. & Maixner, W. (2018) Neuroinflammation and Central Sensitization in Chronic and Widespread Pain. *Anesthesiology*, **129**, 343-366.
- Johansen, J.P., Fields, H.L. & Manning, B.H. (2001) The affective component of pain in rodents: direct evidence for a contribution of the anterior cingulate cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 8077-8082.
- Jones, S.L. & Gebhart, G.F. (1986) Characterization of coeruleospinal inhibition of the nociceptive tail-flick reflex in the rat: mediation by spinal alpha 2-adrenoceptors. *Brain Res*, **364**, 315-330.
- Juif, P.E., Breton, J.D., Rajalu, M., Charlet, A., Goumon, Y. & Poisbeau, P. (2013) Long-lasting spinal oxytocin analgesia is ensured by the stimulation of allopregnanolone synthesis which potentiates GABA(A) receptor-mediated synaptic inhibition. *J Neurosci*, **33**, 16617-16626.

- Juif, P.E., Salio, C., Zell, V., Melchior, M., Lacaud, A., Petit-Demouliere, N., Ferrini, F., Darbon, P., Hanesch, U., Anton, F., Merighi, A., Lelievre, V. & Poisbeau, P. (2016) Peripheral and central alterations affecting spinal nociceptive processing and pain at adulthood in rats exposed to neonatal maternal deprivation. *Eur J Neurosci*, **44**, 1952-1962.
- Julius, D. & Basbaum, A.I. (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, **413**, 203-210.
- Kaila, K., Price, T.J., Payne, J.A., Puskarjov, M. & Voipio, J. (2014) Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*, **15**, 637-654.
- Kalinichev, M., Easterling, K.W. & Holtzman, S.G. (2001) Repeated neonatal maternal separation alters morphine-induced antinociception in male rats. *Brain Res Bull*, **54**, 649-654.
- Khasabov, S.G., Cain, D.M., Thong, D., Mantyh, P.W. & Simone, D.A. (2001) Enhanced responses of spinal dorsal horn neurons to heat and cold stimuli following mild freeze injury to the skin. *J Neurophysiol*, **86**, 986-996.
- Kidd, B.L. & Urban, L.A. (2001) Mechanisms of inflammatory pain. *Br J Anaesth*, **87**, 3-11.
- King, T., Vera-Portocarrero, L., Gutierrez, T., Vanderah, T.W., Dussor, G., Lai, J., Fields, H.L. & Porreca, F. (2009) Unmasking the tonic-aversive state in neuropathic pain. *Nat Neurosci*, **12**, 1364-1366.
- Knowlton, W.M., Palkar, R., Lippoldt, E.K., McCoy, D.D., Baluch, F., Chen, J. & McKemy, D.D. (2013) A sensory-labeled line for cold: TRPM8-expressing sensory neurons define the cellular basis for cold, cold pain, and cooling-mediated analgesia. *J Neurosci*, **33**, 2837-2848.
- Koe, A.S., Ashokan, A. & Mitra, R. (2016) Short environmental enrichment in adulthood reverses anxiety and basolateral amygdala hypertrophy induced by maternal separation. *Transl Psychiatry*, **6**, e729.
- Kremer, M., Becker, L.J., Barrot, M. & Yalcin, I. (2021) How to study anxiety and depression in rodent models of chronic pain? *Eur J Neurosci*, **53**, 236-270.
- Labrakakis, C. (2023) The Role of the Insular Cortex in Pain. *Int J Mol Sci*, **24**.
- LaBuda, C.J. & Fuchs, P.N. (2001) Low dose aspirin attenuates escape/avoidance behavior, but does not reduce mechanical hyperalgesia in a rodent model of inflammatory pain. *Neurosci Lett*, **304**, 137-140.
- LaBuda, C.J. & Fuchs, P.N. (2005) Attenuation of negative pain affect produced by unilateral spinal nerve injury in the rat following anterior cingulate cortex activation. *Neuroscience*, **136**, 311-322.
- Le Bars, D. & Cadden, S. (2010) What is a Wide-Dynamic-Range Cell? *Pain*, **5**, 331-338.
- Le Bars, D., Dickenson, A.H. & Besson, J.M. (1979) Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. *Pain*, **6**, 283-304.
- Lee, H.J., Macbeth, A.H., Pagani, J.H. & Young, W.S., 3rd (2009) Oxytocin: the great facilitator of life. *Prog Neurobiol*, **88**, 127-151.

- Leite-Almeida, H., Almeida-Torres, L., Mesquita, A.R., Pertovaara, A., Sousa, N., Cerqueira, J.J. & Almeida, A. (2009) The impact of age on emotional and cognitive behaviours triggered by experimental neuropathy in rats. *Pain*, **144**, 57-65.
- Lelievre, V., Hu, Z., Byun, J.Y., Ioffe, Y. & Waschek, J.A. (2002) Fibroblast growth factor-2 converts PACAP growth action on embryonic hindbrain precursors from stimulation to inhibition. *J Neurosci Res*, **67**, 566-573.
- Leonzino, M., Busnelli, M., Antonucci, F., Verderio, C., Mazzanti, M. & Chini, B. (2016) The Timing of the Excitatory-to-Inhibitory GABA Switch Is Regulated by the Oxytocin Receptor via KCC2. *Cell Rep*, **15**, 96-103.
- Li, J., Simone, D.A. & Larson, A.A. (1999) Windup leads to characteristics of central sensitization. *Pain*, **79**, 75-82.
- Liao, M., Cao, E., Julius, D. & Cheng, Y. (2013) Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*, **504**, 107-112.
- Liu, M.G. & Chen, J. (2009) Roles of the hippocampal formation in pain information processing. *Neurosci Bull*, **25**, 237-266.
- Lorenzo, L.E., Ramien, M., St Louis, M., De Koninck, Y. & Ribeiro-da-Silva, A. (2008) Postnatal changes in the Rexed lamination and markers of nociceptive afferents in the superficial dorsal horn of the rat. *J Comp Neurol*, **508**, 592-604.
- Luis-Delgado, O.E., Barrot, M., Rodeau, J.L., Schott, G., Benbouzid, M., Poisbeau, P., Freund-Mercier, M.J. & Lasbennes, F. (2006) Calibrated forceps: a sensitive and reliable tool for pain and analgesia studies. *J Pain*, **7**, 32-39.
- Lumpkin, E.A. & Caterina, M.J. (2007) Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature*, **445**, 858-865.
- Luo, J.L., Qin, H.Y., Wong, C.K., Tsang, S.Y., Huang, Y. & Bian, Z.X. (2011) Enhanced excitability and down-regulated voltage-gated potassium channels in colonic drg neurons from neonatal maternal separation rats. *J Pain*, **12**, 600-609.
- Ma, J.H., Xiao, T.H., Chang, C.W., Gao, L., Wang, X.L., Gao, G.D. & Yu, Y.Q. (2011) Activation of anterior cingulate cortex produces inhibitory effects on noxious mechanical and electrical stimuli-evoked responses in rat spinal WDR neurons. *Eur J Pain*, **15**, 895-899.
- Madrid, R., de la Pena, E., Donovan-Rodriguez, T., Belmonte, C. & Viana, F. (2009) Variable threshold of trigeminal cold-thermosensitive neurons is determined by a balance between TRPM8 and Kv1 potassium channels. *J Neurosci*, **29**, 3120-3131.
- Maixner, W., Dubner, R., Bushnell, M.C., Kenshalo, D.R., Jr. & Oliveras, J.L. (1986) Wide-dynamic-range dorsal horn neurons participate in the encoding process by which monkeys perceive the intensity of noxious heat stimuli. *Brain Res*, **374**, 385-388.
- Mao, J. (2012) Current challenges in translational pain research. *Trends Pharmacol Sci*, **33**, 568-573.
- Marchand, S. (2020) Mechanisms Challenges of the Pain Phenomenon. *Front Pain Res (Lausanne)*, **1**, 574370.

- Matthies, B.K. & Franklin, K.B.J. (1992) Formalin pain is expressed in decerebrate rats but not attenuated by morphine. *Pain*, **51**, 199-206.
- Mauderli, A.P., Acosta-Rua, A. & Vierck, C.J. (2000) An operant assay of thermal pain in conscious, unrestrained rats. *J Neurosci Methods*, **97**, 19-29.
- Maxwell, D.J., Belle, M.D., Cheunsuang, O., Stewart, A. & Morris, R. (2007) Morphology of inhibitory and excitatory interneurons in superficial laminae of the rat dorsal horn. *J Physiol*, **584**, 521-533.
- McCleskey, E.W. & Gold, M.S. (1999) Ion channels of nociception. *Annu Rev Physiol*, **61**, 835-856.
- McEwen, B.S. (2000) Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology. *Neuropsychopharmacology*, **22**, 108-124.
- McEwen, B.S. (2007) Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev*, **87**, 873-904.
- McKemy, D.D., Neuhausser, W.M. & Julius, D. (2002) Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, **416**, 52-58.
- McNamara, C.R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D.M., Siemens, J., Deranian, K.L., Zhao, M., Hayward, N.J., Chong, J.A., Julius, D., Moran, M.M. & Fanger, C.M. (2007) TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 13525-13530.
- Meints, S.M. & Edwards, R.R. (2018) Evaluating psychosocial contributions to chronic pain outcomes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **87**, 168-182.
- Melchior, M., Juif, P.E., Gazzo, G., Petit-Demouliere, N., Chavant, V., Lacaud, A., Goumon, Y., Charlet, A., Lelievre, V. & Poisbeau, P. (2018) Pharmacological rescue of nociceptive hypersensitivity and oxytocin analgesia impairment in a rat model of neonatal maternal separation. *Pain*, **159**, 2630-2640.
- Melchior, M., Kuhn, P. & Poisbeau, P. (2021) The burden of early life stress on the nociceptive system development and pain responses. *Eur J Neurosci*.
- Melzack, R. (1990) Phantom limbs and the concept of a neuromatrix. *Trends Neurosci*, **13**, 88-92.
- Melzack, R. & Wall, P.D. (1965) Pain mechanisms: a new theory. *Science*, **150**, 971-979.
- Mendell, L.M. (1966) Physiological properties of unmyelinated fiber projection to the spinal cord. *Exp Neurol*, **16**, 316-332.
- Mendell, L.M. & Wall, P.D. (1965) Responses of Single Dorsal Cord Cells to Peripheral Cutaneous Unmyelinated Fibres. *Nature*, **206**, 97-99.
- Menetrey, D., Chaouch, A. & Besson, J.M. (1979) Responses of spinal cord dorsal horn neurones to non-noxious and noxious cutaneous temperature changes in the spinal rat. *Pain*, **6**, 265-282.

- Menetrey, D., Giesler, G.J., Jr. & Besson, J.M. (1977) An analysis of response properties of spinal cord dorsal horn neurones to nonnoxious and noxious stimuli in the spinal rat. *Exp Brain Res*, **27**, 15-33.
- Micallef, J., Soubrouillard, C., Guet, F., Le Guern, M.E., Alquier, C., Bruguerolle, B. & Blin, O. (2001) A double blind parallel group placebo controlled comparison of sedative and mnesic effects of etifoxine and lorazepam in healthy subjects [corrected]. *Fundam Clin Pharmacol*, **15**, 209-216.
- Milenkovic, N., Zhao, W.J., Walcher, J., Albert, T., Siemens, J., Lewin, G.R. & Poulet, J.F. (2014) A somatosensory circuit for cooling perception in mice. *Nat Neurosci*, **17**, 1560-1566.
- Millan, M.J. (1999) The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, **57**, 1-164.
- Millan, M.J. (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol*, **66**, 355-474.
- Moayedi, M. & Davis, K.D. (2013) Theories of pain: from specificity to gate control. *J Neurophysiol*, **109**, 5-12.
- Modi, A.D., Parekh, A. & Pancholi, Y.N. (2023) Evaluating pain behaviours: Widely used mechanical and thermal methods in rodents. *Behav Brain Res*, **446**, 114417.
- Mogil, J.S. (2009) Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci*, **10**, 283-294.
- Molliver, D.C., Wright, D.E., Leitner, M.L., Parsadanian, A.S., Doster, K., Wen, D., Yan, Q. & Snider, W.D. (1997) IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. *Neuron*, **19**, 849-861.
- Moloney, R.D., Stilling, R.M., Dinan, T.G. & Cryan, J.F. (2015) Early-life stress-induced visceral hypersensitivity and anxiety behavior is reversed by histone deacetylase inhibition. *Neurogastroenterol Motil*, **27**, 1831-1836.
- Monroy, E., Hernandez-Torres, E. & Flores, G. (2010) Maternal separation disrupts dendritic morphology of neurons in prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens in male rat offspring. *J Chem Neuroanat*, **40**, 93-101.
- Moparthi, L., Kichko, T.I., Eberhardt, M., Hogestatt, E.D., Kjellbom, P., Johanson, U., Reeh, P.W., Leffler, A., Filipovic, M.R. & Zygmunt, P.M. (2016) Human TRPA1 is a heat sensor displaying intrinsic U-shaped thermosensitivity. *Sci Rep*, **6**, 28763.
- Moqrich, A., Hwang, S.W., Earley, T.J., Petrus, M.J., Murray, A.N., Spencer, K.S., Andahazy, M., Story, G.M. & Patapoutian, A. (2005) Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science*, **307**, 1468-1472.
- Moriarty, O., McGuire, B.E. & Finn, D.P. (2011) The effect of pain on cognitive function: a review of clinical and preclinical research. *Prog Neurobiol*, **93**, 385-404.
- Morin, C. & Bushnell, C.M. (1998) Temporal and qualitative properties of cold pain and heat pain: a psychophysical study. *Pain*, **74**, 67-73.
- Morrison, S.F. & Nakamura, K. (2019) Central Mechanisms for Thermoregulation. *Annu Rev Physiol*, **81**, 285-308.

- 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.
- Muley, M.M., Krustev, E. & McDougall, J.J. (2016) Preclinical Assessment of Inflammatory Pain. *CNS Neurosci Ther*, **22**, 88-101.
- Nakamoto, K., Taniguchi, A. & Tokuyama, S. (2020) Changes in opioid receptors, opioid peptides and morphine antinociception in mice subjected to early life stress. *Eur J Pharmacol*, **881**, 173173.
- Navratilova, E., Xie, J.Y., King, T. & Porreca, F. (2013) Evaluation of reward from pain relief. *Ann N Y Acad Sci*, **1282**, 1-11.
- Nersesyan, Y., Demirkhanyan, L., Cabezas-Bratesco, D., Oakes, V., Kusuda, R., Dawson, T., Sun, X., Cao, C., Cohen, A.M., Chelluboina, B., Veeravalli, K.K., Zimmermann, K., Domene, C., Brauchi, S. & Zakharian, E. (2017) Oxytocin Modulates Nociception as an Agonist of Pain-Sensing TRPV1. *Cell Rep*, **21**, 1681-1691.
- Neugebauer, V., Han, J.S., Adwanikar, H., Fu, Y. & Ji, G. (2007) Techniques for assessing knee joint pain in arthritis. *Mol Pain*, **3**, 8.
- Noel, J., Zimmermann, K., Busserolles, J., Deval, E., Alloui, A., Diochot, S., Guy, N., Borsotto, M., Reeh, P., Eschaliere, A. & Lazdunski, M. (2009) The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J*, **28**, 1308-1318.
- Norrzell, U. & Craig, A.D. (1999) Behavioral thermosensitivity after lesions of thalamic target areas of a thermosensory spinothalamic pathway in the cat. *J Neurophysiol*, **82**, 611-625.
- Nozadze, I., Tsiklauri, N., Gurtskaia, G. & Tsagareli, M.G. (2016) Role of thermo TRPA1 and TRPV1 channels in heat, cold, and mechanical nociception of rats. *Behav Pharmacol*, **27**, 29-36.
- O'Callaghan, J.P. & Holtzman, S.G. (1975) Quantification of the analgesic activity of narcotic antagonists by a modified hot-plate procedure. *J Pharmacol Exp Ther*, **192**, 497-505.
- Ogawa, H., Hayama, T. & Yamashita, Y. (1988) Thermal sensitivity of neurons in a rostral part of the rat solitary tract nucleus. *Brain Res*, **454**, 321-331.
- Ong, W.Y., Stohler, C.S. & Herr, D.R. (2019) Role of the Prefrontal Cortex in Pain Processing. *Mol Neurobiol*, **56**, 1137-1166.
- Paniagua, N., Giron, R., Goicoechea, C., Martin-Fontelles, M.I. & Bagues, A. (2020) Maternal separation affects the electrophysiological properties of Delta-fibres and nociceptive behaviours in male and female mice. *Int J Dev Neurosci*, **80**, 538-546.
- Park, U., Vastani, N., Guan, Y., Raja, S.N., Koltzenburg, M. & Caterina, M.J. (2011) TRP vanilloid 2 knock-out mice are susceptible to perinatal lethality but display normal thermal and mechanical nociception. *J Neurosci*, **31**, 11425-11436.
- Patel, R. & Dickenson, A.H. (2020) A study of cortical and brainstem mechanisms of diffuse noxious inhibitory controls in anaesthetised normal and neuropathic rats. *Eur J Neurosci*, **51**, 952-962.

- Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S. & Patapoutian, A. (2002) A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*, **108**, 705-715.
- Petitjean, H., Rodeau, J.L. & Schlichter, R. (2012) Interactions between superficial and deep dorsal horn spinal cord neurons in the processing of nociceptive information. *Eur J Neurosci*, **36**, 3500-3508.
- Plotsky, P.M. & Meaney, M.J. (1993) Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res*, **18**, 195-200.
- Pogorzala, L.A., Mishra, S.K. & Hoon, M.A. (2013) The cellular code for mammalian thermosensation. *J Neurosci*, **33**, 5533-5541.
- Poisbeau, P., Gazzo, G. & Calvel, L. (2018a) Anxiolytics targeting GABA(A) receptors: Insights on etifoxine. *World J Biol Psychiatry*, **19**, S36-S45.
- Poisbeau, P., Grinevich, V. & Charlet, A. (2018b) Oxytocin Signaling in Pain: Cellular, Circuit, System, and Behavioral Levels. *Curr Top Behav Neurosci*, **35**, 193-211.
- Poisbeau, P., Keller, A.F., Aouad, M., Kamoun, N., Groyer, G. & Schumacher, M. (2014) Analgesic strategies aimed at stimulating the endogenous production of allopregnanolone. *Front Cell Neurosci*, **8**, 174.
- Polgar, E., Al-Khater, K.M., Shehab, S., Watanabe, M. & Todd, A.J. (2008) Large projection neurons in lamina I of the rat spinal cord that lack the neurokinin 1 receptor are densely innervated by VGLUT2-containing axons and possess GluR4-containing AMPA receptors. *J Neurosci*, **28**, 13150-13160.
- Pongs, O. (1999) Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement. *FEBS Lett*, **452**, 31-35.
- Prescott, S.A. & Ratte, S. (2012) Pain processing by spinal microcircuits: afferent combinatorics. *Curr Opin Neurobiol*, **22**, 631-639.
- Price, T.J., Cervero, F. & de Koninck, Y. (2005) Role of cation-chloride-cotransporters (CCC) in pain and hyperalgesia. *Curr Top Med Chem*, **5**, 547-555.
- Raja, S.N., Carr, D.B., Cohen, M., Finnerup, N.B., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F.J., Mogil, J.S., Ringkamp, M., Sluka, K.A., Song, X.J., Stevens, B., Sullivan, M.D., Tutelman, P.R., Ushida, T. & Vader, K. (2020) The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*, **161**, 1976-1982.
- Ran, C., Hoon, M.A. & Chen, X. (2016) The coding of cutaneous temperature in the spinal cord. *Nat Neurosci*, **19**, 1201-1209.
- Randall, L.O. & Selitto, J.J. (1957) A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, **111**, 409-419.
- Reker, A.N., Chen, S., Etter, K., Burger, T., Caudill, M. & Davidson, S. (2020) The Operant Plantar Thermal Assay: A Novel Device for Assessing Thermal Pain Tolerance in Mice. *eNeuro*, **7**.

- Rexed, B. (1954) A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol*, **100**, 297-379.
- Reynolds, D.V. (1969) Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science*, **164**, 444-445.
- Roque, A., Ochoa-Zarzosa, A. & Torner, L. (2016) Maternal separation activates microglial cells and induces an inflammatory response in the hippocampus of male rat pups, independently of hypothalamic and peripheral cytokine levels. *Brain Behav Immun*, **55**, 39-48.
- Rossi, H.L. & Neubert, J.K. (2009) Effects of hot and cold stimulus combinations on the thermal preference of rats. *Behav Brain Res*, **203**, 240-246.
- Schiff, M. (1858) *Lehrbuch der Physiologie des Menschen: I. Muskel- und Nervenphysiologie*.
- Schmidt, R., Schmelz, M., Forster, C., Ringkamp, M., Torebjork, E. & Handwerker, H. (1995) Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci*, **15**, 333-341.
- Schwaller, F. & Fitzgerald, M. (2014) The consequences of pain in early life: injury-induced plasticity in developing pain pathways. *Eur J Neurosci*, **39**, 344-352.
- Schweinhart, P. & Bushnell, M.C. (2010) Pain imaging in health and disease--how far have we come? *J Clin Invest*, **120**, 3788-3797.
- Seibt, F. & Schlichter, R. (2015) Noradrenaline-mediated facilitation of inhibitory synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord involves interlaminar communications. *Eur J Neurosci*, **42**, 2654-2665.
- 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.
- SFETD (2017) *Livre Blanc de la Douleur 2017*.
- Sharkey, K.A., Sobrino, J.A. & Cervero, F. (1987) Evidence for a visceral afferent origin of substance P-like immunoreactivity in lamina V of the rat thoracic spinal cord. *Neuroscience*, **22**, 1077-1083.
- Sherrington, C.S. (1903) Qualitative difference of spinal reflex corresponding with qualitative difference of cutaneous stimulus. *J Physiol*, **30**, 39-46.
- Siemian, J.N., Arenivar, M.A., Sarsfield, S., Borja, C.B., Erbaugh, L.J., Eagle, A.L., Robison, A.J., Leininger, G. & Aponte, Y. (2021) An excitatory lateral hypothalamic circuit orchestrating pain behaviors in mice. *Elife*, **10**.
- Slater, R., Fabrizi, L., Worley, A., Meek, J., Boyd, S. & Fitzgerald, M. (2010) Premature infants display increased noxious-evoked neuronal activity in the brain compared to healthy age-matched term-born infants. *Neuroimage*, **52**, 583-589.
- Snider, W.D. & McMahon, S.B. (1998) Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron*, **20**, 629-632.
- Sorge, R.E., Martin, L.J., Isbester, K.A., Sotocinal, S.G., Rosen, S., Tuttle, A.H., Wieskopf, J.S., Acland, E.L., Dokova, A., Kadoura, B., Leger, P., Mapplebeck, J.C., McPhail, M., Delaney, A., Wigerblad,

- G., Schumann, A.P., Quinn, T., Frasnelli, J., Svensson, C.I., Sternberg, W.F. & Mogil, J.S. (2014) Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. *Nat Methods*, **11**, 629-632.
- Stein, R.A. & Strickland, T.L. (1998) A review of the neuropsychological effects of commonly used prescription medications. *Arch Clin Neuropsychol*, **13**, 259-284.
- Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S. & Patapoutian, A. (2003) ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*, **112**, 819-829.
- Suarez-Pereira, I., Llorca-Torralba, M., Bravo, L., Camarena-Delgado, C., Soriano-Mas, C. & Berrocoso, E. (2022) The Role of the Locus Coeruleus in Pain and Associated Stress-Related Disorders. *Biol Psychiatry*, **91**, 786-797.
- Taddio, A. & Katz, J. (2005) The effects of early pain experience in neonates on pain responses in infancy and childhood. *Paediatr Drugs*, **7**, 245-257.
- Talbot, K., Madden, V.J., Jones, S.L. & Moseley, G.L. (2019) The sensory and affective components of pain: are they differentially modifiable dimensions or inseparable aspects of a unitary experience? A systematic review. *Br J Anaesth*, **123**, e263-e272.
- Todd, A.J. (2010) Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci*, **11**, 823-836.
- Todd, A.J., Spike, R.C., Young, S. & Puskar, Z. (2005) Fos induction in lamina I projection neurons in response to noxious thermal stimuli. *Neuroscience*, **131**, 209-217.
- Treede, R.D., Meyer, R.A., Raja, S.N. & Campbell, J.N. (1995) Evidence for two different heat transduction mechanisms in nociceptive primary afferents innervating monkey skin. *J Physiol*, **483 (Pt 3)**, 747-758.
- Treede, R.D., Rief, W., Barke, A., Aziz, Q., Bennett, M.I., Benoliel, R., Cohen, M., Evers, S., Finnerup, N.B., First, M.B., Giamberardino, M.A., Kaasa, S., Korwisi, B., Kosek, E., Lavand'homme, P., Nicholas, M., Perrot, S., Scholz, J., Schug, S., Smith, B.H., Svensson, P., Vlaeyen, J.W.S. & Wang, S.J. (2019) Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). *Pain*, **160**, 19-27.
- Tzschentke, T.M. (2007) Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol*, **12**, 227-462.
- Urban, M.O. & Gebhart, G.F. (1999) Supraspinal contributions to hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7687-7692.
- Vandewauw, I., De Clercq, K., Mulier, M., Held, K., Pinto, S., Van Ranst, N., Segal, A., Voet, T., Vennekens, R., Zimmermann, K., Vriens, J. & Voets, T. (2018) A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing. *Nature*, **555**, 662-666.
- Veldhuijzen, D.S., Greenspan, J.D., Kim, J.H. & Lenz, F.A. (2010) Altered pain and thermal sensation in subjects with isolated parietal and insular cortical lesions. *Eur J Pain*, **14**, 535 e531-511.

- Verge, V.M., Richardson, P.M., Benoit, R. & Riopelle, R.J. (1989) Histochemical characterization of sensory neurons with high-affinity receptors for nerve growth factor. *J Neurocytol*, **18**, 583-591.
- Vestergaard, M., Carta, M., Guney, G. & Poulet, J.F.A. (2023) The cellular coding of temperature in the mammalian cortex. *Nature*, **614**, 725-731.
- Vezzani, A. & Viviani, B. (2015) Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. *Neuropharmacology*, **96**, 70-82.
- Viana, F., de la Pena, E. & Belmonte, C. (2002) Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression. *Nat Neurosci*, **5**, 254-260.
- Vierck, C.J., Acosta-Rua, A.J., Rossi, H.L. & Neubert, J.K. (2008a) Sex differences in thermal pain sensitivity and sympathetic reactivity for two strains of rat. *J Pain*, **9**, 739-749.
- Vierck, C.J., Hansson, P.T. & Yeziarski, R.P. (2008b) Clinical and pre-clinical pain assessment: are we measuring the same thing? *Pain*, **135**, 7-10.
- Vierck, C.J. & Yeziarski, R.P. (2015) Comparison of operant escape and reflex tests of nociceptive sensitivity. *Neurosci Biobehav Rev*, **51**, 223-242.
- Vivancos, G.G., Verri, W.A., Jr., Cunha, T.M., Schivo, I.R., Parada, C.A., Cunha, F.Q. & Ferreira, S.H. (2004) An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz J Med Biol Res*, **37**, 391-399.
- Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flockerzi, V. & Nilius, B. (2004) The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature*, **430**, 748-754.
- Vriens, J., Nilius, B. & Voets, T. (2014) Peripheral thermosensation in mammals. *Nat Rev Neurosci*, **15**, 573-589.
- Vriens, J., Owsianik, G., Hofmann, T., Philipp, S.E., Stab, J., Chen, X., Benoit, M., Xue, F., Janssens, A., Kerselaers, S., Oberwinkler, J., Vennekens, R., Gudermann, T., Nilius, B. & Voets, T. (2011) TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron*, **70**, 482-494.
- Wang, F., Belanger, E., Cote, S.L., Desrosiers, P., Prescott, S.A., Cote, D.C. & De Koninck, Y. (2018) Sensory Afferents Use Different Coding Strategies for Heat and Cold. *Cell Rep*, **23**, 2001-2013.
- Wilcox, C.E., Mayer, A.R., Teshiba, T.M., Ling, J., Smith, B.W., Wilcox, G.L. & Mullins, P.G. (2015) The Subjective Experience of Pain: An fMRI Study of Percept-Related Models and Functional Connectivity. *Pain Med*, **16**, 2121-2133.
- Willis, W.D., Trevino, D.L., Coulter, J.D. & Maunz, R.A. (1974) Responses of primate spinothalamic tract neurons to natural stimulation of hindlimb. *J Neurophysiol*, **37**, 358-372.
- Woolfe, G. & Macdonald, A.D. (1944) THE EVALUATION OF THE ANALGESIC ACTION OF PETHIDINE HYDROCHLORIDE (DEMEROL). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **80**, 300-307.

- Xiao, X., Ding, M. & Zhang, Y.Q. (2021) Role of the Anterior Cingulate Cortex in Translational Pain Research. *Neurosci Bull*, **37**, 405-422.
- Xiao, Y., Chen, X., Zhang, P.A., Xu, Q., Zheng, H. & Xu, G.Y. (2016) TRPV1-mediated presynaptic transmission in basolateral amygdala contributes to visceral hypersensitivity in adult rats with neonatal maternal deprivation. *Sci Rep*, **6**, 29026.
- Xu, F., Lin, M. & Lu, T.J. (2010) Modeling skin thermal pain sensation: Role of non-Fourier thermal behavior in transduction process of nociceptor. *Comput Biol Med*, **40**, 478-486.
- Xue, Y., Yang, Y., Tang, Y., Ye, M., Xu, J., Zeng, Y. & Zhang, J. (2016) In vitro thermosensitivity of rat lateral parabrachial neurons. *Neurosci Lett*, **619**, 15-20.
- Yalcin, I., Charlet, A., Freund-Mercier, M.J., Barrot, M. & Poisbeau, P. (2009) Differentiating thermal allodynia and hyperalgesia using dynamic hot and cold plate in rodents. *J Pain*, **10**, 767-773.
- Yalcin, I., Megat, S., Barthas, F., Waltisperger, E., Kremer, M., Salvat, E. & Barrot, M. (2014) The sciatic nerve cuffing model of neuropathic pain in mice. *J Vis Exp*.
- Yamamoto, T. & Nozaki-Taguchi, N. (2002) The role of cyclooxygenase-1 and -2 in the rat formalin test. *Anesth Analg*, **94**, 962-967, table of contents.
- Yoon, C., Wook, Y.Y., Sik, N.H., Ho, K.S. & Mo, C.J. (1994) Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain*, **59**, 369-376.
- Zhang, E.T. & Craig, A.D. (1997) Morphology and distribution of spinothalamic lamina I neurons in the monkey. *J Neurosci*, **17**, 3274-3284.
- Zhuo, M. & Gebhart, G.F. (1997) Biphasic modulation of spinal nociceptive transmission from the medullary raphe nuclei in the rat. *J Neurophysiol*, **78**, 746-758.
- Zimmermann, K., Leffler, A., Babes, A., Cendan, C.M., Carr, R.W., Kobayashi, J., Nau, C., Wood, J.N. & Reeh, P.W. (2007) Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. *Nature*, **447**, 855-858.
- Zotterman, Y. (1936) Specific action potentials in the lingual nerve of cat. *Skand. Arch. Physiol.* **75**, 105-119.

Intégration et plasticité de la thermonociception spinale chez le rat

Résumé

La détection et l'intégration des informations thermiques sont essentielles à la bonne survie et adaptation d'un organisme à son environnement. Ces travaux de thèse ont porté sur la compréhension fine des mécanismes sous-jacents au traitement des informations thermiques nociceptives. Cette analyse a été effectuée au sein des réseaux neuronaux pour la compréhension du codage électrique de ces dernières par les relais nociceptifs spinaux mais également au niveau comportemental, plus intégré, qui ajoute des composantes émotionnelles et cognitives à la réponse adaptative douloureuse des rats. Cette double approche permet d'appréhender dans son ensemble la complexité de la réponse des animaux vis-à-vis des stimulations thermiques chaudes et froides, potentiellement dangereuses pour l'intégrité de l'organisme

Mots-clés : douleur, nociception, thermosensibilité

Summary

Detection and integration of noxious thermal information are essential to the survival and the adaptation of an organism to its environment. The goal of this thesis aimed to further a fine understanding of the underlying mechanisms noxious thermal information's processing. This analysis was made within the spinal neuronal network as well as at the behavioural level, more integrated, which adds the emotional and cognitive component of the adaptive response to pain in rats. This double approach allows to apprehend in its entirety the complexity of animals' response to thermal hot and cold stimuli which are potentially dangerous for the organism's integrity.

Keywords : pain, nociception, thermosensitivity