Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2009

Thèse n°1671

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences Biologiques et Médicales

Option : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 04 Décembre 2009

Par Marie-Amélie PAPON

Née le 21 Août 1983 à Brive-la Gaillarde (19)

Régulation des sous-types d'hétérodimères du récepteur $GABA_B$ dans la moelle épinière en conditions de douleurs neuropathiques : Rôle des protéines partenaires

Membres du Jury

M. Daniel Voisin – Professeur – U862 Université Bordeaux 2……....Président

M. Eric Lingueglia – DR INSERM – IPMC Université de Nice.....……...Rapporteur

M. François Rassendren – DR CNRS – IGH Université de Montpellier 1 et 2…….Rapporteur

M. Laurent Groc – CR CNRS – UMR5091 Université Bordeaux 2.....…….Membre invité

M. Marc Landry – Professeur – U862 Université Bordeaux 2 .....……Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite remercier sincèrement les membres de mon jury de thèse : Monsieur Daniel Voisin qui a accepté de présider cette soutenance, Messieurs Eric Lingueglia et François Rassendren qui ont aimablement accepté d'être les rapporteurs de mon mémoire de thèse, et Monsieur Laurent Groc qui a accepté d'examiner ce travail.

Je tiens particulièrement à remercier Monsieur Frédéric Nagy pour m'avoir accueillie dans son laboratoire ainsi que pour sa disponibilité et son écoute en toutes circonstances, même lorsque le moment n'était pas nécessairement opportun. Vous avez su me conseiller, me rassurer, m'épauler à tout moment et je vous en suis très reconnaissante.

Je remercie très chaleureusement Monsieur Marc Landry pour m'avoir offert la grande opportunité de rejoindre son équipe en m'accueillant tout d'abord pour mon stage de Master 2, puis pour ces trois années de thèse riches d'enseignements et de rencontres inoubliables. Marc, c'est la première fois en 4 ans que je vais TE tutoyer!! Je te remercie de m'avoir fait confiance dans ce projet et de m'avoir confrontée à mes responsabilités car je n'aurais peut être pas sauté certaines barrières si tu ne m'y avais pas poussé. J'en suis sorti grandie et tu y es certainement pour beaucoup.

Un grand merci à Monsieur André Calas pour avoir consacré de son temps à la lecture et à la correction de ma thèse. Je le remercie également pour m'avoir donné l'opportunité de faire une émission de radio à ses cotés. Ce fut une expérience très enrichissante et j'en garderai un très bon souvenir !

Je voudrai vraiment remercier tous les membres du laboratoire sans ordre particulier pour leur aide et leur sympathie.

Tiphaine, mon binôme du labo, la seule personne à qui j'ai « tourné le dos » (si, si !!) pendant de longues journées passées dans le bureau mais avec qui j'ai pu discuter de choses toutes aussi intéressantes les unes que les autres. Binôme en tous genres, de congrès, mais aussi d'allergies aux rats ! Il est vrai qu'on n'était pas toujours très belles à voir avec nos yeux globuleux à déambuler dans les couloirs du laboratoire! Egalement, binôme de « pauses KitKat » même si on sait gérer de mieux en mieux nos pulsions! Ce fût sincèrement un réel plaisir de travailler quotidiennement à tes cotés! Ce congrès à Chicago me laissera un souvenir inoubliable! Vivement le prochain!

Alexandre pour avoir tenté par tous les moyens de me redonner goût à la biologie moléculaire. Merci de t'être autant investi à mes cotés dans cette galère de clonage et de sous-clonage. La raclette est toujours d'actualité!!

Encore un grand merci à Tiphaine, Alexandre mais aussi Claire et Thomas Papouin qui m'ont filé un énorme coup de main notamment sur la fin, dans les derniers moments les plus difficiles à gérer émotionnellement! Merci encore énormément à tous les 4 !

Dimitri, je retiendrai de tes conversations la curiosité que tu n'as de cesse d'éveiller en tous ceux qui t'entourent. Maintenant heureux papa, je vous souhaite plein de bonheur pour la suite à tous les trois !

Un grand merci à Monsieur Etienne Gontier pour sa disponibilité et son aide précieuse qu'il m'a accordées. Ce fût très enrichissant de travailler à tes côtés ! Merci encore Monsieur le Directeur et bonne continuation!

Pour mes premiers pas expérimentaux en ces murs, je ne peux que remercier Sophie qui m'a encadrée avec patience et pédagogie lors de mon arrivée au laboratoire. Tu m'as initiée à de multiples techniques et je dois dire que les bons réflexes appris au cours de ma formation de jeune Padawan me servent encore aujourd'hui. Je ne cesse de suivre ton chemin, puisque j'arrive normalement à Québec très bientôt!!

Désormais je l'espère membre actif de la confrérie des FRETeux, ma devise est d'être à l'image de mon enzyme préférée en donnant beaucoup sans rien attendre, excepté peut être l'illumination de ceux qui m'entourent.

Merci à Claire, Virginie, Rabia, mes trois petites mamans du labo. Je souhaite sincèrement vous remercier de tout le travail que vous faites car si j'ai pu évoluer pendant ces 4 années dans un tel environnement c'est certainement parce qu'il y a des personnes comme vous qui font beaucoup de sacrifices pour que l'équipe ne manque de rien. Merci pour cela et bien sûr pour tous les bons moments de rires et de discussions passés ensemble.

Merci aux électrophysiologistes, Yves et Fanny. Merci d'avoir passé autant de temps à patcher vos cellules sur le projet Fibuline malgré toutes les difficultés rencontrées! Fanny, incontestable Paloise, membre actif du Toutouyoutou, merci pour ton réconfort, ton aide, ton encouragement, les petits mots colorés que tu me laissais régulièrement sur mon bureau, mais aussi pour les nombreuses farces auxquelles tu t'es donné à cœur joie! Et libre à toi de faire Coco lors de ma soutenance de thèse !!

Merci au club des Salamanders : Jean-Marie, Hélène et Stéphanie, notre fournisseuse de Vitamine C pour nous aider à passer l'hiver! Toujours étrange de voir défiler courant Novembre dans les couloirs de l'institut un trafic de sacs de kiwis de 5kg (pas plus, pas moins !)! En tous cas, ils sont fameux et j'espère me souvenir que l'arbre à Kiwi est…l'actinidia et non le kiwitier !

Merci à Lien, Alberto, et à Pétra, à qui je passe le flambeau. Pétra, j'espère que mes petites souris B1-GFP que j'ai eu beaucoup de mal à faire parvenir à Bordeaux te porteront chance ! Bon courage pour la suite !

A Marie qui se démène beaucoup pour mener à bien l'organisation de son congrès en Egypte ! Et à Chérine, pour ses précieux conseils concernant les évènements post-congrès, il est vrai que d'après toi « Tout est bien ! », donc rendez-vous au mois de décembre !

A tous ceux qui ont traversé le labo plus ou moins longtemps: Pascal, Sarah, Anne-Cécile, Florence, le ptit Fred, notre chouchou Malik, Sabrina, Cédric, Vincent, et j'en oublie sûrement! Un merci tout particulier à « mes petits stagiaires » qui ont tous mis la main à la pâte pour l'élaboration de ce travail : Laurent Ladépèche et Delphine Bernard essentiellement, mais aussi Elodie Martial et Radwa Atef et enfin Georges Chalhoub qui me laissera un souvenir impérissable de l'encadrement!

Merci à Rafael Rodriguez-Puertas et Gabriel Barreda-Gomez pour m'avoir accueillie dans votre laboratoire et pour ce séjour sympathique à Bilbao.

Merci à Christel et Philippe pour m'avoir appris les techniques des « 3F »: FRET, FLIM, et FRAP !

Merci à tous mes amis ! Les Corréziens que j'ai un peu délaissés ces derniers temps : Edith et Rémy, So et Pice, Bertrand, Benoit... Merci à Sophie et JB et leur joli petit Antoine! Tata Pam aura le temps de venir te voir désormais!! Merci à Hervé qui m'encourage depuis un moment déjà !! Un grand merci à tous les autres pour votre soutien !

Evidemment je tiens à remercier tout particulièrement Ma Cr… !! Merci d'être toujours présente dans les moments de peine et de joie. Je sais que je peux toujours compter sur toi n'importe où, n'importe quand, et inversement! Eh oui, « Cr…Attitude Forever » !

Merci à Damien, qui a fait preuve d'une grande patience et qui a été témoin au quotidien de mes phases de déception et de joie. Merci pour ton aide précieuse ! Ta vision de pharmacien m'a beaucoup apprise ! Et merci aussi pour tes savoureux fondants au chocolat qui me remontent le moral à coup sûr !

Un grand merci à mes grands parents pour leur soutien et réconfort. A mon papi René qui serait sans doute très fier de voir où j'en suis arrivée et à ma Tati Lulu à qui je pense aussi très fort.

Evidemment, je ne peux oublier de remercier mes parents qui m'ont toujours fait confiance et qui m'ont toujours soutenu depuis le début. Merci à Çoise et ses moutons ! Bien sûr merci à mes sœurs, la ptite Lily, Marion et Pauline. Po, tu as vécu ma thèse tout autant que moi ! Merci pour l'écoute quotidienne de mon humeur du jour et pour tout le réconfort que tu m'apporte depuis le début!

Je tiens finalement à remercier tous ceux que je n'ai pas cités mais qui ont fait de ces trois années de labeur une formidable aventure humaine. J'en sors réellement grandie (si si j'vous assure !!)

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS 1

INTRODUCTION 3
CHAPITRE 1 : La douleur. Bases anatomiques et physiologiques de la nociception 5
1. Définition de la douleur 5
2. Aspect multidimensionnel de la douleur 6
3. Classifications des douleurs 8
4. Voies de transmission de la douleur : fonctionnement physiologique 10
4.1 Mécanismes périphériques de la nociception 11
4.1.1. Les nocicepteurs 11
4.1.2. Les médiateurs périphériques 13
4.1.3. Les fibres afférentes 14
4.2 Mécanismes spinaux de la nociception 15
4.2.1. Projections des fibres afférentes 16
4.2.2. Neuromédiateurs de la première synapse 17
4.2.3. Les différents types de neurones post-synaptiques 17
4.2.4. Les contrôles segmentaires spinaux 19
4.3 Voies ascendantes 21
4.4 Intégration corticale de la douleur 24
4.5 Contrôles descendants 25
CHAPITRE 2 : Les douleurs chroniques neuropathiques 27
1. Les douleurs chroniques neuropathiques 27
1.1. Epidémiologie des douleurs neuropathiques 27
1.2. Etiologies des douleurs neuropathiques 27
1.2.1. Atteinte des nerfs périphériques 27
1.2.2. Atteintes du système nerveux central 28
1.2.3. Autre classement étiologique 28
1.3. Sémiologie des douleurs neuropathiques 28
1.4. Examen du patient douloureux et évaluation de la douleur 29
1.5. Les traitements 31
1.5.1. Traitements médicamenteux 32
1.5.2. Traitements non médicamenteux 37
2. Les modèles animaux de douleurs neuropathiques 38
2.1. Les différents modèles animaux de douleurs neuropathiques 40
2.2. Les difficultés d'appréhender la douleur chez l'animal 43
2.3. Les recommandations éthiques 45
3. Transmission du message nociceptif lors des douleurs neuropathiques 47
3.1 Mécanismes à la périphérie 48
3.2 Modifications spinales 50
3.2.1. Modifications des propriétés intrinsèques des neurones 50
3.2.2. Augmentation de la balance excitatrice 51
3.2.3. Diminution de la balance inhibitrice 52
3.3. Les conséquences d'une désinhibition spinale 56
3.3.1 Révélation de circuits dormants 56
3.3.2 Action sur la transmission nociceptive 57
CHAPITRE 3 : Les récepteurs au GABA 59
1. Le GABA et ses récepteurs 59
2. Le récepteur $GABA_B$ métabotropique 59
2.1 Structure du récepteur $GABA_B$ 59
2.2 Mécanismes d'activation du récepteur $GABA_B$ 64
3. Variants d'épissage du récepteur $GABA_B$ 65

3.1 Différences de localisation 66
3.2 Différences de fonction *in vivo* 68
4. Pharmacologie du récepteur $GABA_B$ 68
5. Désensibilisation et perte de fonction du récepteur $GABA_B$ en conditions douloureuses 71
5.1. Effets controversés du baclofène 71
5.2. Mécanismes de désensibilisation rapide 72
5.3. Mécanismes de dysfonctionnement du récepteur $GABA_B$ 73
5.3.1. Interactions possibles avec des protéines partenaires spécifiques 73
5.3.2. Altérations de la diffusion membranaire 75
CHAPITRE 4 : Interactions protéiques différentielles 77
1 Etude d'une protéine chaperonne cytosolique, 14-3-3 77
2 Etude d'une protéine de la matrice extracellulaire, la fibuline-2 78
3 Etude d'un facteur de transcription, CHOP 81

OBJECTIFS 83
OBJECTIF PRINCIPAL : 85
OBJECTIFS SPECIFIQUES : 85

DONNEES EXPERIMENTALES 87
Contexte: 89
PUBLICATION I 91
PUBLICATION II 183
Etude de la mobilité et de la distribution du récepteur $GABA_B$ et de ses protéines associées en conditions normales et douloureuses 235

DISCUSSION GENERALE 251
I. DEFINITIONS IMPORTANTES 253
II. ROLES ET REGULATION DES RCPGs 253
II-1) Ontogénèse d'un récepteur 254
II-2) Régulation par un ligand 255
II-3) Transduction du signal 256
II-4) Internalisation 256
III. OLIGOMERISATION DES RCPGs A LA SURFACE CELLULAIRE 257
IV.ALTERATION LIEES A L'ETAT OLIGOMERIQUE DES RCPGs 258
V. PERTE D'EFFICACITE DU CONTROLE INHIBITEUR $GABA_B$ EN CONDITION DE DOULEUR CHRONIQUE 259
V-1) La technique de FRET pour mesurer l'état d'activation d'un RCPG 259
V-2) Interaction membranaire du récepteur $GABA_B$ et de la protéine cytosolique 14-3-3ζ : dé-dimérisation du récepteur $GABA_B$ post-synaptique 260
V-3) Interaction membranaire du récepteur $GABA_B$ et d'une protéine de la matrice extracellulaire, la fibuline-2 : diminution de l'activation du récepteur $GABA_B$ pré-synaptique 262
VI .DOULEUR ET APPROCHES THERAPEUTIQUES 269
VI-1. Effets controversés du baclofène 269
VI-2. Avantages d'une « down-régulation fonctionnelle » 270
VI-3. Les cell penetrating peptides (CPP) comme vecteurs thérapeutiques 272
VI-4. Multiplicité des cibles pertinentes pour la réversion des douleurs chroniques 273
VI-5. Nécessité de nouvelles approches thérapeutiques 274

CONCLUSION 277

MATERIEL ET METHODES 281

ANNEXES 303
ANNEXE 1 : Lexique de termes reliés à la douleur (selon IASP 1986) 305
ANNEXE 2 : Synthèse Peptidique En Phase Solide 306
ANNEXE 3 : Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) et Flurescence Lifetime Imaging Measurement (FLIM) 307
ANNEXE 4 : Autre Publication 310
ANNEXE 5 : Communications orales, Posters et Publications 325

BIBLIOGRAPHIE 327

RESUME

Dans le système nerveux central, le récepteur inhibiteur $GABA_B$ est un archétype des RCPGs hétérodimériques. Il est composé en effet de deux sous-unités, la sous-unité $GABA_{B1}$ (B1a ou B1b) qui lie l'agoniste et la sous-unité $GABA_{B2}$ couplée aux protéines G.
L'activation de ce récepteur a un effet antinociceptif bien établi concernant les douleurs aiguës mais son effet reste cependant très limité en cas de douleurs neuropathiques. Notre hypothèse est que son activation et sa signalisation peuvent être altérées par des protéines partenaires, aboutissant à des processus de désinhibition dans la moelle épinière en conditions de neuropathie.
Nos résultats mettent en évidence le rôle de deux protéines partenaires qui sont surexprimées en conditions douloureuses et qui diminuent l'activation du récepteur $GABA_B$ via deux mécanismes différents. D'un part, la protéine cytosolique 14-3-3ζ induit la dissociation de l'hétérodimère B1b/B2. Cette action a lieu principalement dans les compartiments post-synaptiques. D'autre part, la fibuline-2, protéine de la matrice extracellulaire diminue l'activation de l'hétérodimère B1a/B2. Il s'agit cette fois préférentiellement d'une action dans les compartiments pré-synaptiques.
Des stratégies anti-sens (siRNA anti-14-3-3ζ ou anti-fibuline-2) ou des peptides de compétition sélectifs de l'interaction B1b/14-3-3ζ permettent de potentialiser les effets antinociceptifs d'un agoniste du récepteur sur un modèle animal de neuropathie.
L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'état d'oligomérisation des RCPGs peut être modulé *in vivo* par des protéines partenaires endogènes impliquées dans le développement ou le maintien d'états pathologiques de sensibilisation à la douleur.

Mots-clés : récepteur $GABA_B$, désinhibition, moelle épinière, douleur neuropathique, protéine partenaire, fibuline-2, 14-3-3ζ, rat.

ABSTRACT

In the central nervous system, the inhibitory $GABA_B$ receptor is an obligate heterodimeric GPCR that requires the association between $GABA_{B1}$ (B1a or B1b) and $GABA_{B2}$ subunits.
The heterodimeric $GABA_B$ receptor activation has a well-known antinociceptive action in acute pain but its effect appears limited in pathological states. Our hypothesis is that the $GABA_B$ activation and signaling could be altered by partner proteins, thus resulting in desinhibition processes in the spinal cord.
In the present study, we investigated the role of two partner proteins overexpressed in neuropathic states which decrease $GABA_B$ activation through two different mechanisms. On the one hand, the cytosolic 14-3-3ζ protein induces the dissociation of the heterodimer B1b/B2. This effect occurs in post-synaptic compartments. On the other hand, fibulin-2, an extracellular matrix protein, which decreases the activation of the heterodimer B1a/B2 localized preferentially in presynaptic compartments.
Anti-sens strategies (anti-14-3-3ζ or anti-fibulin-2 siRNA) or competing peptides specific of 14-3-3ζ/B1b interaction, potentiate the antinociceptive effects of $GABA_B$ agonist in an animal model of neuropathic pain.
Taken together, our data suggest that GPCR oligomeric state can be modulated *in vivo* by endogenous partners proteins that are involved in the development and the maintenance of pain sensitization.

Key words : $GABA_B$ receptor, disinhibition, spinal cord, neuropathic pain, partner protein, fibulin-2, 14-3-3ζ, rat.

LISTE DES ABREVIATIONS

AC : Adénylate cyclase
ACSF : Artificial cerebral spinal fluid
ADN : Acide DesoxyriboNucléique
AMPA : Acide Aminométhylphosphonique
ARNm : Acide RiboNucléique Messager
ASIC : Acid Sensing Ionic Channels
ATP : Adénosine triphosphate
AVC : Accident Vasculaire Cérébral

B1 ou B2 : Sous-unités $GABA_{B1}$ ou $GABA_{B2}$
B1 (919-927) / B1 (922-930) : Competing peptides corresponding to amino acids 919-927 or 927-930 of the GABAB1 protein
Baclofen : Acide (±)-β-(Aminométhyl)-4-chlorobenzènepropanoïque
BDNF : Brain-derived neurotrophic factor
BoNT : C1-type botulinum neurotoxin
BRET : Bioluminescence resonance energy transfer
BSA : Bovin serum albumin

CHAPS : 3-[(3-Cholamidopropyl)-diméthylammonio]-1-propanesulfonate
CIDN : Contrôle inhibiteur diffus nociceptif
CGRP : Calcitonin gene related peptide
CCI : Chronic constriction injury
CCK : Cholecystokinine
Contra / Ipsi : Contralateral / Ipsilateral to the spinal nerve ligation
COPI : Coat protein I complex
CPP : Cell penetrating peptide
CREB : cAMp-reponse-element-binding protein
C-ter / N-ter : C-terminus / N-terminus

DH / VH : Dorsal horn / Ventral horn
DMEM : Dubelcco Modified Eagle Medium
DREZ : Dorsal Root Entry Zone
DRG : Dorsal root ganglia
DsRed : Discosoma *sp* red fluorescent protein

EDTA : EthyleneDiamineTetraAcetique
EFNS : European federation of neurological societies
ER / RE : Endoplasmic reticulum / Réticulum endoplasmique

(2P)-FLIM : (Two-photon)-Fluorescent lifetime imaging measurement
FRET : Fluoresence ou Förster resonance energy transfer

$GABA_B$: γ-aminobutyric acid (type B receptor)
GAD65 : GABA decarboxylase enzyme
GDNF : Glial Cell Derived Neurotrophic Factor
GDP / GTP : Guanidyl diphosphate / Guanidyl triphosphate
GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP : Green fluorescent protein
GPCR / RCPG : G protein-coupled receptor / Récepteur couplé aux proteines G

HA : Hemagglutinin
HEPES : 4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid
HKR : Hepes-buffered Krebs-Ringer solution
HRP : Horse raddish peroxydase
5-HT : 5-Hydroxytriptamine ou sérotonine

IASP : International Association for the Study of Pain
IB4 : Isolectin B4
IP : Immunoprecipitation
IR : Immunoreactivity
ISH : *In situ* hybridization

KCC2 : KCl co-transporteur de type 2
Kir : Inwardly rectifying potassium

L5-L6 : Lumbar 5th and 6th branches of the spinal nerve
LB : Luria Bertani
LDH : Lactate dehydrogenase

MAPK : Mitogen-activated protein kinase
mmRNA : Mismatch RNA
Myc : Myelocytomatosis

NA : Noradrénaline
NF : Neurofilament
NGF : Nerve growth factor
NK1 : Neurokinin receptor 1
NKCC1 : Co-transporteur Na-K-Cl
NMDA : N-methyl-D-aspartic acid
NO : Monoxyde d'azote
NPY : Neuropeptide Y
NS : Non significant
NT cells : Non transfected cells

PAF : ParaFormaldéhyde
PAGE : PolyAcrylamide Gel electrophoresis
PB / PBS : Phosphate buffer / Phophate buffer saline
PKA, PKB : Protein kinase A, B
PM : Poids Moléculaire
PSL (PNL) : Partial Sciatic (Nerve) Ligation
pVEC : Peptide derived from vascular endothelial cadherin

qRT-PCR : Quantitative real time polymerase chain reaction
Raf : Raf protein kinase
RT : Room temperature

SCI : Spinal cord (Injury)
SEM : Standard error of the mean
SG : Substance gélatineuse
SGPA : Substance grise périaqueducale
siRNA : Small interference RNA
SNC : Système nerveux central
SNL : Spinal Nerve Ligation
SP : Substance P
SRD : Subnucleus reticularis dorsalis
SVF : Serum de Veau Fœtal

TBE : Tris Borate EDTA
TBS : Tris Buffer Salin
TENS : Transcutaneous electrical nerve stimulation
TNB : Tris-HCl NaCl Blocking
TNT : Tris-HCl NaCl Tween
TCSPC : Time correlated single photon counting
TRPM8 : Transient receptor potential menthol8
TRPV1 : Transient receptor potential vanilloid1
TTX : Tetrodotoxin

VGLUT : Vesicular glutamate transporter
VIP : Vasoactive intestinal peptide
VFT : Venus flytrap module
WB : Western blot
WDR : Wide dynamic range

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : La douleur. Bases anatomiques et physiologiques de la nociception

Le vocabulaire médical est riche en locutions ou qualificatifs permettant de caractériser une douleur : « en coup de poignard », « lancinante », « fulgurante », « térébrante », etc. Cette pluralité témoigne de la variété des sensations perçues mais aussi de la difficulté à les décrire de façon précise.

Au sein des systèmes sensoriels, la douleur constitue un signal d'alarme visant à protéger l'organisme : elle déclenche des réactions qui vont permettre d'en diminuer la cause et ainsi d'en limiter les conséquences.

Contrairement à ce que l'on pourrait penser *a priori*, l'abolition de la douleur ne procure aucun avantage : les cas pathologiques d'insensibilité congénitale à la douleur sont dramatiques et requièrent un environnement protégé pour éviter à ces sujets d'être perpétuellement atteints de brûlures, fractures, blessures (Cox et al. 2006; Verpoorten et al. 2006). On conçoit alors qu'un système aussi complexe que celui qui génère la douleur n'ait pu évoluer au travers des pièges de la sélection, sans que les espèces animales n'en tirent bénéfice.

Cependant, à l'instar des autres fonctions de l'organisme, cette fonction d'alarme peut subir des dérèglements. Un excès de nociception dû à la prolongation du stimulus, ou une lésion neurologique sur les voies nociceptives, peut entraîner des modifications plus ou moins réversibles du système nociceptif. Une pathologie très répandue provient de la persistance de la douleur qui devient chronique : initialement simple symptôme résultant d'une stimulation nociceptive, cette sensation va se modifier au cours du temps du fait de facteurs neurophysiologiques, psychologiques, comportementaux et sociaux. Si l'on considère la douleur chronique qui peut durer des mois voire des années, l'effet protecteur physiologique fait place à un état pathologique qui n'est pas seulement inutile, mais délétère.

1. Définition de la douleur

La racine latine du terme « douleur » est « *dolor* » qui signifie punition ou peine. Dans les sociétés protohistoriques, la douleur était considérée comme le résultat de l'introduction de démons ou de fluides magiques dans le corps humain. Plus tard, les médecins égyptiens l'ont reliée à l'expérience sensorielle, dont ils localisèrent le « centre » dans le cœur. Ce concept a été repris par Platon, et surtout par Aristote, qui avait fait du cœur le centre de toutes les fonctions vitales et le siège de l'âme.

Au Moyen Âge, la médecine, dominée par la philosophie d'Aristote, assimile le cœur à un centre de la sensibilité. Il faudra attendre Léonard de Vinci et Descartes **(Figure 01)** pour que les systèmes nerveux périphérique et central soient impliqués dans cette sensibilité.

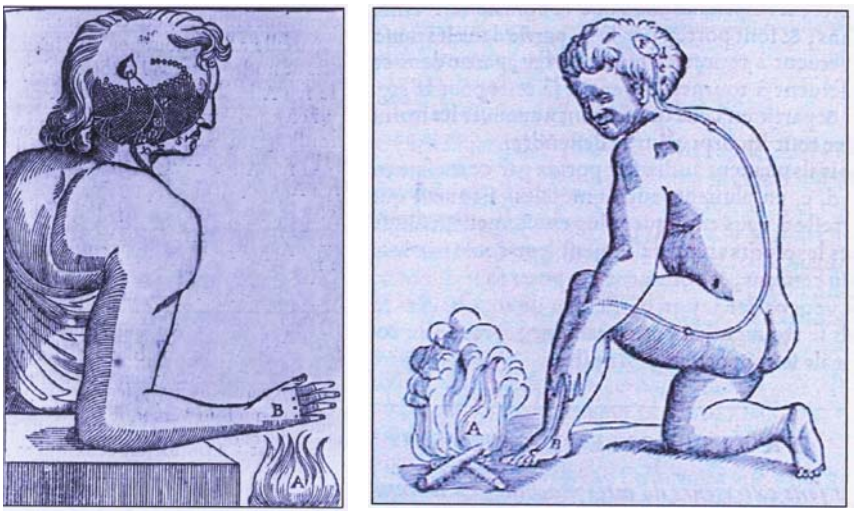


Figure 01 : Transmission de la douleur impliquant les systèmes nerveux central et périphérique selon René Descartes (1648).

Ce n'est qu'au XIXe siècle que les conceptions actuelles de la douleur se développent, en particulier à partir des travaux de Müller et de von Frey. Ils suggèrent que la douleur peut résulter de la stimulation de récepteurs et de la mise en jeu de voies spécifiques.

Malgré la multiplicité des concepts qui jalonnent l'histoire de la recherche sur la douleur, la définition générale la plus acceptée dans le monde est celle proposée par l'Association internationale pour l'étude de la douleur (International Association for the Study of Pain - IASP-) qui définit la douleur comme « *une sensation désagréable et une expérience émotionnelle en réponse à une atteinte tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite en ces termes* ». Cette définition met l'accent sur le fait que la douleur est un évènement neuropsychologique.

2. Aspect multidimensionnel de la douleur

L'expression "*no brain, no pain*" de Patrick Wall illustre le fait qu'en l'absence de cerveau, il n'y a pas de douleur. Cet aspect rend compte de la difficulté à appréhender la douleur sous sa seule dimension neurophysiologique. Incontestablement, la douleur constitue une expérience personnelle et subjective fondamentale chez l'homme. Elle est influencée par l'éducation, les circonstances, l'attention ainsi qu'un certain nombre d'autres paramètres psychologiques. L'accident ou la maladie engendrent des signaux qui pénètrent dans un système nerveux actif,

où préexistent expérience, culture, anxiété, dépression... Ces processus cérébraux participent activement à la sélection, à l'analyse et à la synthèse de l'ensemble des informations sensorielles reçues. La douleur est un phénomène dynamique avec des interactions continues entre des systèmes complexes, ascendants et descendants.
Le concept de douleur comme perception tient donc compte de l'expérience et de l'attention mais ne doit pas négliger la dimension motivationnelle, comme la recherche d'un soulagement, et l'aspect affectif pénible car une douleur peut devenir accablante, monopoliser l'attention et interrompre la pensée et l'action.

L'existence de différents types de douleurs peut être expliquée par l'identification de quatre composantes principales de la douleur : sensori-discriminative, motivo-affective, cognitive et comportementale.

La composante sensori-discriminative permet d'identifier, localiser et coter en termes de durée et d'intensité le stimulus nociceptif.

La composante motivo-affective (aspect désagréable de la douleur) implique les centres nerveux supérieurs et des fonctions comme la mémoire et l'apprentissage. Ainsi, la perception de la douleur peut être modifiée par un ensemble de processus mentaux tels les niveaux d'attention, de distraction, de mémorisation et d'anticipation mais aussi par le contexte et la signification accordés à la douleur. Par exemple, une forte émotion, un état de stress aigu ou même simplement une intense concentration peuvent supprimer une sensation douloureuse.

La composante cognitive correspond aux processus mentaux mis en jeu par la douleur, ou, pour le dire en d'autres termes, à la signification, consciente ou non, qu'y accorde le patient. Cette composante est éminemment dépendante de facteurs socio-culturels ainsi que de l'histoire personnelle et familiale du patient (interprétation de la situation présente, référence à des situations passées vécues ou observées).

Enfin, la composante comportementale désigne les comportements associés à la présence de la douleur, du réflexe d'évitement aux expressions faciales.

Le douloureux a son histoire, ses traits de personnalité, sa propre sensibilité à la douleur, son seuil de tolérance. Il faut donc souligner l'importance de la communication, de l'information qui passe par la relation de confiance à établir avec son patient. La douleur du patient est unique ; elle ne peut plus être ignorée ; elle doit être reconnue et traitée.

3. Classifications des douleurs

Pour optimiser le traitement de la douleur, il est indispensable de distinguer les différents types de douleurs et de comprendre leurs origines. En effet, le traitement est radicalement différent selon le type de douleur en jeu. Il existe une classification selon des critères différents :

- En fonction de la **localisation** de la stimulation

Suivant son origine, la douleur est qualifiée différemment. La douleur provenant de la peau est qualifiée de superficielle, celle provenant des muscles, des organes internes et des articulations est qualifiée de profonde.

- En fonction de **la vitesse** de l'influx douloureux

L'influx douloureux est véhiculé par deux grandes voies :

L'une correspond à la **douleur rapide** (4-36 m.sec-1) véhiculée par les fibres Aδ, faiblement myélinisées, responsables de la douleur localisée et précise. Elle est capable de discriminer la topographie, la qualité. Elle rejoint le thalamus latéral par le faisceau néo-spinothalamique puis le cortex sensitif dans les aires S1 et S2 (voies de la sensation).

L'autre est celle de la **douleur tardive** (0,4-2 m.sec-1) véhiculée par les fibres C amyéliniques, responsables de la douleur diffuse lente. Après un relais au niveau des structures du tronc cérébral, l'information douloureuse rejoint le thalamus médian, puis les structures limbiques et le cortex frontal (voies de l'émotion et du comportement).

Une stimulation brève et intense excite les deux types de terminaisons et la différence entre les vitesses de conduction des deux types de fibres explique le décalage des sensations ressenties **(Figure 02).**

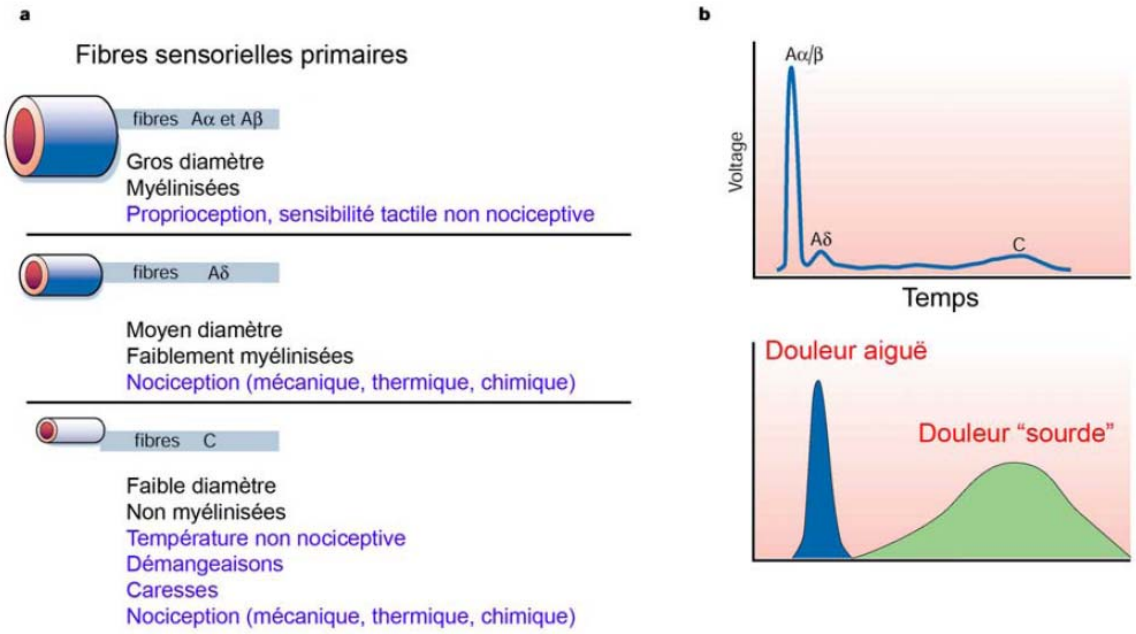


Figure 02 : **L'activation de différents types de fibres sensorielles primaires correspond à différentes phases de douleur.**
a. Les neurones sensoriels primaires incluent les fibres myélinisées de gros et de moyen diamètre (respectivement Aα/β et Aδ), et non myélinisées, de faible diamètre (type C).
b. En haut : enregistrement des potentiels extracellulaires d'un nerf périphérique et type de fibre sensorielle primaire correspondant (établi selon les vitesses de conduction des différentes fibres). En bas, type de douleur ressentie à la même échelle de temps. *(Modifié d'après Julius & Basbaum, 2001).*

- En fonction de la **durée**

La notion de durée est également essentielle. Toute douleur aigüe se manifeste par une sensation désagréable, où le patient ressent une menace de son intégrité corporelle. Généralement limitées à l'organe atteint (carie, brûlure…), les douleurs aigües sont des douleurs d'alarme, vives, précoces, bien localisées, qui s'accompagnent de vives réactions végétatives (tachycardie, tachypnée, sueurs) et de réactions motrices (réflexe de retrait).

Les **douleurs chroniques** (> 3 à 6 mois) peuvent, par leur durée, conduire à une atteinte grave de la personnalité (insomnies, troubles de l'humeur, dépression). Il n'existe alors plus de relation claire entre l'ampleur de la lésion organique et l'intensité de la douleur chronique. Parmi les douleurs chroniques, on distingue les douleurs inflammatoires, les douleurs neuropathiques, et les douleurs cancéreuses qui occupent une place à part car elles peuvent présenter à la fois des composantes inflammatoires et neuropathiques.

Le passage de douleurs aigues à douleurs chroniques se caractérise par des modifications du système nerveux central, liées à la plasticité neuronale dont les mécanismes seront détaillés par la suite.

- En fonction **du mécanisme**

Les progrès de la neurophysiologie permettent de définir aujourd'hui trois grandes catégories de douleurs en fonction du mécanisme: les douleurs par excès de nociception, les douleurs neuropathiques et les douleurs psychogènes.

Les douleurs par excès de nociception

Les douleurs par "excès de nociception" (ou douleurs nociceptives) sont de loin les plus fréquentes. Elles résultent de lésions des tissus périphériques, qui provoquent un excès d'influx douloureux transmis par un système nerveux intact. Ce sont les douleurs habituelles des brûlures, des traumatismes, des suites d'une opération et d'un grand nombre de maladies. Celles-ci engendrent des douleurs aiguës (rage de dents, infarctus du myocarde, occlusion intestinale, colique néphrétique...). C'est la douleur qui alerte, permettant de mettre en jeu des fonctions motrices pour se soustraire au danger.

Les douleurs neuropathiques

Autrefois appelées douleurs neurogènes, les douleurs neuropathiques sont dues à des lésions ou dysfonctionnements du système nerveux, d'origine périphérique ou centrale. Notre étude s'intéressera exclusivement à ce type de douleur dont les spécificités sont détaillées dans le chapitre II.

Les douleurs psychogènes

Les douleurs psychogènes regroupent toutes les douleurs que nous ne savons pas classer dans l'une des deux catégories précédentes. Ce sont des douleurs sans lésions apparentes, malgré un bilan médical approfondi. Les présentations typiques sont les céphalées chroniques, les douleurs continues du bas du dos, les douleurs faciales atypiques, et des douleurs abdominales ou pelviennes d'étiologie inconnue. Leur dimension essentielle semble résider dans le psychisme, avec l'intervention de phénomènes psychologiques amplifiant la sensation douloureuse. Il peut s'agir d'une pathologie psychiatrique avérée (hystérie, hypocondrie). Il s'agit le plus souvent de facteurs psychogènes liés à la tension, à l'anxiété ou à la dépression.

4. Voies de transmission de la douleur : fonctionnement physiologique

Causées par des maladies ou des accidents, les douleurs ont de multiples origines. Elles se déclinent aussi différemment selon les personnes et leur sensibilité. Toutefois, les voies de la

douleur peuvent se généraliser comme suit. Suite à une lésion, un message d'alerte est envoyé au cerveau via un réseau de fibres sensorielles spécialisées et activées uniquement par un stimulus nociceptif. L'influx sensoriel généré par ces nocicepteurs primaires active des neurones (dits secondaires) de la moelle épinière qui projettent, via plusieurs structures relais, dans le cortex, déclenchant la perception douloureuse.

4.1 Mécanismes périphériques de la nociception

Le terme « nociception » fut utilisé pour la première fois par Sherrington en 1906 pour définir la signalisation des évènements douloureux par les organes sensoriels responsables de la douleur. Les nocicepteurs peuvent être très activés sans qu'il y ait douleur - à l'opposé, une douleur peut être très intense sans activation majeure des nocicepteurs (Derbyshire et al. 2004; Singer et al. 2004; Raij et al. 2005). La nociception découle donc d'une activité nerveuse engendrée par une stimulation potentiellement dangereuse pour l'organisme et la douleur évoquera le ressenti.

4.1.1. Les nocicepteurs

Les stimuli nociceptifs ont en commun de menacer l'intégrité du corps et d'activer un ensemble discret d'organes sensoriels, les « nocicepteurs ». Ils déclenchent un répertoire varié mais limité de réponses réflexes et comportementales qui sont généralement associées à la perception de la douleur. Un nocicepteur est défini par l'IASP comme « *un récepteur plus particulièrement sensible à un stimulus nociceptif ou potentiellement nociceptif* ». Ces récepteurs sont présents dans tout l'organisme, avec une densité variable, mais ils sont absents du système nerveux central. Ce sont souvent des terminaisons nerveuses libres où l'on retrouve des récepteurs ou des canaux ioniques qui permettent de convertir la stimulation nociceptive en activité électrique (Scholz et al. 2002; Woolf et al. 2007). Ainsi, les récepteurs TRPV1-3 (Caterina et al. 2000; Dhaka et al. 2006), TREK-1 (Alloui et al. 2006; Cohen et al. 2009) et TRPM8 (Colburn et al. 2007; Dhaka et al. 2007) permettront la transduction de l'information douloureuse thermique, respectivement au chaud et au froid. D'autres seront sensibles aux protons : ASIC1, aussi nommé ASIC (Garcia-Anoveros et al. 1997; Waldmann et al. 1997; Lingueglia 2007), TRPV1, DRASIC (Dorsal Root Acid-Sensing Ion Channel) aussi nommé ACIC3 (Waldmann et al. 1997; Price et al. 2001), et certains seront sensibles aux stimulations mécaniques (Hu et al. 2006) : MDEG, aussi nommé ASIC2 (Waldmann et al. 1996; Garcia-Anoveros and Corey 1997; Price et al. 2001), DRASIC, et TREK-1 **(Figure 03).**

Les nocicepteurs sont classés en deux groupes fonctionnellement distincts : ceux qui répondent à des stimulations mécaniques intenses (nocicepteurs mécaniques) et ceux qui répondent à d'autres types de stimuli nociceptifs (nocicepteurs polymodaux) :

- Les **nocicepteurs mécaniques** répondent à la piqûre, au pincement ou à la torsion de la peau avec une décharge qui dure tout le temps de la stimulation, sans adaptation. Leurs champs récepteurs sont larges (1 à 8 cm^2) composés de zones ponctuelles (1 mm^2) séparées par des zones silencieuses. Leurs fibres afférentes sont essentiellement de type Aδ.
- Les **nocicepteurs polymodaux** répondent non seulement à des stimuli mécaniques intenses mais aussi à la chaleur (45-60°C) et à des stimuli chimiques nociceptifs. Ils sont liés à des fibres C amyéliniques.

Il existe aussi des nocicepteurs polymodaux profonds, présents dans les tissus musculaires striés, musculaires lisses (viscères, vaisseaux), articulaires, osseux. Ils sont activés par l'ischémie, la distension, la contraction.

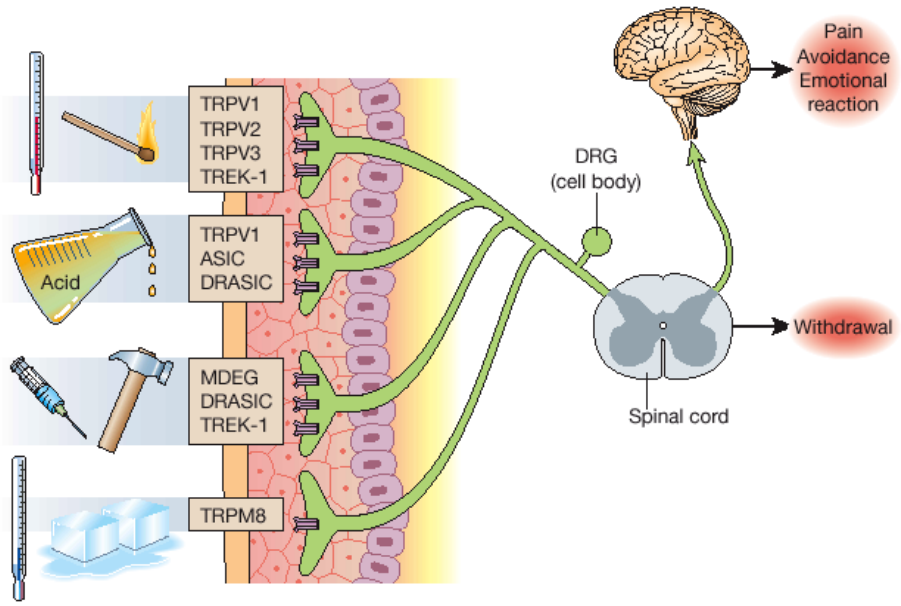


Figure 03 : Stimuli nociceptifs et transduction du signal. Les stimuli nociceptifs sont convertis en activité électrique à la périphérie des terminaisons des fibres amyéliniques de type C ou faiblement myélinisées de type Aδ, par des récepteurs spécifiques ou des canaux ioniques, sensibles à la chaleur, aux stimuli mécaniques, aux protons, ou au froid. Adapté de (Scholz and Woolf 2002).

4.1.2. Les médiateurs périphériques

Le message nociceptif initial peut être amplifié par des mécanismes d'hyperalgésie :

L'hyperalgésie primaire concerne les tissus lésés, les substances libérées augmentant l'inflammation au niveau lésionnel. Elle se traduit par une modification des réponses avec un seuil d'activation plus bas, une latence diminuée, des réponses exagérées aux stimuli habituels non nociceptifs (allodynie) voire une activité spontanée (Coutaux et al. 2005).

L'hyperalgésie secondaire concerne les tissus sains péri-lésionnels, les fibres adjacentes étant sensibilisées par le biais du réflexe d'axone. Cette amplification du message nociceptif joue un rôle dans le déclenchement de l'alerte et des réactions servant à la maîtriser. **Le réflexe d'axone** ou « inflammation neurogène » correspond à la libération en périphérie des neuropeptides algogènes (substance P, CGRP, neurokinine A) présents dans le ganglion rachidien. Ces neuropeptides circulent par voie antidromique le long des fibres nociceptives activées. Ils sont libérés au niveau du site lésionnel ainsi qu'à la périphérie de la lésion initiale et vont intéresser progressivement tous les tissus sains adjacents. C'est une hyperalgésie en tache d'huile ou hyperalgésie secondaire **(Figure 04)** (Coutaux et al. 2005).

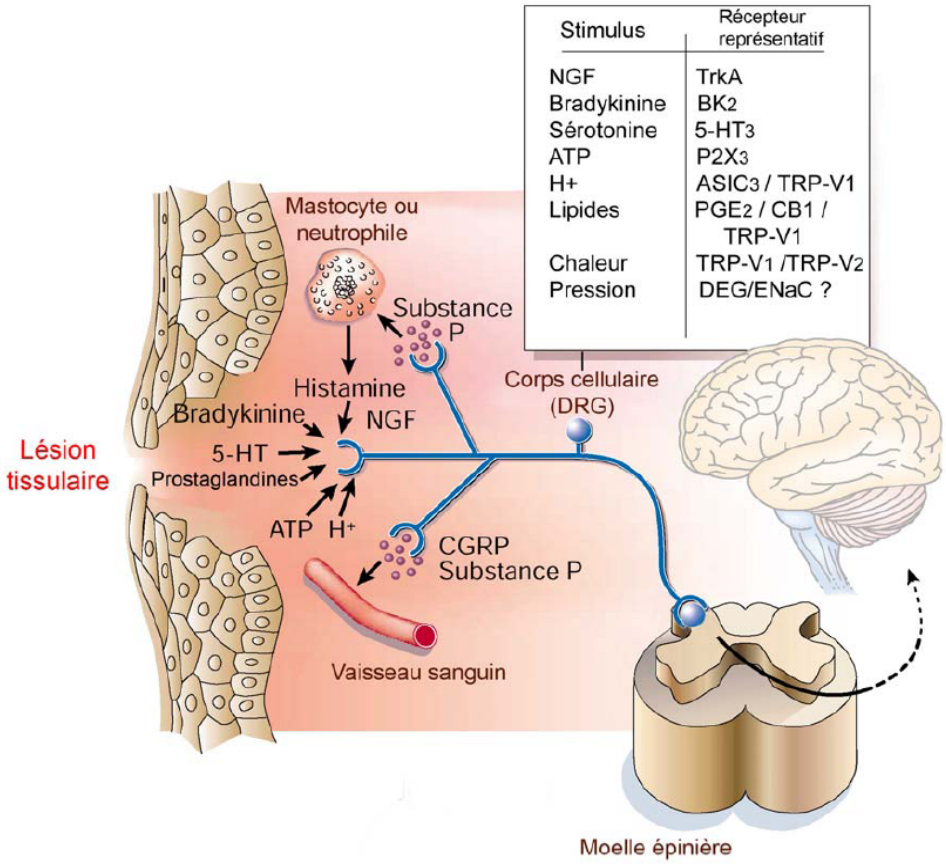


Figure 04 : **Mise en place de l'inflammation neurogène suite à une lésion tissulaire.**
Les nocicepteurs activés transmettent l'information sensorielle au système de la corne dorsale de la moelle épinière, mais induisent également la libération de médiateurs de l'inflammation au site de la blessure. Ces médiateurs vont agir sur les vaisseaux sanguins, ainsi que sur des cellules non neuronales qui vont à leur tour libérer des médiateurs de l'inflammation auxquels les neurones sensoriels primaires sont sensibles. (Modifié d'après Julius & Basbaum, 2001).

4.1.3. Les fibres afférentes

Selon leur diamètre, leur structure et leur vitesse de conduction, les fibres afférentes périphériques sont classées en trois types : des grosses fibres myélinisées à conduction rapide (Aβ), et des fibres peu (Aδ) ou pas myélinisées (C) à conduction lente (Braz et al. 2005; Woolf and Ma 2007). Généralement, les fibres Aβ provenant de la peau répondent à des stimuli mécaniques non nociceptifs, alors que les fibres Aδ et C sont des nocicepteurs ou thermorécepteurs **(Tableau 01).** Cependant, cette distinction n'est pas absolue et à la fois des nocicepteurs et non nocicepteurs existent dans les trois types de fibres.

De plus, les afférences non myélinisées (fibres C) comprennent une population hétérogène qui peut répondre à une variété de stimuli périphériques nociceptifs. On les classe en deux groupes majeurs : (1) les fibres C « peptidergiques » sensibles au NGF (Nerve Growth Factor) et contenant le CGRP et la substance P ; (2) les fibres C « non-peptidergiques » sensibles au

GDNF (Glial-Derived Neurotrophic Factor), liant la lectine IB4 et n'utilisant pas de neuropeptides (Braz et al. 2005; Chen et al. 2006). Les fibres C sont très nombreuses puisqu'elles représentent 80% de l'ensemble des fibres afférentes cutanées et la quasi-totalité des fibres afférentes viscérales. Toutes ces fibres nerveuses ont leur corps cellulaire dans les ganglions rachidiens dorsaux pour le tronc et les membres, ou dans les ganglions crâniens pour la face.

Type de neurone	**Fonction**	**Vitesse de conduction**	**Degré de myélinisation de l'axone**	**Taille du corps cellulaire (chez l'adulte)**
Aβ	Mécanorécepteur bas seuil (LTM)/ Nocicepteur	Elevée (36-72 m/s)	Elevé	> 50 µm
Aδ	Thermocepteur, Nocicepteur/ LTM	Moyenne (4-36 m/s)	Moyen	25-50 µm
C	Nocicepteur/ LTM	Faible (0,4-2 m/s)	Non myélinisé	< 25 µm

Tableau 01 : Différents types de neurones sensoriels primaires (Modifié d'après Kandel et al., Principles of Neural Science 4ème édition, 2000, MacGraw-Hilleds ; Lawson, 2002).

4.2 Mécanismes spinaux de la nociception

Après stimulation des nocicepteurs périphériques, le message gagne la moelle épinière par les racines dorsales **(Figure 05).** La corne dorsale de la moelle épinière est le premier relais central de l'information nociceptive. A ce niveau, le circuit neuronal comprend quatre éléments principaux **(Figure 06)**:

- les terminaisons axonales des fibres afférentes sensorielles
- les interneurones intrinsèques de la moelle épinière
- les neurones de projection montant vers le cerveau
- les terminaisons axonales provenant du cerveau.

4.2.1. Projections des fibres afférentes

La substance grise de la moelle épinière est classiquement divisée en 10 laminae basées sur des différences de densité et de taille des neurones (Rexed 1952) **(Figure 05).** Le réseau de la corne dorsale s'étend de la lamina I, fine et superficielle, à la lamina VI profonde. La lamina II, aussi appelée substance gélatineuse à cause de son apparence translucide lorsqu'elle est observée sur des tissus frais, est habituellement divisée en lamina II externe (IIo) et lamina II interne (IIi). Les laminae I-IIi et III-VI englobent respectivement la corne dorsale superficielle et profonde. Les laminae I, IIo, V et VI sont principalement impliquées dans le traitement de l'information nociceptive, alors que les laminae III-IV concernent principalement, bien que non exclusivement, le traitement des informations somato-sensorielles non-nociceptives (D'Mello et al. 2008).

Les fibres afférentes primaires rejoignent la mœlle épinière par les racines postérieures. Les fibres Aδ projettent principalement sur les laminae I-IIo, la partie ventrale de la lamina IV, et la lamina V. Les fibres C non-peptidergiques (IB4-positive) projettent préférentiellement sur la lamina IIi, alors que les fibres C peptidergiques projettent principalement sur les laminae I-IIo, avec une petite partie vers les couches profondes (Braz et al. 2005) **(Figure 05).** Elles envoient également des collatérales aux étages médullaires sus et sous-jacents, réalisant un recouvrement important entre des territoires différents. Les fibres C provenant des structures viscérales vont se projeter sur les couches profondes (V-VI). Les grosses fibres Aβ vont projeter à l'intérieur d'une région qui s'étend de la lamina IIi à la lamina V **(Figure 05).** Elles interviennent dans la théorie du portillon ou « Gate control », (Melzack et al. 1965). Ainsi, les neurones de la couche V reçoivent des afférences de toutes les catégories de fibres. Ces informations peuvent être cutanées, musculaires ou viscérales. Cette convergence viscéro-spatiale permet d'expliquer l'origine des douleurs projetées.

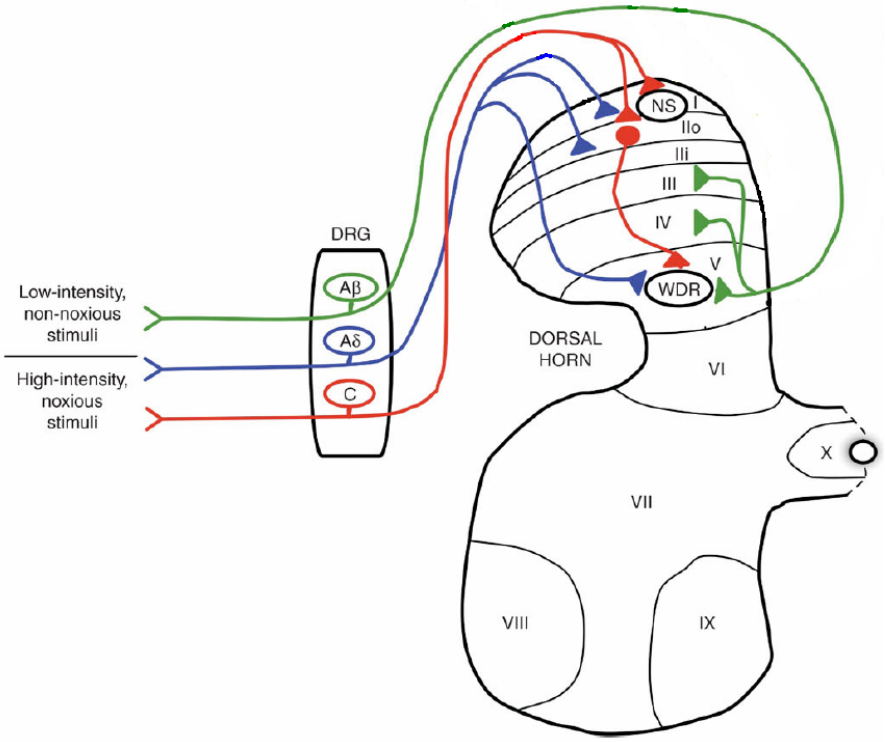


Figure 05 : **Principaux sites de projection des fibres afférentes primaires dans la corne dorsale de la moelle épinière.** Les couches sont identifiées par un numéro selon la classification de Rexed (1952). NS : neurone nociceptif spécifique ; WDR : neurone à convergence (*Wide Dynamic Range*) ; IIo : Lamina II externe ; IIi : Lamina II interne *(Modifié d'après D'Mello et Dickenson, 2008).*

4.2.2. Neuromédiateurs de la première synapse

L'activation des fibres afférentes nociceptives périphériques provoque l'excitation de neurones spinaux situés dans les couches superficielles et profondes de la corne postérieure de la moelle **(Figure 06).** Les neurotransmetteurs intervenant dans cette première synapse sont nombreux et variés. Pas moins d'une vingtaine de substances sont potentiellement libérées à ce niveau. Outre l'adénosine triphosphate (ATP), on retrouve des acides aminés excitateurs (glutamate, aspartate) et des peptides, eux-mêmes excitateurs (substance P, Calcitonin Gene Related Peptide -CGRP-, cholecystokinine) ou inhibiteurs (galanine, neuropeptide Y) (Xu et al. 2008). La substance P et le glutamate jouent un rôle important mais non exclusif dans la transmission du message nociceptif **(Figure 06).**

4.2.3. Les différents types de neurones post-synaptiques

Le relais médullaire se fait avec trois types de neurones : (1) les neurones de faible seuil qui répondent à des stimuli de faible intensité, (2) les neurones nociceptifs spécifiques (NS) qui ne véhiculent que des stimuli douloureux de haute intensité médiés par les fibres Aδ ou C et (3) les neurones nociceptifs non spécifiques, appelés aussi « neurones à convergence » ou

« Wide Dynamic Range (WDR) », qui peuvent répondre à la fois à des stimuli douloureux et non douloureux. Les neurones nociceptifs spécifiques sont plus volontiers localisés dans les couches superficielles (I et II) tandis que les WDR le sont préférentiellement dans les couches profondes (IV-V) (Price et al. 2003). Un WDR transporte les informations venant d'un champ récepteur cutané, viscéral, et/ou musculaire. La convergence des afférences sensitives de provenances variées (peau, muscles ou viscères) sur les neurones à convergence spinothalamiques de la corne postérieure transportant jusqu'au cerveau des influx d'origines topographiques diverses et de qualités différentes (nociceptifs ou non), est le support anatomique des douleurs projetées. Les douleurs projetées sont des douleurs rapportées par "erreur", lors de l'analyse corticale, au métamère cutané (le plus largement représenté), alors que l'origine réelle est viscérale, articulaire ou musculaire. En effet, la cartographie corticale pariétale possède une somatotopie topographique très précise pour la peau, mais imprécise pour les muscles, les vaisseaux et les viscères. Les douleurs référées sont d'interprétation plus difficile et sont le support de pièges bien connus en médecine. La convergence des influx à chaque niveau métamérique explique les douleurs de mâchoire et de membre supérieur lors des infarctus myocardiques, le Mac Burney de l'appendicite, les douleurs interscapulaires d'origine vésiculaire.

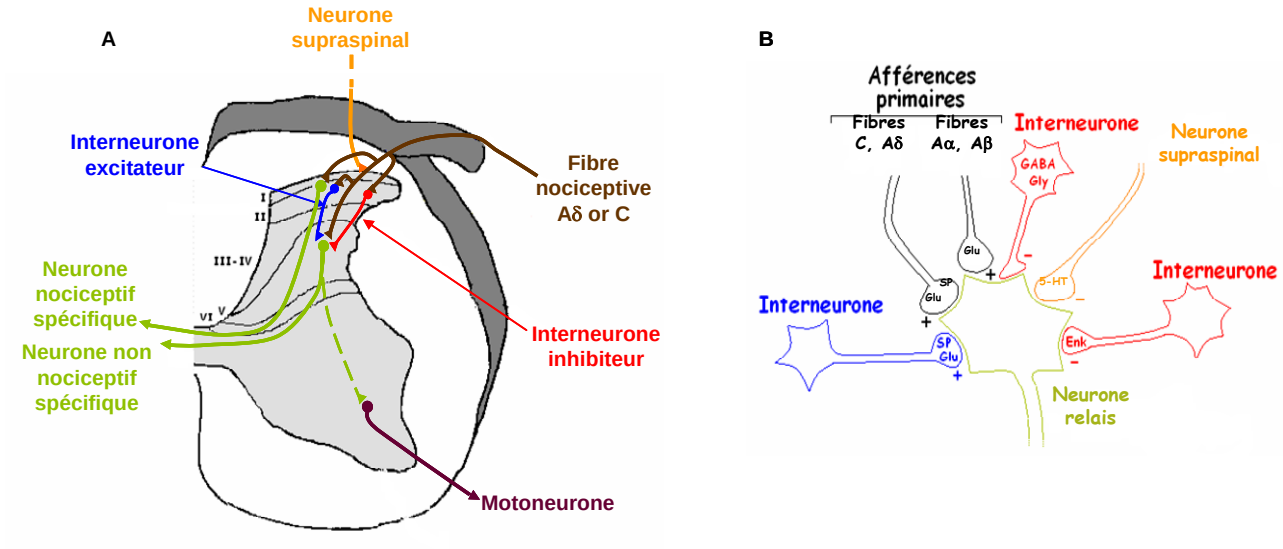


Figure 06 : (A) Schématisation du premier niveau d'intégration au niveau spinal. Les fibres afférentes font synapse au niveau de structures glomérulaires où se retrouvent neurones supraspinaux, interneurones excitateurs et inhibiteurs, et neurones spinaux nociceptifs spécifiques et non spécifiques. (B) Les interneurones inhibiteurs libèrent du GABA et/ou de la glycine (Gly), alors que les interneurones excitateurs libèrent de la substance P (SP) et/ou du glutamate (Glu).

4.2.4. Les contrôles segmentaires spinaux

Les contrôles segmentaires spinaux font intervenir des interneurones (INs) excitateurs et inhibiteurs intrinsèques, en majorité intrasegmentaires (INs locaux), ou envoyant leur axone vers d'autres segments de la moelle (INs propriospinaux) **(Figure 06).** Le ratio d'interneurones inhibiteurs/excitateurs dans la corne dorsale superficielle est d'environ 30%/70% (Polgar et al. 2003). Les interneurones inhibiteurs jouent un rôle important pour filtrer et limiter le flux de l'information nociceptive. Ils libèrent du GABA et/ou de la glycine mais aussi des peptides tels que la galanine et le neuropeptide Y. Plusieurs études ont montré un effet direct post-synaptique sur les neurones de projection, et une inhibition présynaptique au niveau des terminaisons des afférences primaires (Todd et al. 1993; Malcangio et al. 1996; Daniele et al. 2009). Les interneurones excitateurs jouent quant à eux un rôle d'amplificateur en libérant principalement du glutamate, de la substance P et/ou des cholécystokinines (CCK).

Melzack et Wall en 1965 ont proposé que l'activité des neurones à convergence était sous la dépendance de ces influences excitatrices et inhibitrices (Melzack and Wall 1965) **(Figure 07).** Dans leur théorie du portillon (*Gate control*), la transmission des messages nociceptifs est réglée par un effet de balance entre ces influences, la douleur ne survenant que lorsqu'il y a rupture d'équilibre en faveur des messages excitateurs, soit par excès de nociception, soit par déficit des contrôles inhibiteurs **(Figure 07).** L'activation des afférences cutanées de grand diamètre (Aβ) est capable de déclencher des effets inhibiteurs puissants sur les réponses nociceptives des neurones spinaux (Noordenbos 1959). Ainsi, le champ récepteur d'un neurone spinal comprend deux zones : une zone centrale excitatrice, et, en périphérie, une zone adjacente inhibitrice généralement plus large (Hillman et al. 1969). L'application de stimulations mécaniques légères dans cette zone périphérique active des fibres de type Aβ et réduit l'activité neuronale. Ainsi, l'existence de ces contrôles inhibiteurs segmentaires permet d'expliquer les effets hypoalgésiques déclenchés par des méthodes physiques de stimulation parfois très anciennes (frottements, stimulations électriques) d'une surface corporelle incluant le foyer douloureux ou voisine de celui-ci. Ce mécanisme explique aussi en partie les effets bénéfiques des stimulations électriques à haute fréquence et faible intensité, appliquées sur les nerfs périphériques (*Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation*, TENS). Il est probable que les contrôles inhibiteurs déclenchés par la TENS soient non seulement segmentaires mais aussi supraspinaux puisque ses effets analgésiques s'installent avec une latence de plusieurs minutes et se prolongent au-delà de la période de stimulation.

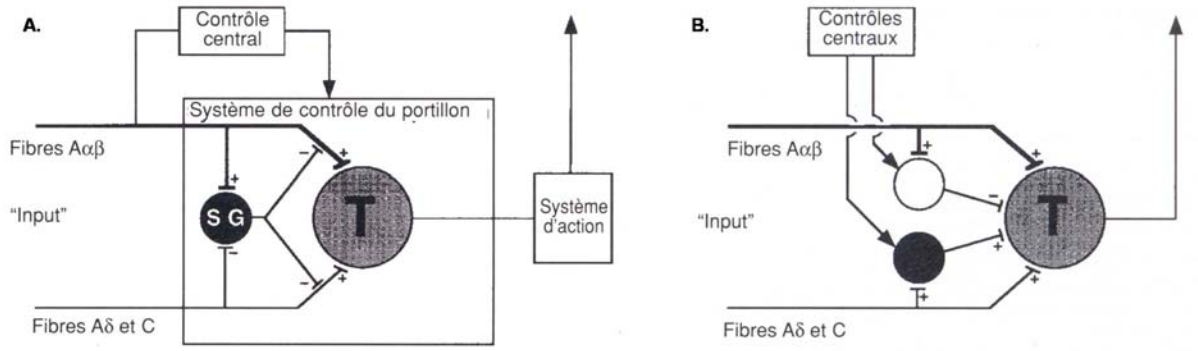


Figure 07 : (A) Théorie du portillon (ou Gate Control Theorie) de Melzack et Wall (Melzack and Wall 1965). Les interneurones de la substance gélatineuse (SG) régulent les informations provenant de la périphérie (input) vers les neurones à convergence (T = Trigger cells) par un mécanisme inhibiteur présynaptique. (B) Théorie du portillon modifiée par Wall en 1989. Les interneurones de la SG sont remplacés par un couple de neurones inhibiteur (cercle blanc) et excitateur (cercle noir), eux même sous influence centrale (Brasseur 1997).

D'autres systèmes participent à la modulation de l'information nociceptive au niveau spinal. Le système cholinergique : via les récepteurs muscariniques et nicotiniques, l'acétylcholine facilite l'inhibition GABAergique et glycinergique dans les couches superficielles et profondes de la moelle (Rashid et al. 2006; Takeda et al. 2007), et inhibe la transmission glutamatergique présynaptique (Zhang et al. 2009). Toutefois, l'activation des récepteurs nicotiniques peut aussi augmenter la transmission glutamatergique (Genzen et al. 2003).

Il existe aussi de nombreux récepteurs pré- et postsynaptiques aux opioïdes (Glaum et al. 1994), répartis en 3 classes : Mu, Delta, et Kappa. Ces récepteurs sont présents dans tout le système nerveux central mais également en périphérie. Les agonistes des récepteurs Mu (morphine) bloquent les réponses aux stimuli nociceptifs mécaniques, thermiques ou chimiques (Olson et al. 1995; Pan et al. 2008). Ces récepteurs sont très largement distribués dans le système nerveux central, en particulier au niveau des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière (Chen et al. 2002), dont bon nombre est situé sur les terminaisons des fibres afférentes primaires. Les endorphines sont des peptides endogènes qui miment l'action de la morphine et se fixent sur les récepteurs opiacés. Ces endorphines sont distribuées largement dans les structures cérébrales, principalement celles impliquées dans la nociception, et au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. Aussi, certains des interneurones évoqués plus haut sécrètent eux-mêmes des opioïdes endogènes. Ils appartiennent à trois grandes familles : la proenképhaline à l'origine des enképhalines, la pro-opio-mélanocortine à l'origine des bêta-endorphines et la prodynorphine à l'origine des dynorphines.

Enfin, il convient de noter l'existence d'une modulation intersegmentale (Jones et al. 2005). Ainsi, un effet hypoalgésique est évoqué par une stimulation des afférences Aδ du nerf sciatique (L4-L6) sur la réponse des afférences C du nerf saphène (L1-L3). Ce phénomène implique l'activation des récepteurs $GABA_B$ présynaptiques localisés sur les terminaisons des fibres C et réduisant le relargage de neurotransmetteurs excitateurs.

4.3 Voies ascendantes

La majorité des neurones de projection se trouve dans la lamina I, où ils représentent 5% de la population neuronale (Spike et al. 2003). Le reste est clairsemé dans les laminas III-VI. Environ 80% des neurones de projection de la lamina I, et une petite population dans les laminas III-IV, expriment le récepteur NK1 (récepteur à la Sustance P) et transmettent l'information nociceptive (Spike et al. 2003). Une partie d'entre eux peut déclencher les contrôles inhibiteurs descendants provoqués par des stimulations nociceptives (CIDN) (Lapirot et al. 2009) que nous aborderons par la suite.
La majeure partie des messages nociceptifs croise la ligne médiane par la commissure grise antérieure après relais avec les neurones de la corne dorsale. D'un point de vue fonctionnel, on distingue trois principaux faisceaux ascendants, les faisceaux spino-thalamique, spino-réticulaire et spino-ponto-mésencéphalique (Guirimand et al. 1996):

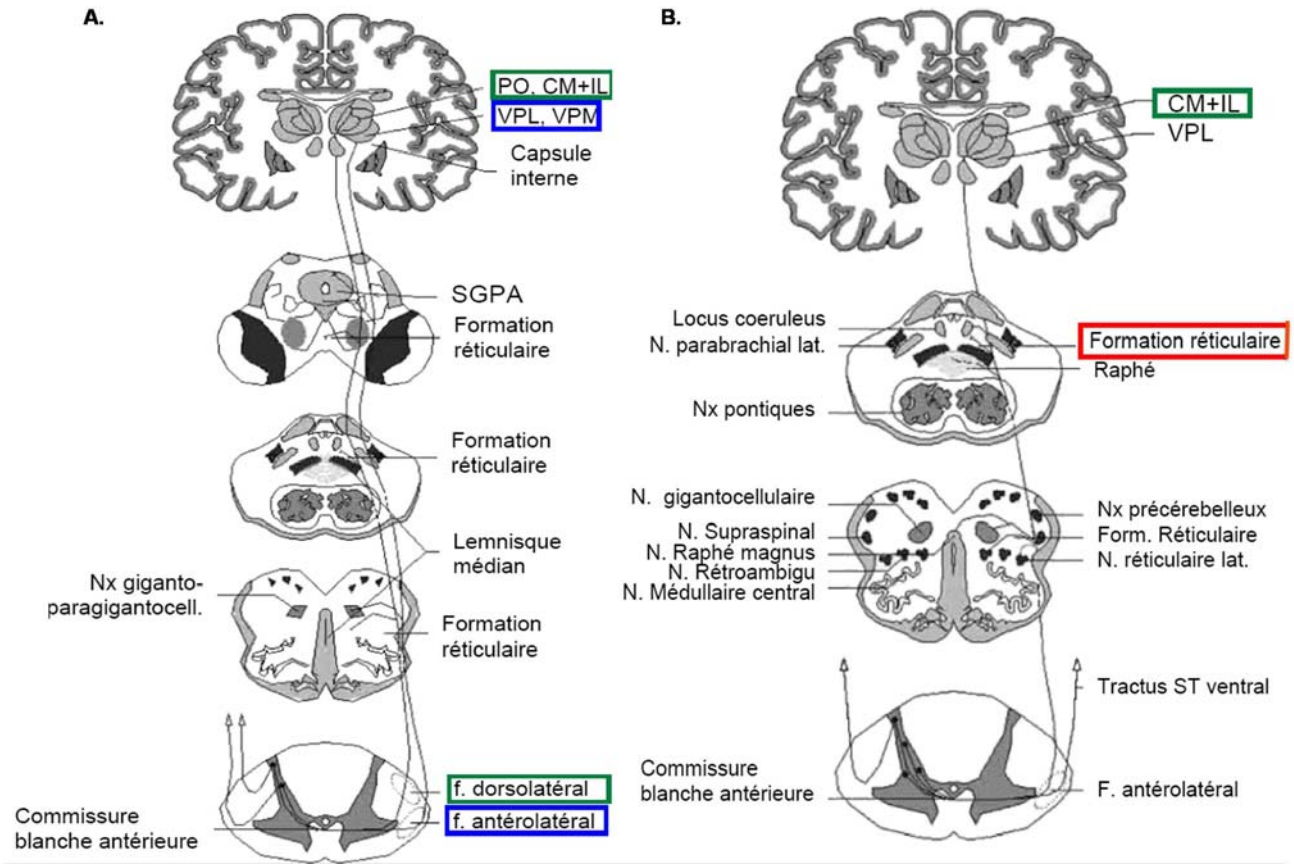
- Le faisceau spino-thalamique **(Figure 08A):** Il rassemble des neurones issus des couches I, IV, V, VI, VII, et VIII, dont la majorité répond à des stimulations nociceptives. Leurs fibres cheminent dans le quadrant antérolatéral de la moelle, du côté controlatéral à leur site d'origine et se projettent sur le thalamus latéral (VPL, VPM). Des neurones issus des couches VII et VIII de la corne antérieure se terminent dans les régions médianes du thalamus (CM, IL). Un contingent particulier, issu de la couche I, se projette vers le nucleus submedius. Les axones issus du thalamus latéral projettent principalement vers les aires somesthésiques primaires et secondaires (voies de la sensation).

- Le faisceau spino-réticulothalamique **(Figure 08B):** Ces neurones sont impliqués dans la nociception et leur axones cheminent également dans le quadrant antérolatéral. Cependant et contrairement au faisceau spinothalamique, une partie des fibres du faisceau spinoréticulaire reste du même côté que le corps cellulaire. Les régions cibles du faisceau spinoréticulaire sont, au niveau bulbo-pontique, les noyaux gigantocellulaire et réticulaire latéral, qui reçoivent des fibres issues de la corne antérieure, et une région très caudale, dénommée chez le rat, *subnucleus reticularis dorsalis* (SRD), qui reçoit des fibres issues

précisément des couches I et V (Villanueva et al. 1996). Ces fibres se projettent dans le thalamus médian (CM, IL) puis dans les structures limbiques et le cortex frontal avec intégration émotionnelle, mémorisation et adaptation comportementale (fuite, anticipation).

- Le faisceau spino-ponto-mésencéphalique **(Figure 08C):** Il se projette essentiellement sur deux structures du tronc cérébral, la substance grise périaqueducale (SGPA) et l'aire parabrachiale, située dans la région dorsolatérale du pont. L'aire parabrachiale reçoit des informations en provenance de la couche I de la moelle, par des fibres cheminant dans le funiculus postérolatéral.

Il existe d'autres faisceaux dont le rôle dans la nociception est moins bien connu. Ainsi, le faisceau spino-solitaire est issu des couches I, V, VII, VIII, et X et se projette vers le noyau du tractus solitaire. Ce dernier reçoit de nombreuses afférences vagales et pourrait donc être un site privilégié d'élaboration des réactions neurovégétatives accompagnant la perception de la douleur. Le faisceau spino-cervico-thalamique de Morin est issu des neurones de la couche IV, chemine dans le cordon dorsolatéral ipsilatéral et se termine au niveau du noyau cervical latéral. Après relais, les fibres empruntent le lemnisque médian et se projettent sur le thalamus controlatéral. Le rôle de ce faisceau dans la nociception est controversé.



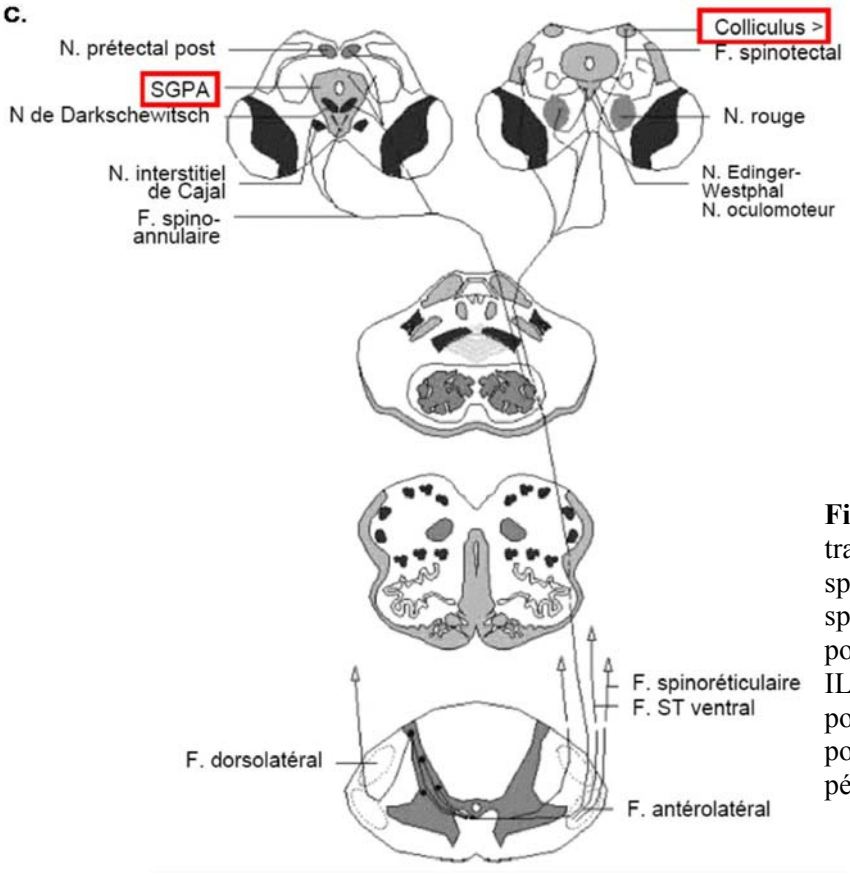


Figure 08: Système antérolatéral de la transmission nociceptive avec les voies spinothalamique (A), spinoréticulaire (B), et spinomésencéphalique (C). PO=thalamus postérieur ; CM=noyau centromédian ; IL=noyau intraliminaire, VP =noyau ventral postérieur latéral ; VPM=noyau ventral postérieur médian ; SGPA=substance grise périaqueducale.

4.4 Intégration corticale de la douleur

Les stimuli nociceptifs sont intégrés essentiellement au niveau de quatre principaux centres cérébraux : l'aire somatosensorielle primaire SI, l'aire somatosensorielle secondaire SII, le gyrus cingulaire antérieur GCA, et le cortex insulaire CI (Calvino et al. 2006; Tracey et al. 2007) **(Figure 09).** La compréhension grandissante du rôle des centres supérieurs dans la douleur nous permet de réaliser la complexité de l'équilibre entre les composantes sensorielles et affectives de la douleur. Certains centres supérieurs se spécialisent dans la composante sensori-discriminative de la douleur (SI et SII) pour nous donner des informations précises sur la localisation, l'intensité et toutes les autres qualités de la stimulation nociceptive. D'autres centres se spécialisent dans l'appréciation émotive de la douleur (GCA et CI). Nous savons aussi que la composante affective n'est pas uniquement associée à l'intensité de la stimulation mais qu'elle fait aussi référence à d'autres émotions comme l'anticipation ou la peur (Price 2000). Nous savons par exemple qu'il peut être « émotivement » difficile d'assister à la douleur d'une autre personne, particulièrement quand cette personne nous est liée. Une étude récente fait bien ressortir que l'empathie face à la douleur d'autrui active les mêmes centres cérébraux associés à la composante motivo-affective de la douleur comme si la douleur nous était propre, mais sans l'activité des centres associés à la composante sensori-discriminative (Singer et al. 2004).

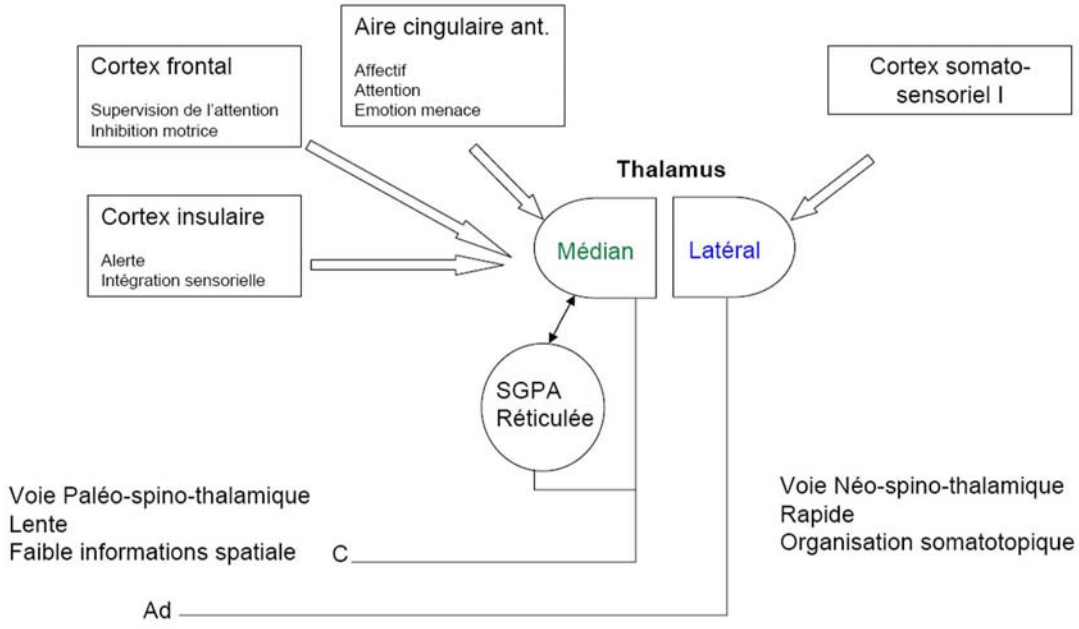


Figure 09 : Résumé des centres supra-spinaux de la nociception. Le relais thalamique est impliqué dans la composante sensori-discriminative par les projections du thalamus latéral vers le cortex somesthésique, mais aussi dans les réactions motrices et émotionnelles par les projections du thalamus médian vers les aires corticales motrices et fronto-orbitaires, le cortex insulaire et l'aire cingulaire.

4.5 Contrôles descendants

Schématiquement, trois types de contrôles inhibiteurs descendants ont été identifiés :

Contrôle tonique :

L'existence de ces contrôles a d'abord été mise en évidence par Sherrington au début du XXe siècle, par l'observation d'une facilitation des réflexes nociceptifs après section de la moelle, chez le chien (Sherrington 1906). Cette idée a été confirmée dans les années 70 par la technique du blocage réversible de la moelle par le froid (Hillman and Wall 1969). L'origine de ces contrôles est située dans la région bulbaire ventro-latérale (Duggan et al. 1988), et ils agissent par l'intermédiaire de la libération de monoamines (sérotonine, noradrénaline) sur les neurones spinaux.

Les contrôles descendant déclenchés par des stimulations cérébrales :

Ils sont issus du tronc cérébral (région bulbaire rostro-ventrale) pour agir sur la moelle (Tracey and Mantyh 2007). Au niveau bulbaire, plusieurs zones sont identifiées comme ayant une fonction analgésique : la substance grise périaqueducale (SGPA), le noyau raphé magnus (NRM), le noyau giganto cellulaire, le noyau réticulé latéral du tractus solitaire. A partir de cette région bulbaire, des fibres empruntent le funiculus dorsal et vont rejoindre les neurones spinaux à chaque étage et réaliser un effet inhibiteur sur les neurones à convergence. Les neuromédiateurs impliqués dans ce système inhibiteur sont les substances opioïdes, la sérotonine et la noradrénaline mais également la glycine et le GABA. En thérapeutique, les mécanismes sérotoninergiques inhibiteurs descendants justifient l'utilisation des antidépresseurs dans le traitement de la douleur. Des études d'électrophysiologie *in vitro* et *in vivo* ont montré que les systèmes sérotoninergiques et noradrénergiques agissent directement en hyperpolarisant les neurones de la lamina II, en inhibant la libération de glutamate des fibres afférentes Aδ et C, et en augmentant la libération de GABA et de glycine provenant des interneurones. Globalement, ces deux systèmes exercent des effets antinociceptifs.

Les contrôles inhibiteurs descendants déclenchés par stimulations nociceptives (CIDN) :

A la fin des années 1970, le concept du Contrôle Inhibiteur Diffus Nociceptif (CIDN) est proposé par Le Bars et collaborateurs (Le Bars et al. 1979; Le Bars et al. 1979). Les CIDN sont exclusivement déclenchés par la mise en jeu des fibres Aδ et C et agissent sur toutes les activités spontanées et évoquées des neurones à convergence spinaux et trigéminaux. Initialement, il avait été montré que cette stimulation nociceptive, en plus de conduire les

informations nociceptives vers les centres supérieurs par la voie spinothalamique, faisait intervenir des afférences dirigées vers différents centres du tronc cérébral dont la SGPA et les noyaux du raphé. Ceux-ci enverraient à leur tour des efférences inhibitrices vers les différents niveaux spinaux pour produire une inhibition diffuse **(Figure 10).** En réalité, ces structures ne semblent pas impliquées dans cette boucle spino-bulbo-spinale. Il s'agirait plutôt du *subnucleus reticularis dorsalis* (SRD), noyau très caudal dans la région bulbaire (Bouhassira et al. 1992; Bouhassira et al. 1993). Le rôle physiologique des CIDN dans le traitement de l'information nociceptive serait de filtrer les informations pour détecter le caractère nociceptif d'une stimulation. Les CIDN ne seraient donc pas directement liés aux phénomènes d'analgésie. En effet, dès l'apparition d'un stimulus nociceptif dans une région donnée, les neurones à convergence vont diriger cette information vers les centres et déclencher l'activation des CIDN. En inhibant l'activité de l'ensemble des neurones spinaux non directement concernés par la stimulation, les CIDN améliorent le rapport signal nociceptif sur bruit de fond résiduel. La détection par les centres supérieurs est alors améliorée. L'observation clinique corrobore cette hypothèse, puisque lorsque surgit une douleur violente, cette sensation devient prioritaire sur l'ensemble des autres informations sensorielles. Parmi les neuromodulateurs jouant un rôle dans les CIDN, un certain nombre de travaux chez l'animal ont permis de mettre en évidence l'implication du système opioïdergique (Le Bars et al. 1981) et sérotoninergique (Chitour et al. 1982). En effet, le blocage des récepteurs opioïdergiques par la naloxone (Julien et al. 2005), ou des récepteurs sérotoninergiques par la cinancérine ou la métergoline, entraîne une réduction significative des CIDN, chez le rat anesthésié.

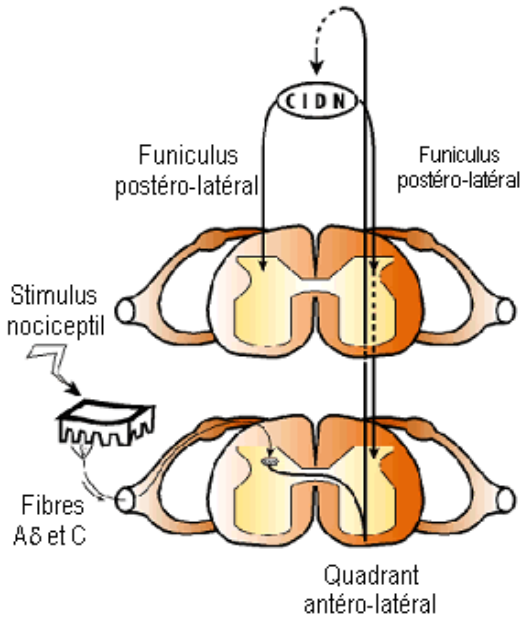


Figure 10 : Schéma de la boucle anatomique des contrôles inhibiteurs diffus induits par stimulation nociceptives (CIDN) (Guirimand and Le Bars 1996).

CHAPITRE 2 : Les douleurs chroniques neuropathiques

1. Les douleurs chroniques neuropathiques

Les douleurs neuropathiques correspondent à des douleurs associées à une lésion ou un dysfonctionnement du système nerveux. Elles surviennent dans des contextes cliniques très variés et peuvent être secondaires à des lésions nerveuses périphériques ou centrales. On considère aujourd'hui qu'elles concernent près de 8% des patients présentant un accident vasculaire, au moins 20% de ceux présentant une sclérose en plaques, environ 50% de ceux présentant une lésion médullaire traumatique et plus de 60% des amputés présentant des douleurs du membre fantôme.

1.1. Epidémiologie des douleurs neuropathiques

Une étude récente a été menée en France afin d'estimer la prévalence des douleurs chroniques avec ou sans caractéristiques neuropathiques à l'échelle nationale. Selon la STONEP (*Study of the Prevalence of Neuropathic Pain*), la prévalence de la douleur chronique serait de 20% (Bouhassira et al. 2008). Les douleurs neuropathiques touchent quant à elles 6,9% de la population générale dont 5,1% semblent être des douleurs d'intensité modérée à sévère. Ces douleurs neuropathiques sont davantage associées avec des professions manuelles, et une population habitant des zones rurales. L'étude montre également qu'elles sont plus fréquentes chez la femme (60%), et qu'il existe un pic entre 50 et 64 ans. Elles sont plus fréquemment localisées dans les membres inférieurs. Notons aussi que l'intensité et la durée sont plus importantes que celles des douleurs chroniques sans caractéristiques neuropathiques (Bouhassira et al. 2008; Dieleman et al. 2008). Lors d'une lésion d'un nerf relativement petit, tel que le nerf ilio-inguinal lors d'une hernie, le risque de douleur persistante (plus de deux ans) est de l'ordre de 5% (Kalliomaki et al. 2008), tandis que la section d'un nerf plus large, tels que le nerf sciatique ou les nerfs intercostaux durant une thoracotomie, produit des douleurs neuropathiques soutenues chez 30 à 60% des patients (Maguire et al. 2006; Ketz 2008).

1.2. Etiologies des douleurs neuropathiques

1.2.1. Atteinte des nerfs périphériques

Les douleurs neuropathiques peuvent survenir après des lésions secondaires au diabète, au sida, aux cancers, suite à des lésions traumatiques : sections nerveuses, douleurs post-

chirurgicales (après des opérations pour hernies discales le plus souvent), suite à un zona ou à une amputation (la douleur est alors située au niveau du moignon ou dans le "membre fantôme", on parle d'algohallucinose) et enfin faisant suite à certaines chimiothérapies.

1.2.2. Atteintes du système nerveux central

Ces douleurs peuvent être consécutives à un accident vasculaire cérébral (AVC), ou à une poussée de sclérose en plaques entraînant des lésions au niveau de zones intervenant dans la transmission et le contrôle de la douleur.

1.2.3. Autre classement étiologique

Considérant que les douleurs neuropathiques sont liées à une lésion ou à un dysfonctionnement du système nerveux, on peut proposer un classement étiologique de ces douleurs :

♦ *Les polyneuropathies* : Elles correspondent à une atteinte diffuse et symétrique. On y retrouve le diabète (Rosenberg et al. 1997) et la neuropathie associée au SIDA (Katz 2000).

♦ *Les mononeuropathies* : Elles sont dites simples lorsqu'un seul tronc nerveux est intéressé, et multiples lorsque plusieurs troncs, plexus, racines nerveuses sont atteints mais de façon asymétrique. Le zona (Cluff et al. 1998), la névralgie sciatique, le traumatisme nerveux (Schon et al. 2001; Anand et al. 2002), la brûlure (Latarjet 2002), les pathologies cancéreuses (Klepstad et al. 2001), l'amputation (Ketz 2008) en sont des exemples.

1.3. Sémiologie des douleurs neuropathiques

Les douleurs neuropathiques se caractérisent par leur grande richesse d'expression sur le plan sémiologique. Les patients peuvent se plaindre de **douleurs spontanées continues** (brûlures, sensations de froid douloureuses…), ou **paroxystiques** (décharges électriques, coup de couteau…), souvent associées à des stimulations mécaniques (frottement, pression légère) ou thermiques (surtout froides) de faible intensité, particulièrement invalidantes, appelées **« allodynie »** (douleur évoquée par des stimulations normalement non douloureuses) ou **« hyperalgésie »** (augmentation de la douleur évoquée par des stimulations normalement faiblement douloureuses).

Ces symptômes particuliers différencient les douleurs neuropathiques des autres douleurs (Bennett et al. 2006). De plus, la douleur neuropathique est souvent aggravée par l'activité, la fatigue ou la tension nerveuse. Le patient peut aussi ressentir des **paresthésies**

(fourmillements, désagréables ou non), ou prurit (démangeaisons), des impressions diverses (sensations d'insectes rampant sur la peau…). Les conséquences psychologiques sont importantes : anxiété, irritabilité, isolement social, voire syndrome dépressif. Ces douleurs peuvent être amplifiées ou atténuées par l'humeur du patient : un syndrome dépressif accentuera la douleur neuropathique, un moment de détente pourra la calmer. L'effet de la musicothérapie a d'ailleurs été étudié notamment dans le cas de douleurs cancéreuses (Igawa-Silva et al. 2007).

1.4. Examen du patient douloureux et évaluation de la douleur

L'examen du patient douloureux est essentiel pour préciser les caractéristiques sémiologiques de la douleur. L'évaluation de la douleur constitue une partie de cet examen. Quel que soit le site de la douleur, l'examen doit préciser au moins huit items :

- le profil évolutif : ancienneté de la douleur (depuis plus de 3 à 6 mois), circonstances d'apparition (accident du travail, effort, repas,…)
- la topographie : siège de la douleur maximale, irradiations
- le type de douleur (décharges électriques, brûlures,…)
- l'intensité de la douleur
- les facteurs de soulagement et d'aggravation
- les manifestations associées
- le bien-être psychologique
- le statut fonctionnel

L'importance capitale est donc d'évaluer la personne qui souffre et non pas uniquement sa douleur (*« assess the person, not just the pain »*) (Turk 2003) rejoignant ainsi ce concept mis en avant il y a plusieurs années déjà par Melzack et Wall (Melzack and Wall 1965) et voulant que la douleur soit une expérience multidimensionnelle complexe qui comporte des composantes multiples (sensorielle, affective, cognitive) et qui a des impacts négatifs sur divers aspects de l'individu.

Les échelles et questionnaires d'évaluation

D'abord une question : peut-on mesurer la douleur ? À l'évidence, l'appréciation de la douleur est subjective, celle-ci étant propre au malade qui l'éprouve. Pourtant, même si la douleur n'est pas chiffrable de façon absolue, il est possible d'évaluer le vécu douloureux. Cette évaluation

est même souhaitable, car elle permet d'orienter le traitement analgésique et d'en apprécier l'efficacité.

Pour tenter d'objectiver la sensation douloureuse, les équipes soignantes disposent de plusieurs échelles et questionnaires d'évaluation. Ceux-ci font appel à une auto-évaluation de la douleur par le malade lui-même, qui reste évidemment le mieux placé dans cette appréciation. Il existe ainsi diverses échelles verbales, où l'on demande au patient de choisir le qualificatif qui lui semble le mieux correspondre à l'intensité de sa douleur. Sur d'autres échelles, numériques, le malade chiffre sa douleur. Les échelles les plus sensibles et les plus fiables sont les "réglettes douleur" : ce sont des échelles visuelles analogiques, où le malade indique, le long d'une droite qui figure l'intensité de sa douleur, la position qui correspond le mieux à ce qu'il ressent.

D'autres moyens d'évaluation sont disponibles, comme les échelles comportementales et surtout les questionnaires descriptifs, qui invitent le patient à donner une description qualitative très précise de sa douleur (Bennett et al. 2006). Le questionnaire actuel le plus élaboré, d'origine canadienne, comporte 82 qualificatifs (sa version française en compte 61) qui définissent les nuances de perception cognitive, sensorielle et affective de la douleur ; le patient coche les adjectifs qui décrivent le mieux sa douleur et les cote en intensité. En France, le questionnaire recommandé pour la pratique clinique est l'outil d'aide au diagnostic DN4 (« Douleur Neuropathique en 4 questions ») conçu et validé par un groupe d'experts français (Bouhassira et al. 2005). Ce questionnaire, qui comporte un total de dix questions, s'appuie exclusivement sur l'interrogatoire des patients et sur un examen succinct de la sensibilité. Les sept premières questions visent à préciser les caractéristiques de la douleur. Les trois autres questions reposent sur un examen clinique visant à rechercher une hypoesthésie au tact ou à la piqûre et/ou une douleur déclenchée par le frottement (allodynie). Un score de 1 est attribué à chaque item positif et le score DN4 total correspond à la somme des réponses aux dix items. Cet outil permet d'établir le diagnostic de douleur neuropathique avec une spécificité de près de 90 % pour un score de 4/10, considéré comme la valeur seuil **(Tableau 02).**

QUESTIONNAIRE DN4 : un outil simple pour rechercher les douleurs neuropathiques

Pour estimer la probabilité d'une douleur neuropathique, le patient doit répondre à chaque item des 4 questions ci dessous par « oui » ou « non ».

QUESTION 1 : la douleur présente-t-elle une ou plusieurs des caractéristiques suivantes ?

	Oui	Non
1. Brûlure	☐	☐
2. Sensation de froid douloureux	☐	☐
3. Décharges électriques	☐	☐

QUESTION 2 : la douleur est-elle associée dans la même région à un ou plusieurs des symptômes suivants ?

	Oui	Non
4. Fourmillements	☐	☐
5. Picotements	☐	☐
6. Engourdissements	☐	☐
7. Démangeaisons	☐	☐

QUESTION 3 : la douleur est-elle localisée dans un territoire où l'examen met en évidence :

	Oui	Non
8. Hypoesthésie au tact	☐	☐
9. Hypoesthésie à la piqûre	☐	☐

QUESTION 4 : la douleur est-elle provoquée ou augmentée par :

	Oui	Non
10. Le frottement	☐	☐

OUI = 1 point **NON = 0 point** **Score du Patient : /10**

MODE D'EMPLOI

Lorsque le praticien suspecte une douleur neuropathique, le questionnaire DN4 est utile comme outil de diagnostic.

Ce questionnaire se répartit en 4 questions représentant 10 items à cocher :

- ✓ Le praticien interroge lui-même le patient et remplit le questionnaire
- ✓ A chaque item, il doit apporter une réponse « oui » ou « non »
- ✓ A la fin du questionnaire, le praticien comptabilise les réponses, 1 pour chaque « oui » et 0 pour chaque « non ».
- ✓ La somme obtenue donne le Score du Patient, noté sur 10.

Si le score du patient est égal ou supérieur à 4/10, le test est positif
(sensibilité à 82,9 % ; spécificité à 89,9 %)

D'après Bouhassira D *et al. Pain* 2004 ; 108 (3) : 248-57.

Tableau 02 : Questionnaire DN4 pour évaluer les douleurs neuropahiques

1.5. Les traitements

Les douleurs neuropathiques, une fois installées, répondent habituellement mal aux antalgiques. Les antidépresseurs tricycliques et les antiépileptiques (gabapentine, prégabaline) constituent les traitements de référence de ces douleurs (Finnerup et al. 2005; Attal et al. 2006; Mico et al. 2006; Dworkin et al. 2007) **(Tableau 03).** Plusieurs d'entre eux ont

désormais une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans cette indication. Cependant, chez les sujets répondeurs, on assiste à une diminution des douleurs plutôt qu'à une disparition.

1.5.1. Traitements médicamenteux

- **Les antidépresseurs :**

Même si tous les patients souffrant de douleur chronique ne présentent pas des signes de dépression, la coexistence de ces deux états est fréquente. Bien que l'incidence d'un désordre dépressif majeur au cours de la vie dans la population générale avoisine les 20%, chez les patients souffrant de douleur chronique ce taux varie entre 50 et 80% (Reisner 2003; Attal et al. 2006; Mico et al. 2006; Matsuzawa-Yanagida et al. 2008). D'autre part, l'anxiété et la dépression influencent négativement la sensation douloureuse. De nombreuses études indiquent que la dépression diminue la tolérance à la douleur (Willoughby et al. 2002) et qu'elle est associée non seulement à une autoévaluation plus accentuée de la douleur (Sullivan 1998) mais également à un moindre succès de la thérapeutique (Ericsson et al. 2002). Ces données mettent l'accent sur la nécessité d'utiliser des traitements antidépresseurs chez les patients déprimés, atteints de douleurs chroniques. De plus, leur mécanisme d'action permet également d'expliquer leur intérêt dans ce type de douleurs, même en l'absence d'un état dépressif.

- Les tricycliques : amitriptyline (LAROXYL®), clomipramine (ANAFRANIL®), imipramine (TOFRANIL®), doxépine (QUITAXON®)

L'efficacité des antidépresseurs tricycliques est confirmée de longue date dans le traitement de douleurs neuropathiques (Sindrup 1991). Ils agissent en bloquant la recapture pré-synaptique des monoamines (effets prépondérants sur la sérotonine et la noradrénaline) permettant ainsi de renforcer les contrôles inhibiteurs descendants. Il convient de noter que leur effet antalgique est indépendant de leur effet antidépresseur (Mico et al. 2006). L'effet antalgique des antidépresseurs tricycliques survient au tiers ou à la moitié de la posologie nécessaire pour traiter les troubles de l'humeur. De plus, le soulagement apparaît plus rapidement que l'effet antidépresseur qui n'apparaît qu'après deux à trois semaines de traitement (Sumpton et al. 2001; Reisner 2003). Au-delà des mécanismes monoaminergiques, d'autres modes d'action peuvent expliquer les propriétés analgésiques des tricycliques. Ils ont des effets antihistaminiques et anticholinergiques, sont capables également de bloquer les canaux sodiques et calciques, les récepteurs α-adrenergiques et NMDA et, finalement, ont une faible affinité pour les récepteurs Mu (Sindrup et al. 2005). Malgré ces différences

pharmacologiques, le soulagement obtenu par les antidépresseurs tricycliques est relativement comparable entre eux. Globalement, 60-70% des patients voient une amélioration de leur douleur neuropathique avec les antidépresseurs tricycliques et un patient sur deux ou sur trois a plus de 50% de soulagement (Sindrup 1991; McQuay et al. 1996). Les principaux effets indésirables des antidépresseurs tricycliques sont: sécheresse buccale, constipation, mydriase, tachycardie, troubles de la miction, hypotension orthostatique, somnolence, myoclonie. De plus, ils sont contre-indiqués chez les patients avec des antécédents d'affection cardio-vasculaire, de glaucome ou de rétention urinaire.

- Inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, IRSNa : duloxétine (CYMBALTA®)

Contrairement aux antidépresseurs tricycliques, les antidépresseurs inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine, dont la fluoxétine (PROZAC®) est le célèbre chef de file, n'ont que peu d'effets sur les douleurs neuropathiques, ce qui démontre bien la dissociation entre les propriétés antalgiques et antidépressives.

En revanche, les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline sont une classe thérapeutique plus récente d'antidépresseurs présentant une certaine efficacité sur les douleurs neuropathiques, bien qu'elle soit probablement inférieure à celle des antidépresseurs tricycliques. Cependant, contrairement à ces derniers, ils ont l'avantage d'être sélectifs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, ce qui limite leurs effets secondaires tels que les effets anticholinergiques (sécheresse buccale, mydriase, troubles de la miction…). De plus, ils présentent une meilleure sécurité d'emploi que les tricycliques avec des risques cardio-vasculaires négligeables. L'efficacité de la duloxétine a été confirmée dans la polyneuropathie douloureuse du diabète avec des effets bénéfiques sur le sommeil et la qualité de vie. Les effets indésirables essentiels sont les nausées, une somnolence ou une insomnie. La duloxétine est contre-indiquée en cas d'hépatopathie ou de néphropathie sévère, et d'hypertension artérielle mal contrôlée.

- **<u>Les antiépileptiques :</u>**

Il s'agit de la deuxième classe thérapeutique majeure. Leur spectre d'action n'est nullement cantonné à l'épilepsie, puisque ces traitements agissent aussi sur les troubles bipolaires, les troubles anxieux, et la douleur. Trois catégories d'antiépileptiques sont à distinguer en fonction de leurs mécanismes d'action:

- Les médicaments agissant sur les canaux calciques : gabapentine (NEURONTIN®), prégabaline (LYRICA®)

Les antiépileptiques sont des régulateurs négatifs de l'excitabilité neuronale. L'efficacité des antiépileptiques qui agissent préférentiellement sur la sous-unité α2δ des canaux calciques de type N est bien documentée dans les douleurs neuropathiques d'étiologies variées, périphériques ou centrales (Dworkin et al. 2007; Hendrich et al. 2008), avec des effets positifs sur l'anxiété, le sommeil et la qualité de vie. La gabapentine, en se liant à cette sous-unité α2δ, bloque l'entrée de Ca^{2+} de manière voltage-dépendante (Hendrich et al. 2008) et semble aussi efficace et plutôt mieux tolérée que les tricycliques sur la base de petites études comparatives. La prégabaline est un analogue de la gabapentine. Des investigations humaines et animales rapportent des résultats intéressants quant à ses propriétés analgésiques (Selak 2001). Tout comme la gabapentine, la prégabaline jouit d'une grande biodisponibilité, ne se lie pas aux protéines plasmatiques, n'a pas de métabolisme hépatique et est éliminée par les reins. Son affinité pour la sous-unité α2δ des canaux calciques est cinq à sept fois plus importante que la gabapentine. La nature des effets indésirables est similaire pour ces deux molécules (somnolence, impression vertigineuse, parfois oedèmes périphériques et prise de poids). Ces antiépileptiques ont l'avantage d'une bonne sécurité d'emploi, d'une absence d'interaction médicamenteuse, ce qui les rend très maniables y compris chez le sujet âgé. Ils sont contre-indiqués en cas d'insuffisance rénale sévère. En outre, le risque de prise de poids doit conduire à une certaine vigilance, notamment chez le diabétique ou chez le blessé médullaire.

- Les bloqueurs des canaux sodiques : carbamazépine (TEGRETOL®), lamotrigine (LAMICTAL®)

Ces médicaments agissent surtout au niveau des canaux sodiques voltage-dépendants et permettent de diminuer l'excitabilité anormale des fibres nerveuses, notamment au niveau périphérique. Leur chef de file est la carbamazépine, déjà anciennement utilisée, mais qui présente de très nombreux effets secondaires. D'autres antiépileptiques, comme la lamotrigine sont prometteurs et ont fait l'objet d'études dans les douleurs secondaires à des lésions médullaires, avec une certaine efficacité, mais la lamotrigine, qui n'a pas d'indication officielle en analgésie, présente un risque de survenue d'effets indésirables cutanés allergiques, rares, mais potentiellement graves. De ce fait, il ne faut pas l'utiliser en première intention.

- Les médicaments agissant sur la transmission inhibitrice GABAergique : gabapentine (NEURONTIN®), valproate (DEPAKINE®), tiagabine (GABITRIL®)

L'acide γ-aminobutyrique (GABA) est le neurotransmetteur inhibiteur le plus abondant dans le système nerveux central et de nombreuses évidences soutiennent un rôle des interneurones GABAergiques dans le contrôle de la nociception. Le GABA est synthétisé à partir du glutamate par l'action d'une décarboxylase et le neurotransmetteur nouvellement synthétisé est conservé dans des vésicules jusqu'à sa libération lors de la dépolarisation. La libération de GABA peut également se produire à partir d'un pool non vésiculaire et l'on pense que la gabapentine augmente ce type de libération. Après sa libération, le GABA est repris de l'espace synaptique par des transporteurs membranaires (GAT) localisés sur les neurones GABAergiques et les cellules gliales. Le transporteur neuronal est une cible pour la tiagabine, un anticonvulsivant qui potentialise les actions du GABA en prolongeant la durée de vie du neurotransmetteur dans l'espace synaptique. Notons aussi que quelques antidépresseurs tricycliques aux propriétés analgésiques (par exemple, l'amitriptyline) ont aussi comme cibles les transporteurs de GABA, bloquant non seulement sa recapture au niveau neuronal, mais aussi au niveau de la glie. Dans les neurones, le GABA est repris et restocké dans des vésicules alors que, dans les cellules gliales, il est métabolisé par la GABA-transaminase. Il a été montré que le valproate augmente la quantité de GABA dans le cerveau par un effet combiné : en empêchant son métabolisme glial par la GABA-transaminase, et en augmentant sa synthèse neuronale à partir du glutamate.

- **<u>Les opiacés :</u> tramadol (TOPALGIC ®, CONTRAMAL®) et opiacés forts:**

Le tramadol, opioïdes de niveau II, est une molécule aux propriétés agonistes opiacés Mu et inhibitrices de la recapture des monoamines. Son efficacité a été démontrée essentiellement sur les douleurs des polyneuropathies du diabète. Il présente de nombreux effets indésirables (somnolence, sécheresse de la bouche, constipation, dysurie) même si les formes retard sont mieux tolérées. Si le risque de dépendance est rare chez les patients douloureux, il existe un risque accru de crises convulsives chez les patients à risque ou recevant des produits abaissant le seuil épileptogène, tels que les tricycliques. Il est donc recommandé d'éviter d'associer le tramadol avec des traitements agissant sur la recapture de la sérotonine comme les antidépresseurs sérotoninergiques, du fait d'un risque potentiel de syndrome sérotoninergique. L'utilisation des opiacés forts dans la douleur neuropathique non cancéreuse doit respecter un certain nombre de recommandations. Si presque tous les patients développent un sevrage lors de l'interruption brutale (dépendance physique), le risque de dépendance psychique (addiction) est beaucoup plus rare. Les phénomènes de tolérance (nécessité d'augmenter les doses pour obtenir la même efficacité) sont faibles mais possibles après utilisation prolongée.

Dans ces cas, il peut être proposé de changer d'opiacé. Les effets indésirables les plus fréquents (somnolence, nausées, constipation) rendent compte d'un nombre élevé d'arrêts thérapeutiques précoces et expliquent en grande partie les abandons tardifs, qui concernent plus des ¾ des patients après plus d'un an de traitement. De plus, il existe un risque accru de troubles de l'immunité lors d'une utilisation très prolongée de la morphine. Pour l'ensemble de ces raisons, la prescription de ces traitements ne doit intervenir qu'en cas d'échec des traitements de première et seconde intention.

- **Traitements locaux**

L'efficacité de la lidocaïne topique, utilisée à l'hôpital sous forme de patchs, a été confirmée dans la douleur post-zostérienne. Assez bien tolérée, elle est intéressante chez la personne âgée. La capsaïcine est un agoniste des récepteurs TRPV1 qui limite la sensibilisation du système nerveux périphérique lorsqu'elle est appliquée par voie cutanée. Elle semble être efficace dans la douleur post-zostérienne.

- **Cannabis**

Les cannabinoïdes font actuellement l'objet d'un développement avancé pour le traitement des douleurs neuropathiques, notamment associées à la sclérose en plaques. Un spray (SATIVEX®) est commercialisé au Canada pour ce type de douleurs. Cependant, il n'est pas disponible en France.

- **Les blocs périphériques**

Les blocs sont des injections de produit anesthésiant au voisinage des terminaisons nerveuses, afin d'obtenir l'anesthésie d'une zone plus vaste. On limite ainsi les décharges ectopiques entretenant la sensibilisation.

Traitements	Niveau de preuve d'efficacité	AMM en analgésie chez l'adulte
Antidépresseurs tricycliques		
Amitriptyline	Preuve scientifique d'efficacité dans plusieurs étiologies	AMM douleur neuropathique périphérique de l'adulte
Imipramine	Preuve scientifique d'efficacité dans plusieurs étiologies	AMM douleur neuropathique
Clomipramine	Preuve scientifique d'efficacité dans plusieurs étiologies	AMM douleur neuropathique
Antidépresseurs ISRNA		
Duloxétine	Preuve scientifique d'efficacité dans la polyneuropathie diabétique	AMM douleur neuropathique diabétique périphérique chez l'adulte
Antiépileptiques		
Gabapentine	Preuve scientifique d'efficacité dans plusieurs étiologies	AMM douleur neuropathique périphérique de l'adulte
Prégabaline	Preuve scientifique d'efficacité dans plusieurs étiologies	AMM douleur neuropathique périphérique et centrale de l'adulte
Opiacés		
Tramadol	Preuve scientifique d'efficacité dans la polyneuropathie diabétique	AMM douleur modérée à intense
Sulfate de morphine	Preuve scientifique d'efficacité dans plusieurs étiologies	AMM douleurs persistantes intenses ou rebelles aux autres antalgiques, en particulier douleur d'origine cancéreuse
Oxycodone	Preuve scientifique d'efficacité dans plusieurs étiologies	AMM douleur chronique d'origine cancéreuse intenses ou rebelles aux antalgiques de niveau plus faible
Lidocaine topique	Preuve scientifique d'efficacité dans les mononeuropathies associées à une allodynie, notamment douleur post-zostérienne	AMM douleur neuropathique post-zostérienne

Tableau 03 : Principaux traitements pharmacologiques des douleurs neuropathiques en France : niveau de preuve et de recommandations, AMM en analgésie.

1.5.2. Traitements non médicamenteux

La neurostimulation

Pour certaines douleurs chroniques rebelles, qu'elles soient d'origine nociceptive, neuropathique ou psychogène, il arrive parfois qu'on ait recours à d'autres thérapeutiques comme la neurostimulation, la neurochirurgie ou certaines techniques anesthésiques. La neurostimulation (Cruccu et al. 2007) repose sur un principe simple : en stimulant les fibres

tactiles Aβ de gros calibre, on amplifie, au niveau de la moelle épinière, l'inhibition du message douloureux transmis par les fibres nociceptives Aδ et C de petit calibre au niveau du relais dans la corne dorsale de la moelle (théorie du portillon). Cette méthode sert surtout à traiter les douleurs liées à des lésions de nerfs superficiels : amputation, zona, sciatique lombaire ou névralgie cervico-brachiale. Exceptionnellement, elle peut être pratiquée au niveau de la moelle épinière, voire de certaines structures cérébrales.

Sections chirurgicales

La neurochirurgie destructive n'a quasiment plus aucune place dans le traitement des douleurs neuropathiques, à l'exception des techniques de DREZotomie *(Dorsal Root Entry Zone)* qui consistent en une destruction sélective des corps cellulaires des neurones nociceptifs périphériques.

Autres

Les techniques psychothérapeutiques (hypnose, relaxation, thérapies cognitives et comportementales), de même que la kinésithérapie peuvent apprendre au patient à se détendre et à mieux tolérer les douleurs. Les massages et les techniques d'électrothérapie exercent un effet de type « théorie du portillon » et un effet anti-inflammatoire. L'acupuncture provoquerait la libération des opiacés endogènes par un mécanisme de contrôle inhibiteur diffus induit par une stimulation nociceptive (CIDN).

De manière générale, l'utilisation de multiples traitements pour une même pathologie, signe la faible efficacité de chacun d'eux. L'exposé des différentes options thérapeutiques ci-dessus en est l'illustration. Ceci est dû à la complexité des systèmes mis en jeu lors du développement de la sensation douloureuse. De nouvelles approches restent donc encore à développer ou à optimiser pour pouvoir lutter contre ces douleurs persistantes. La mise au point de modèles animaux est un préalable indispensable au développement de telles approches.

2. Les modèles animaux de douleurs neuropathiques

Les tests comportementaux de nociception n'étant pas toujours représentatifs des conditions observées chez l'humain et les animaux, divers modèles animaux ont été mis au point afin de mimer les problèmes rencontrés en clinique. Contrairement aux tests de douleur aigüe, plusieurs modèles animaux de douleur provoquent un inconfort soutenu qui peut durer plusieurs heures, voire plusieurs jours. Cela pose un problème éthique car l'animal ne peut

pas se soustraire au stimulus douloureux. Malgré l'inconfort infligé aux animaux, certains modèles se sont révélés être d'une grande utilité et ont permis de mieux comprendre la physiopathologie de la douleur. Certains ont été développés chez les primates, les chiens, et d'autres grands mammifères mais ce sont les rongeurs, surtout les rats, qui sont les animaux les plus utilisés dans les études sur la douleur. La souris est aussi une espèce très étudiée et le sera sans doute de plus en plus, car une des approches expérimentales les plus courantes en recherche sur la douleur est l'utilisation des modèles de souris génétiquement modifiées **(Figure 11)** (Mogil 2009).

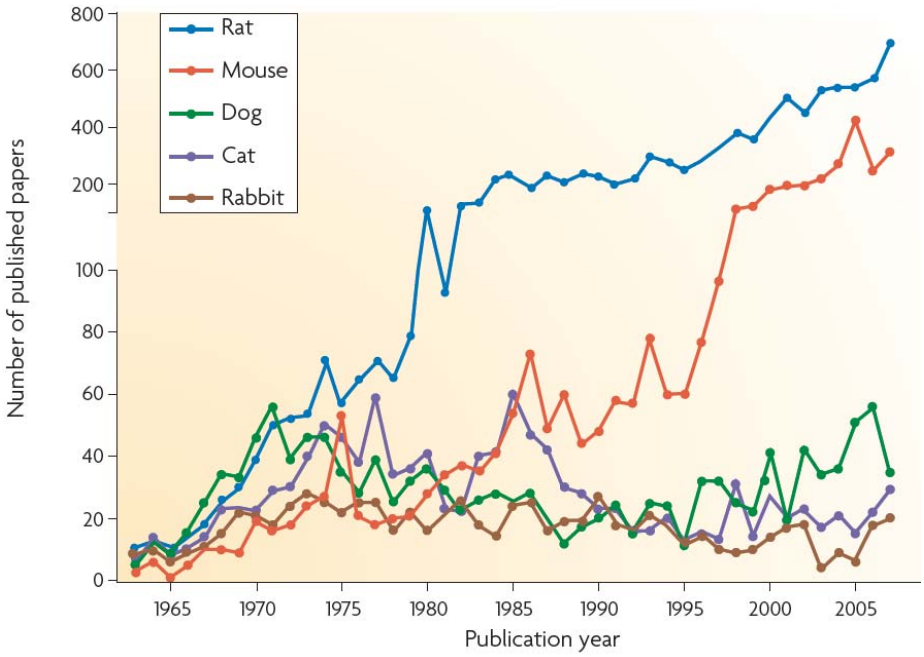


Figure 11: Espèces sélectionnées pour les expériences sur la douleur de 1963 à 2007 (Mogil 2009). Le graphe montre le nombre total d'articles apparus dans PubMed pour chaque espèce par année de publication, en identifiant les termes "douleur" et "espèce" (rat, souris, chien, chat et lapin). La recherche s'est terminée le 29 Octobre 2008. Les 5 espèces montrées ont le nombre total d'articles le plus élevé durant cette période sur les expérimentations animales concernant la douleur. D'autres espèces ou classes ont un nombre total non négligeable de papiers: cochon d'Inde (307), vache (258), cochon (177), mouton (128), oiseau (97), hamster (97), grenouille (85) et reptile (42).

Depuis plusieurs années, l'équipe de chercheurs du laboratoire travaille sur le rat. C'est un animal dont la taille est adaptée à la réalisation de préparations expérimentales nécessitant des interventions chirurgicales. Dans cette espèce, l'étude comportementale de la douleur est bien codifiée. Il existe une correspondance de développement du système nerveux, entre le rat et l'humain permettant, dans une certaine mesure, de les comparer à un âge donné (Narsinghani et al. 2000). De plus, si l'on travaille avec des mammifères, notamment des rongeurs, c'est que l'on considère que les mécanismes de la douleur, les récepteurs nociceptifs, les circuits nerveux impliqués et les comportements exprimés, sont homologues entre l'animal et l'homme

(Blackburn-Munro 2004; Lindsay et al. 2005). Par ailleurs, il existe une certaine congruence entre les données expérimentales chez l'animal et les données cliniques pour quelques composés comme les antidépresseurs, les antiépileptiques et les anti-NMDAs (Bouhassira 2007). De plus, la co-morbidité bien établie entre les troubles anxio-dépressifs et les douleurs chroniques (Delgado 2004) chez le patient se retrouve également dans des modèles animaux de douleurs neuropathiques (Blackburn-Munro 2004).

2.1 Les différents modèles animaux de douleurs neuropathiques

Plusieurs modèles ont été mis au point afin de reproduire les diverses situations cliniques. Chacun doit aussi être standardisé, reproductible et provoquer un comportement douloureux qui puisse être quantifié. Enfin, il devra être acceptable au niveau éthique comme nous le verrons par la suite.

Concernant les douleurs inflammatoires, les problèmes associés étant très variés et très répandus, une pléthore de modèles animaux a été développée. La plupart consistent en l'injection intraplantaire, intradermique ou sous-cutanée de substances irritantes pour l'animal telles que l'adjuvant complet de Freund, la carraghénine, la capsaïcine, ou le formol. Des modèles de douleurs viscérales de différentes origines ont été développés tels que la dilatation d'organes creux, l'injection de substance irritantes dans la cavité abdominale ou dans les viscères, l'ischémie, l'inflammation et la stimulation électrique de certains organes.

Concernant les douleurs cancéreuses, un modèle consiste à injecter des cellules de sarcome à proximité du nerf sciatique de l'animal. Au fur et à mesure que la tumeur se développe, elle comprime le nerf ; on observe alors le développement d'hyperalgésie thermique et mécanique qui s'intensifie progressivement (Shimoyama et al. 2002). Un modèle de douleur cancéreuse d'origine osseuse consiste lui à injecter chez le rat des cellules de carcinome mammaire (MRMT-1) au niveau du tibia. Dans ce modèle, une hyperalgésie et une allodynie mécanique se développent (Medhurst et al. 2002).

Dans cette étude, nous nous intéressons aux douleurs neuropathiques et plusieurs modèles impliquant des lésions des nerfs périphériques ou centraux ont été développés afin d'élucider les mécanismes responsables du développement de ces douleurs et de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Le premier modèle mis en œuvre consistait à réaliser une axotomie totale du nerf sciatique (Wall et al. 1979). Bien que toujours utilisée, cette transection a été

progressivement supplantée par des modèles de ligature, qui rendent possible l'évaluation du comportement locomoteur. Les trois modèles ci-dessous ont été comparés (Kim et al. 1997). Ils ont un décours temporel de la douleur similaire mais l'abaissement du seuil de sensibilité apparaît maximal dans le modèle de Kim et Chung.

A - Constriction chronique du nerf sciatique

On parle aussi de modèle CCI pour « Chronic Constriction Injury » (Bennett et al. 1988). C'est une ligature lâche (ou écrasement) du nerf sciatique à mi-cuisse avec du catgut (fil à base de boyau de chat) **(Figure 12A)**. Le modèle nécessite quatre ligatures espacées de 1 mm chacune, à la base du développement de la neuropathie. De plus, l'inflammation en réponse à la résorption du catgut crée la destruction de la plupart des fibres A et de quelques fibres C. Ce modèle comprend une composante inflammatoire qui nous incite à lui préférer des modèles où l'atteinte nerveuse est purement physique.

B - Ligature partielle du nerf sciatique

On le nomme PSL (ou PNL) pour « Partial Sciatic or Nerve Ligation » (Seltzer et al. 1990). Ce modèle consiste en une ligature serrée de 33 à 50% du nerf sciatique à mi-cuisse, juste après l'émergence des nerfs du biceps dorsal et du semi-tendineux **(Figure 12B).** Une variante de cette atteinte partielle du nerf par ligature est la section partielle de ce même nerf sciatique (PST pour « Partial Sciatic Transection), décrite dix ans plus tard (Lindenlaub et al. 2000).

C - Ligature des nerfs spinaux

C'est le modèle SNL pour « Spinal Nerve Ligation » (Kim et al. 1992). Ce modèle consiste en une ligature serrée des nerfs spinaux issus des racines L5 et L6 du nerf sciatique **(Figure 12C).** En épargnant la racine L4, on conserve une sensibilité qui permet de tester le comportement douloureux. Ce modèle induit, en fréquence et en valeur absolue, des comportements douloureux neuropathiques plus reproductibles que les autres modèles. C'est par exemple le cas avec le test de von Frey pour mettre en évidence les phénomènes d'allodynie mécanique statique. Par contre, ce modèle ne permet pas de caractériser des états d'hyperalgie thermique reproductibles. Pour rendre les animaux neuropathiques, nous avons utilisé ce modèle de ligature des nerfs spinaux et le test de von Frey pour en évaluer les seuils.

Tous ces modèles entraînent des modifications d'excitabilité au niveau de la moelle épinière qui apparaissent très tôt après l'intervention. Pour les modèles suivants, CCI, PNL et SNL, le comportement douloureux apparaît après 1 jour et l'allodynie après 3 jours. Ils entraînent un

état douloureux neuropathique stable pendant environ un mois. Pour ce qui est des variantes de chacun de ces modèles, il semble que la seule différence entre une ligature et un écrasement nerveux soit la durée d'évolution des signes sensitifs anormaux, plus prolongée en cas de ligature (Lancelotta et al. 2003).

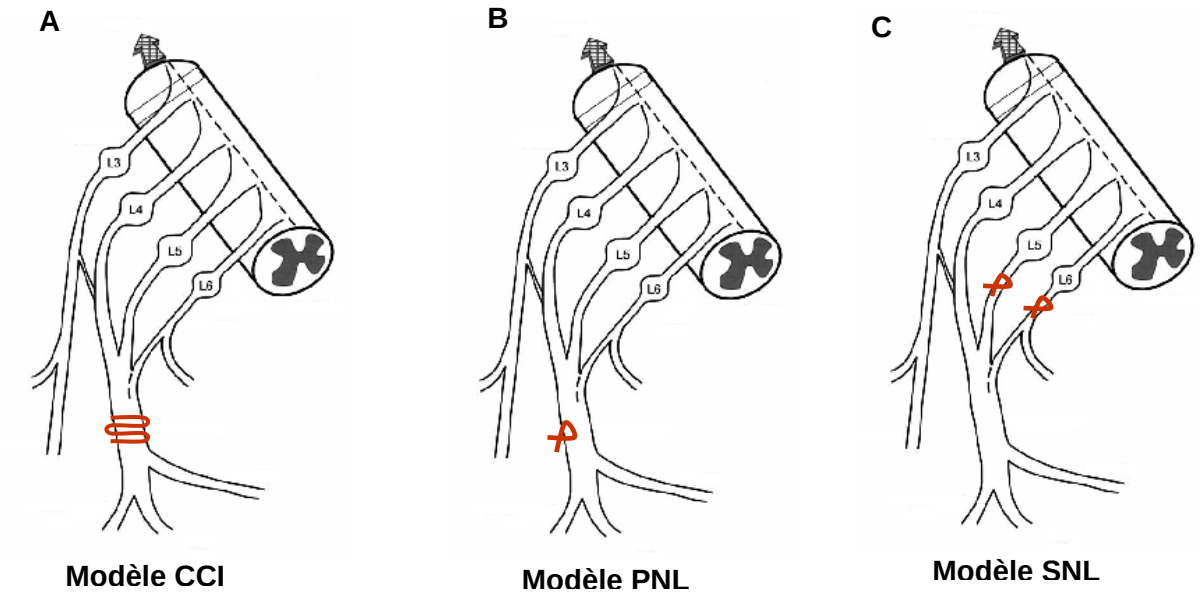


Figure 12 : Modèles animaux de douleurs neuropathiques. (A) Constriction chronique du nerf ou CCI : ligature lâche du nerf sciatique. (B) Ligature partielle du nerf ou PNL : ligature serrée de 33 à 50% du nerf sciatique. (C) Ligature des nerfs spinaux ou SNL : ligature serrée des nerfs spinaux issus des racines L5 et L6 du nerf sciatique.

D - Autres modèles

D'autres modèles, récemment développés, permettent de décrire et de comparer les effets de la lésion des différentes branches terminales du nerf sciatique (Decosterd et al. 2000; Lee et al. 2000). Notamment, le modèle de « Spared nerve injury, SNI» (Decosterd and Woolf 2000) consiste en une lésion des nerfs tibial et péronéal commun, laissant intact le nerf sural. Cette approche permet de tester le comportement douloureux au niveau de territoires non lésés de la patte, adjacents aux zones lésées. Des modèles d'ischémie ont également été mis au point en provoquant une thrombose par réaction photochimique après activation par un laser d'un composé photosensible (Xu et al. 1992; Kupers et al. 1998). Certains modèles cherchent enfin à mimer plus spécifiquement les conséquences d'une pathologie identifiée. L'injection de streptozotocine (toxine bactérienne) induit ainsi un diabète et ses manifestations neuropathiques (Malcangio et al. 1998). Un modèle d'herpès Zoster reproduit également les neuralgies postherpétiques observées chez l'homme (Fleetwood-Walker et al. 1999).

2.2. Les difficultés d'appréhender la douleur chez l'animal

Reste une interrogation importante : quelle est la réelle perception de l'animal dans ces modèles de douleur (Bridges et al. 2001)? En effet, la composante émotionnelle de la douleur est difficile à explorer chez l'animal. Ainsi, selon l'IASP : *« La douleur est une expérience sensorielle aversive causée par une atteinte réelle ou potentielle qui provoque des réactions motrices et végétatives protectrices, conduit à l'apprentissage d'un comportement d'évitement et peut modifier le comportement spécifique de l'espèce, y compris le comportement social ».* Dans ces modèles, on ne s'attache donc pas à la notion de sensation mais à celle de réaction. L'évaluation de la douleur ne se fait que de façon indirecte par observation des signes cliniques et des comportements de l'animal. Les changements de comportement de l'animal ont pour but d'éviter ou de réduire la lésion, en diminuant la probabilité de son apparition et en promouvant la guérison.

- *Signes physiologiques* : dilatation des pupilles, changement de la pression artérielle, de la fréquence cardiaque, de la température corporelle, augmentation de la fréquence respiratoire, pilo-érection, augmentation de la diurèse et des défécations ....
- *Signes comportementaux associés à la douleur et à la souffrance* : animal sur ses gardes, protection de la région douloureuse, agressivité, vocalisations, mutilation, agitation, prostration, déambulation, position anormale (tête repliée vers l'abdomen), élévation de la patte…(Djouhri et al. 2006).
- *En cas de douleur chronique* : ces signes s'accompagnent d'une diminution de l'appétit et donc d'une perte de poids, d'une diminution du toilettage, de l'activité locomotrice et d'exploration, d'une perte du sommeil, d'une modification du poids supporté par les pattes ou incapacitance (Mogil et al. 2004), d'une diminution du comportement sexuel et des interactions sociales (Soma 1987; Carstens et al. 2000).

En plus de l'observation des réponses comportementales spontanées et des paramètres physiologiques, différents tests ont été mis au point pour mesurer la réponse de l'animal lors de stimulations nociceptives mécaniques ou thermiques. Les paramètres mesurés peuvent être le seuil d'apparition d'une réponse, ou bien l'intensité ou la rapidité de la réponse chez l'animal présentant par exemple une douleur neuropathique. Dans l'étude sur les douleurs neuropathiques présentée ici, nous avons évalué les seuils de douleur par un test de réflexe de retrait de la patte, dérivé du test de von Frey **(Figure 13A).** Ce réflexe polysynaptique fait intervenir plusieurs interneurones interposés entre le neurone afférent et le neurone efférent (motoneurone α innervant les muscles fléchisseurs du membre). Le test de von Frey permet de mesurer une allodynie mécanique statique. Dans une cage munie d'une grille, on exerce

une pression au niveau de la zone plantaire de la patte de l'animal avec une pointe en plastique reliée à un dynamomètre. Cela représente une alternative à l'utilisation des soies de von Frey pour mesurer le réflexe de retrait de la patte (Kalmar et al. 2003; Lever et al. 2003). Le retrait de la patte indique le seuil de pression qui n'est plus supporté par l'animal lorsqu'il est en appui quadripodal.

Cependant, d'autres tests comportementaux existent tels que le cold/hot plate, le plantar test, ou test de la plaque chauffante, **(Figure 13B)** qui vise à évaluer l'hyperalgie primaire thermique à la chaleur, provoquée par le modèle douloureux (Montagne-Clavel et al. 1996). Le rotarod (bâton maintenu horizontalement et qui tourne autour de son axe longitudinal) est quant à lui utilisé pour évaluer la coordination motrice de l'animal. L'open field est un test qui permet de mesurer les déplacements de l'animal par un système de suivi par infrarouge. En plus des informations sur l'activité locomotrice, ce test permet de prédire une activité de type anxiolytique.

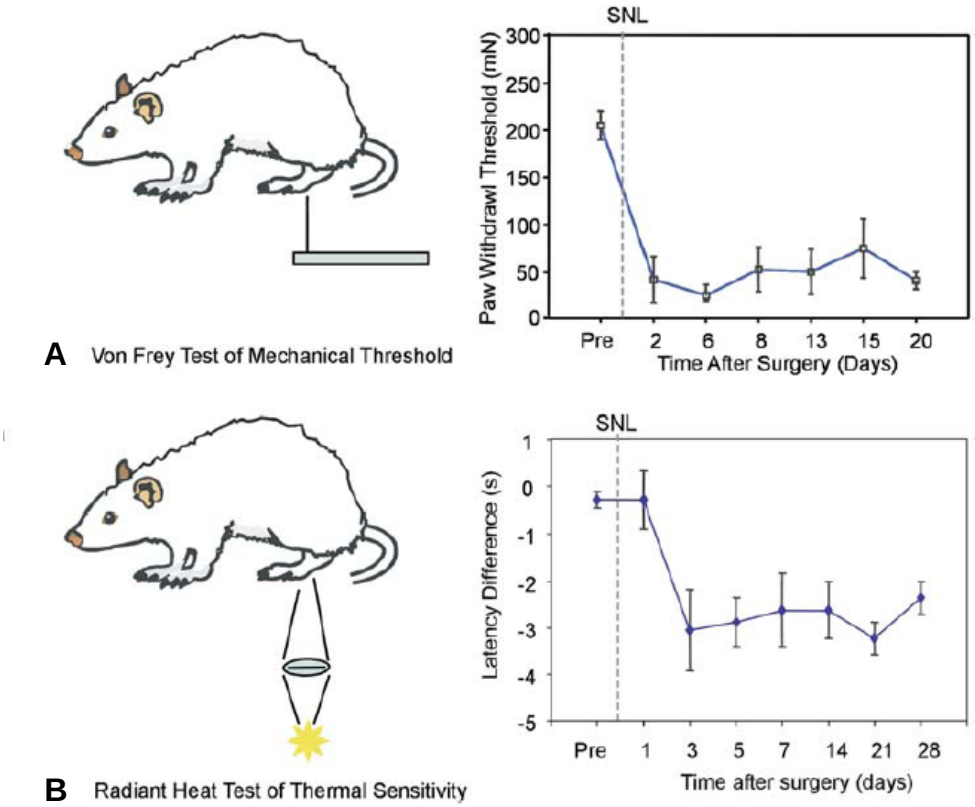


Figure 13: (A) Pour tester l'hyperalgésie mécanique, des soies de Von Frey de différentes forces sont appliqués sur la surface plantaire de l'animal. Le seuil de retrait de la patte diminue drastiquement après lésion nerveuse (adapté de Li et al., 2000). **(B)** Afin de tester l'hyperalgie à la chaleur, une source chaude est appliquée sur la surface plantaire de l'animal, et la latence du retrait de la patte de l'animal est mesurée (adapté de Kim and Chung, 1992).

Par ailleurs, même pour un modèle particulier dont la chirurgie est pratiquée par le même expérimentateur et dans des conditions identiques, il faut être conscient que différents facteurs peuvent affecter le développement de la douleur neuropathique. Ces facteurs peuvent être internes, relatifs à l'animal lui-même (espèce, souche, fournisseur, sexe, âge), et/ou externes. Les facteurs externes les plus déterminants sont les rythmes circadiens, l'influence des saisons, l'humidité de l'air, le régime alimentaire, les variables sociales, les conditions d'hébergement et la manipulation des animaux, la densité de la cage, l'activité sexuelle, les facteurs de stress, l'influence de l'ordre des tests et bien-sûr, l'expérimentateur lui-même (Vissers et al. 2003; Mogil 2009). L'ensemble de ces paramètres est à prendre en compte lors de l'expérimentation car ils peuvent naturellement influencer les résultats obtenus **(Figure 14).**

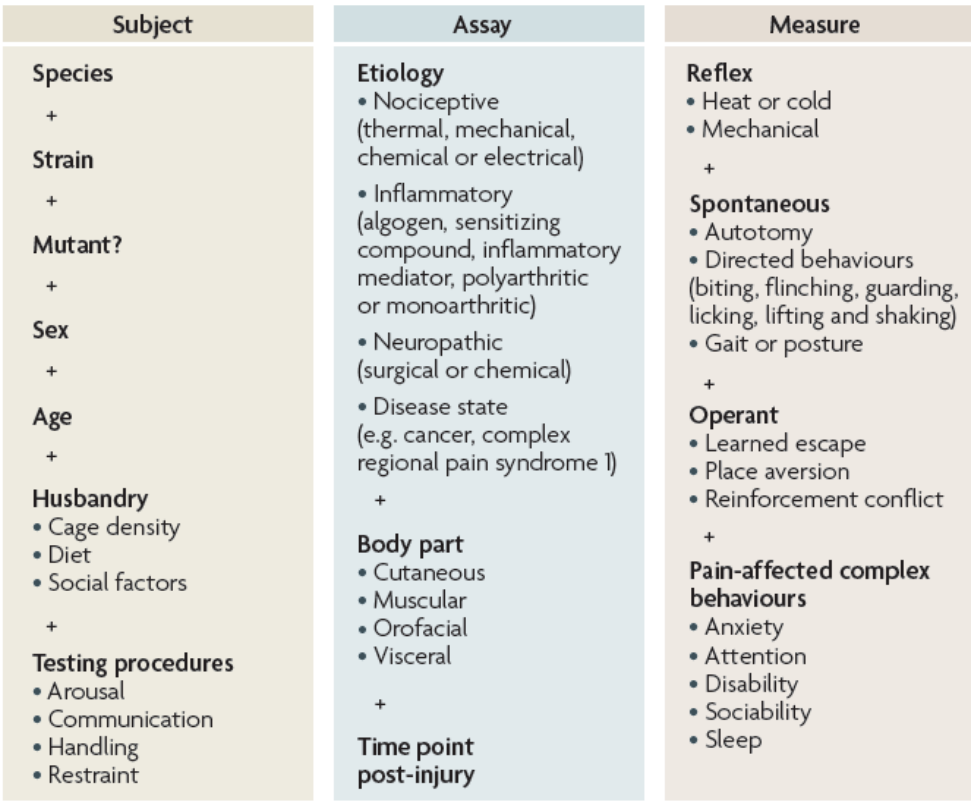


Figure 14 : Facteurs pouvant influencer les résultats de l'expérimentation (Mogil 2009).

2.3. Les recommandations éthiques

"A-t-on le droit de faire des expériences et des vivisections sur les animaux ? Quant à moi, je pense qu'on a ce droit d'une manière entière et absolue. Il serait bien étrange, en effet, qu'on reconnût que l'homme a le droit de se servir des animaux pour tous les usages de la vie, pour ses services domestiques, pour son alimentation, et qu'on lui défendît de s'en servir pour s'instruire dans une des sciences les plus utiles à l'humanité."

Ce point de vue très tranché, voire provocateur, de Claude Bernard dans son Introduction à l'étude de la médecine expérimentale (1865) soulève des questions qui restent ouvertes. En effet, les problèmes posés dans le domaine de l'expérimentation animale sont d'autant plus sensibles que les protocoles utilisés par les chercheurs mettent en jeu des situations où les animaux sont soumis à des stimulations dites nociceptives, c'est-à-dire, selon la définition, des « stimulations de haute intensité susceptibles de remettre en cause l'intégrité physique de l'organisme ». On réalise de telles stimulations pour reproduire expérimentalement la douleur telle qu'elle est décrite chez l'homme. Cela suppose que les animaux, notamment les mammifères utilisés dans la recherche, les rongeurs surtout, les singes rarement, « ressentent » la douleur, et c'est justement parce qu'on reconnaît à l'animal cette aptitude qu'il sert de modèle pour l'étude de la douleur.

Cependant, l'utilisation expérimentale de l'animal, notamment dans le domaine de la douleur, impose en retour le respect de principes qui confèrent à l'expérimentateur de grandes responsabilités : les conditions d'entretien des animaux doivent être définies et vérifiées par des scientifiques compétents (par exemple, des inspecteurs vétérinaires contrôlent les conditions de vie des animaux en laboratoire), et l'expérimentateur est responsable légalement de ses choix et de ses actes. En outre, le chercheur doit utiliser l'animal le mieux adapté à sa recherche, et uniquement celui provenant d'élevages spécialisés qui assurent les meilleures conditions d'hébergement et d'équilibre biologique. Il doit épargner à l'animal toute souffrance inutile et mettre en œuvre les méthodes permettant de limiter les douleurs quand ces dernières sont inévitables. Ces principes s'appliquent à la fois aux modèles animaux de douleur aiguë et de douleur chronique.

À ce titre, les chercheurs travaillant dans le domaine de la douleur, fédérés au sein de l'Association internationale pour l'étude de la douleur (IASP), ont créé des guides standards éthiques dès 1980, publiés dans la revue scientifique Pain **(Tableau 04).** Les protocoles de nos expérimentations ont été de surcroît approuvés par le comité d'éthique local (Bordeaux, AP 1/04/2005).

Les règles de bonne conduite
Les chercheurs travaillant dans le domaine de la douleur (de l'IASP) ont défini dès 1980 des guides standards éthiques pour l'utilisation de l'animal. Voici brièvement ce qu'ils affirment.
Les études utilisant des modèles animaux de douleur sont nécessaires si l'on veut progresser dans les connaissances, nouvelles et pertinentes d'un point de vue clinique, des mécanismes mis en jeu dans les syndromes douloureux chroniques; ces études n'ont de sens que si elles bénéficient à l'humanité.
Les méthodes utilisées dans ces expériences doivent provoquer chez l'animal des situations qui correspondent à la douleur chez l'homme.
Les expérimentateurs doivent s'efforcer d'atténuer le plus possible la douleur lors de ces expériences.
Ils doivent être conscients de la nécessité d'une réflexion éthique pour la justification de la pratique et de la poursuite de leurs expériences.
Ils doivent construire leur protocole expérimental pour que l'animal se trouve, lors de l'expérimentation, aussi proche que possible d'une situation physiologique stable, condition indispensable pour la validité des résultats de l'expérience.
Dans les modèles de stimulation nociceptive aiguë, l'expérimentateur doit tester sur lui-même l'intensité du stimulus et l'animal doit être susceptible d'en contrôler les effets, notamment avec la possibilité d'y échapper.
La durée des expériences doit être aussi courte que possible et le nombre d'animaux utilisés aussi faible que possible.
Autant que possible, les expérimentateurs doivent soumettre au préalable, pour avis, leur protocole de recherche à un Comité d'éthique pour la recherche expérimentale.

Tableau 04 : Les recommandations éthiques formulées par l'IASP pour l'expérimentation animale dans le domaine de la douleur.

3. Transmission du message nociceptif lors des douleurs neuropathiques

Le circuit décrit dans le chapitre I ne doit pas être vu comme une organisation statique de la corne dorsale. En réalité, le réseau de la corne dorsale s'avère être extrêmement plastique et son organisation fonctionnelle hautement dynamique. Cela est particulièrement évident en condition de sensibilisation centrale et périphérique à la douleur. Les mécanismes de cette hyperexcitabilité sont très divers (Moore et al. 2000; Woolf et al. 2000; Hunt et al. 2001; Navarro et al. 2007; Scholz et al. 2007; Sandkuhler 2009) et incluent des modifications fonctionnelles très complexes **(Figure 15).**

.

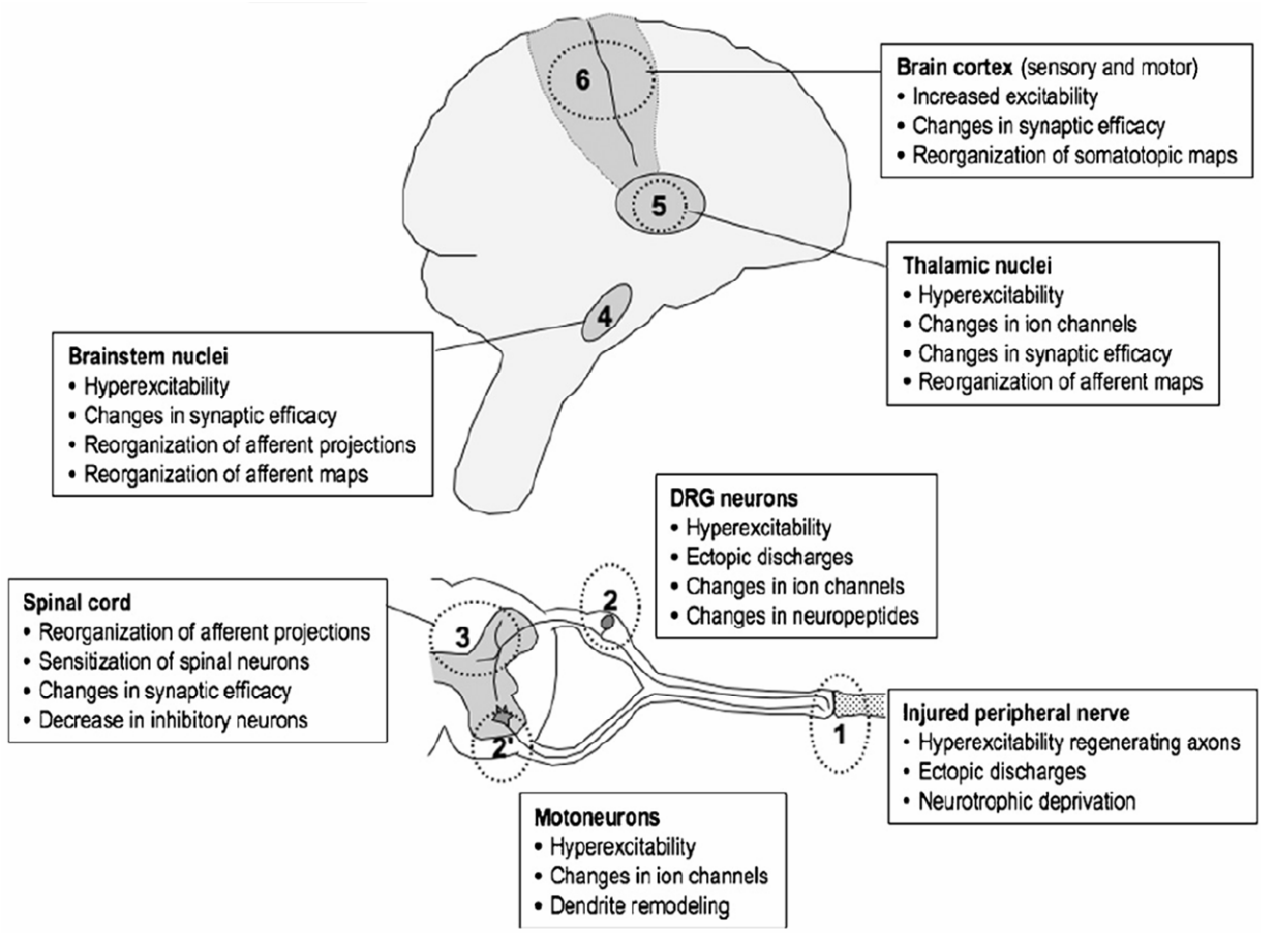


Figure 15 : Représentation schématique des principaux phénomènes qui se développent après lésion de nerf périphérique (Navarro et al. 2007).

3.1 Mécanismes à la périphérie

Décharges ectopiques :

Une importante caractéristique des douleurs neuropathiques est la douleur en l'absence d'un stimulus identifiable. Les douleurs spontanées sont le résultat de la génération de potentiels d'action ectopiques dans les voies nociceptives et ils ne proviennent pas des terminaisons périphériques en réponse à un stimulus. Après lésion d'un nerf périphérique, ces décharges ectopiques sont générées à différents endroits, incluant le névrome lui-même (site de la lésion nerveuse) mais d'autres études ont par la suite suggéré qu'elles pouvaient provenir des nocicepteurs (Bostock et al. 2005), des ganglions rachidiens (Amir et al. 2005), ou d'afférences voisines intactes (Wu et al. 2002). Après lésion de la moelle épinière, des douleurs spontanées peuvent résulter de l'augmentation de l'excitabilité intrinsèque des neurones spinaux (Balasubramanyan et al. 2006; Hains et al. 2007). La survenue de telles activités anormales serait due à une « instabilité électrique » de la membrane neuronale liée à

une dysrégulation de la synthèse et/ou du fonctionnement de canaux ioniques (Na^+, Ca^{++}, voir ci-dessous).

Altération de l'expression de canaux ioniques :

Une découverte importante sur la génération des décharges ectopiques a été de montrer qu'elles pouvaient être dues à des modifications de l'expression de certains canaux au niveau du corps cellulaire ou du site de la lésion nerveuse sur la fibre afférente. Ces modifications seraient à l'origine des variations d'excitabilité des membranes neuronales.

Les canaux sodiques voltage-dépendants contribuent largement à la génération des décharges ectopiques comme l'indiquent les effets inhibiteurs robustes des anesthésiques locaux, qui sont des bloqueurs non sélectifs des canaux sodium (Sheets et al. 2008). Les fibres sensorielles expriment plusieurs types de canaux sodiques, sensibles ou résistants à la tétrodotoxine (TTX) (Fukuoka et al. 2008). Cependant, lequel de ces canaux est responsable de la génération anormale de potentiels d'action n'est pas complètement clair. Des études utilisant des gènes knock-down avec des oligonucléotides antisens étayent un rôle spécifique pour le canal Nav1.3, qui est surexprimé dans les neurones DRG après lésion nerveuse (Hains et al. 2003), mais les knock-out de ces canaux n'altèrent pas le comportement douloureux ou l'activité ectopique (Nassar et al. 2006). Le mécanisme sous-jacent à ces changements d'expression de canaux sodiques lors de lésions nerveuses périphériques reste flou, mais le rôle des neurotrophines (NGF, BDNF) semble crucial dans cette expression. Malheureusement, en clinique, les inhibiteurs des canaux sodiques disponibles ne sont pas sélectifs des canaux sodiques nerveux. Ils agissent donc au niveau nerveux et cardiaque et induisent de nombreux effets secondaires.

Les canaux calciques voltage-dépendants sont aussi altérés lors de lésions nerveuses périphériques. Les souris avec une délétion du canal Cav2.2 (canal calcique de type N) montrent une diminution du comportement associé à la douleur neuropathique (Saegusa et al. 2001). L'injection intrathécale de ωconopeptide MVIIA, qui bloque Cav2.2, soulage les douleurs neuropathiques en diminuant le relargage des neurotransmetteurs (McGivern 2006). La sous-unité auxiliaire du canal calcique α2δ1 aide à stabiliser à la membrane le pore du canal formé par la sous-unité α. A la fois, le pore du canal Cav2.2 et la sous-unité auxiliaire α2δ1 sont surexprimés dans les neurones DRG après lésion d'un nerf (McGivern 2006), ce qui suggère que ce complexe canal calcique de type N joue un rôle prédominant dans la transmission du signal nociceptif.

D'autre part, le canal calcique Cav1.2 de type L est un élément essentiel dans la sensibilisation mécanique associée au modèle SNL, et ses effets passent par l'activation de gènes dans les neurones profonds de la corne dorsale (Fossat et al. soumis).

3.2 Modifications spinales

La sensibilisation centrale (Woolf and Salter 2000) à la douleur est caractérisée par une augmentation durable de l'information douloureuse entre les fibres afférentes primaires qui entrent dans la corne dorsale de la moelle épinière, et les neurones de projection. Les mécanismes de cette hyperexcitabilité sont divers et incluent des modifications fonctionnelles du circuit de la corne dorsale **(Figure 15).**

3.2.1. Modifications des propriétés intrinsèques des neurones

Les perturbations de la balance excitation/inhibition vont aussi influencer les caractéristiques intrinsèques de décharge des neurones. Le groupe de F.Nagy a ainsi montré qu'au niveau des couches profondes des cornes dorsales, les influences excitatrices et inhibitrices, respectivement par l'activation des récepteurs métabotropiques mGluR et $GABA_B$, faisaient passer les neurones d'un mode de décharges tonique à un mode de décharges en plateau et même à une activité en bouffées (Derjean et al. 2003). En effet, en présence d'un agoniste mGluR ou d'un antagoniste $GABA_B$, les neurones qui déchargent normalement selon un mode tonique vont décharger en plateau (post-décharge maintenue). Ces effets antagonistes de $GABA_B$ et de mGluR résultent en un équilibre dynamique des influences inhibitrices et excitatrices sur les neurones des cornes dorsales (Derjean et al. 2003). Ces contrôles glutamatergiques et GABAergiques antagonistes sur les neurones s'exercent sur au moins une cible commune : les canaux potassiques de type Kir 3. De plus, les récepteurs $GABA_B$ modifient directement l'influx de calcium à travers les canaux calciques de type L comme il a été démontré sur des corps cellulaires isolés de corne dorsale (Voisin et al. 2001). Ces canaux calciques de type L sont responsables de l'expression de propriétés de plateau, un mécanisme intrinsèque d'amplification des relations entrées/sorties qui affecte les neurones spinaux et pourrait jouer un rôle dans l'exagération de l'information relayée vers les centres supra-spinaux (Morisset et al. 1999).

Les auteurs ont aussi montré que ces trois modes de décharges peuvent correspondre à différents modes de transfert de l'information et pourraient définir des états fonctionnels différents. Comme une large proportion des neurones des couches profondes sont les WDR qui répondent à la fois à des stimuli nociceptifs et non nociceptifs, on peut associer ces trois

états fonctionnels à l'intégration des différentes modalités sensorielles et douloureuses. Ainsi, le mode tonique de décharges conviendrait à la médiation de la transmission non nociceptive et de la douleur aigüe, le mode plateau contribuerait à augmenter l'excitabilité des neurones spinaux lors de la sensibilisation centrale à la douleur, et les décharges en bouffées contribueraient aux processus nociceptifs associés aux douleurs persistantes.

3.2.2. Augmentation de la balance excitatrice

Mécanismes pré-synaptiques :

Les changements fonctionnels pré-synaptiques après lésion nerveuse périphérique qui augmente la plasticité synaptique, incluent des altérations dans la synthèse des neurotransmetteurs et neuromodulateurs (Obata et al. 2003) et dans la densité des canaux calciques (Li et al. 2004; Hendrich et al. 2008). La libération des neurotransmetteurs est provoquée par des canaux calciques voltage-dépendants présents sur les terminaisons des fibres afférentes. Une lésion nerveuse entraîne une surexpression de la sous-unité α2δ de ces canaux dans les ganglions rachidiens et la moelle épinière (Li et al. 2004). Cela semble associé avec une augmentation de l'entrée de calcium et une augmentation de la libération de glutamate (Nguyen et al. 2009). Les anticonvulsivants tels que la gabapentine et la prégabaline sont efficaces pour le traitement des douleurs neuropathiques vraisemblablement parce qu'ils se lient et bloquent cette sous-unité (Dworkin et al. 2007; Hendrich et al. 2008). Bien que ces drogues reversent l'hyperalgésie en conditions de douleurs neuropathiques, elles n'ont pas d'effet apparent dans la sensibilité normale à la douleur (Suzuki et al. 2005). Cela suggère un rôle spécial de la sous-unité α2δ dans les douleurs neuropathiques.

Mécanismes post-synaptiques :

Le glutamate est relargué par les fibres sensorielles en réponse à des stimuli à la fois nociceptifs et tactiles. L'activation rapide des récepteurs AMPA post-synaptiques est responsable de l'initiation de la réponse basale des neurones de la corne dorsale de la moelle. Cependant, une stimulation répétitive à basse fréquence (<5Hz) des fibres C nociceptives va entraîner une amplification et une prolongation de la réponse, phénomène appelé **wind-up** (Mendell et al. 1965). Cette activité augmentée résulte de l'activation des récepteurs NMDA. Sous des conditions physiologiques normales, ce récepteur est bloqué par des ions magnésium (Mg^{2+}). Une dépolarisation lente induite par la substance P et d'autres peptides tels que le CGRP entraîne une ouverture des canaux NMDA. Le récepteur NMDA est impliqué uniquement dans des modifications neuronales à long terme. De plus, les stimulations des afférences primaires vont pouvoir induire de façon concomitante des influx calciques dans les

neurones spinaux via le recrutement de canaux calciques de type L impliqués dans les potentiels de plateau (Morisset et al. 2000). L'entrée massive de calcium dans la cellule suite à l'activation de ces récepteurs (Yoshimura et al. 2006), va déclencher une cascade de mécanismes intracellulaires: synthèse de NO et de prostaglandines, activation de la CaMKI/II, activation de protéine kinase (PKC, PKA) et expression de proto-oncogènes (protéine C Fos). Ces peptides, substance P et CGRP, que l'on retrouve uniquement dans les fibres C avec le glutamate, créent une dépolarisation post-synaptique lente et de durée prolongée qui permet une sommation temporelle des influx nociceptifs (Thompson et al. 1990; Morisset and Nagy 2000; Kawasaki et al. 2004). La cellule devient hyperactivable, les canaux ioniques restent ouverts et la synapse est totalement perméable. On assiste donc à une hyperexcitabilité des neurones. L'activation des récepteurs NMDA joue ainsi un rôle clef dans l'hyperalgésie, phénomène rencontré dans des conditions neuropathiques et inflammatoires. Les changements post-synaptiques entraînent aussi une phosphorylation des sous-unités du récepteur NMDA (Ultenius et al. 2006) et une augmentation de la densité du récepteur à la membrane due au trafic mais aussi à l'augmentation de la synthèse des canaux ioniques et des protéines d'échafaudage (Iwata et al. 2007). La réalité comportementale de ce phénomène de wind-up s'illustre lorsque, à la présentation répétée de stimuli nociceptifs (chaleur ou stimulation mécanique), la sensation de douleur augmente à chaque présentation du stimulus alors que son intensité ne change pas.

Un autre mécanisme possible de la sensibilisation post-synaptique implique une augmentation du trafic des récepteurs AMPA à la surface cellulaire (Frischknecht et al. 2009). L'expression de ces récepteurs est augmentée dans la corne dorsale de la moelle épinière après lésion SNL (Harris et al. 1996). De plus, une surexpression des ARNm des récepteurs AMPA et NMDA a été montrée dans le diabète (Tomiyama et al. 2005).

Les drogues qui atténuent la sensibilisation centrale en agissant sur les sous-unités du canal calcique pour diminuer le relargage des neurotransmetteurs et sur les récepteurs NMDA pour diminuer l'action des neurotransmetteurs (Jorum et al. 2003; Chizh et al. 2007) sont des options de traitement efficaces des douleurs neuropathiques (Dworkin et al. 2007).

3.2.3. Diminution de la balance inhibitrice

Les interneurones inhibiteurs de la corne dorsale établissent des contacts synaptiques avec les terminaisons de neurones sensoriels primaires et modulent pré-synaptiquement les inputs afférents. Ils régulent aussi l'activité de la transmission post-synaptique. Une perturbation des

mécanismes inhibiteurs est un phénomène courant dans de nombreux états de douleurs chroniques, notamment ceux résultant d'une inflammation (Harvey et al. 2004), d'une lésion d'un nerf (Moore et al. 2002; Coull et al. 2003; Scholz et al. 2005), et d'une lésion de la moelle épinière (Drew et al. 2004). Les neurones inhibiteurs GABAergiques représentent 30 à 40% de la population totale des neurones dans les laminas I-III et la glycine coexiste dans une sous-population de ces neurones (Todd et al. 1990).

Des études *in vivo* ont montré que des injections intrathécales d'antagonistes des récepteurs $GABA_A$ ou de la glycine entraînent des comportements douloureux en réponse au toucher (allodynie) (Yaksh 1989; Sivilotti et al. 1994). Dans le même sens, une désinhibition *in vitro* augmente fortement l'activation des fibres à bas seuil Aβ dans la couche II (Baba et al. 2003; Schoffnegger et al. 2008). De plus, il a été montré que les neurones de projection de la lamina I sont activés par des fibres Aβ durant la désinhibition *in vitro* (Torsney et al. 2006) mais aussi *in vivo* (Keller et al. 2007).

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer ce phénomène de désinhibition :

✓ <u>Apoptose des interneurones inhibiteurs :</u>

En effet, la lésion d'un nerf périphérique induit une perte considérable de courants inhibiteurs, particulièrement ceux provenant de la stimulation des récepteurs au GABA. Une des causes de cette diminution peut être la mort par apoptose des interneurones GABAergiques de la corne dorsale de la moelle épinière après lésion de nerfs périphériques (Moore et al. 2002; Scholz et al. 2005). Cependant, ce mécanisme de désinhibition est source de débat. En effet, Polgar et collaborateurs ont montré aucune perte neuronale dans les couches I-III dans le modèle SNI (Spared Nerve Injury) (Polgar et al. 2005; Scholz et al. 2005).

✓ <u>Diminution de l'expression des récepteurs inhibiteurs :</u>

Un autre mécanisme serait une diminution de l'expression des récepteurs inhibiteurs (sur les terminaisons des afférences primaires et les neurones post-synaptiques) qui pourrait expliquer les phénomènes de sensibilisation suite à des lésions nerveuses. Notons par exemple, une diminution de la densité des récepteurs opioïdes Mu des couches I et II dans le modèle de neuropathie SNL (Kohno et al. 2005). Cependant, dans un modèle de neuropathie diabétique, la fonctionnalité, et non le nombre total des récepteurs opioïdes Mu, est atténuée dans la corne dorsale de la moelle épinière (Chen et al. 2002). De plus, Polgar et collaborateurs ont montré que l'allodynie tactile peut se produire sans perte sélective de GABA ou de récepteurs $GABA_A$ dans les couches I-II de la corne dorsale ipsilatérale de la moelle épinière dans le modèle SNI (Polgar et al. 2008).

✓ Blocage des récepteurs inhibiteurs :

Par ailleurs, en conditions de douleurs inflammatoires, le blocage de récepteurs inhibiteurs glycinergiques dans la corne dorsale superficielle peut se produire après une production spinale de prostaglandines E2 (PGE2) (Ahmadi et al. 2002). Ce blocage nécessite l'activation des récepteurs PGE2 post-synaptiques, et une phosphorylation dépendante de la PKA des récepteurs glycinergiques contenant la sous-unité α3 (Harvey et al. 2004). Ce phénomène de désinhibition est principalement restreint aux neurones excitateurs et est responsable de l'hyperalgésie inflammatoire (Reinold et al. 2005).

✓ Diminution des contacts entre afférences primaires et interneurones inhibiteurs :

Une autre explication possible serait que l'inhibition GABAergique réduite après lésion de la moelle est le résultat d'une diminution des contacts entre afférences primaires et neurones GABAergiques de la corne dorsale. Kohno et collaborateurs (Kohno et al. 2003) ont rapporté une diminution des courants post-synaptiques excitateurs monosynaptiques (EPSCs) médiés par les fibres Aδ et C sur des neurones non identifiés de la lamina II après SNI. Ces neurones sont susceptibles d'être des neurones GABAergiques qui constituent environ 30% de la population dans la couche II (Polgar et al. 2003). Ainsi, une diminution du transfert de l'information excitatrice provenant des fibres afférentes vers les neurones inhibiteurs GABAergiques pourrait contribuer à la désinhibition et aux symptômes de douleurs neuropathiques (Polgar and Todd 2008).

✓ Inputs inhibiteurs sur des interneurones inhibiteurs :

Un autre aspect important du circuit de la corne dorsale sont des inputs inhibiteurs sur des neurones inhibiteurs qui devraient entraîner une désinhibition nette et une hyperexcitabilité spinale. L'origine de ces inputs inhibiteurs sur les interneurones inhibiteurs de la lamina II peuvent être d'autres interneurones locaux (Yasaka et al. 2007; Choi et al. 2008; Labrakakis et al. 2009) et/ou des fibres descendantes provenant du cerveau (Kato et al. 2006). Finalement, les interneurones GABAergiques, intercalés entre les fibres afférentes primaires et les neurones de projections de la moelle (Daniele and MacDermott 2009) jouent un rôle duel dans le contrôle de l'excitabilité du réseau : les interneurones inhibiteurs de la lamina II peuvent agir, directement, pour réprimer les connections du relais polysynaptique excitateur (Torsney and MacDermott 2006) ou, indirectement, pour potentialiser ces connexions en inhibant les composants inhibiteurs de la corne dorsale. Il devient alors difficile de savoir comment les drogues peuvent discriminer entre ces distinctes synapses inhibitrices et de prédire le résultat d'un traitement en sortie. Dans la même idée, les endocannabinoides produits sous une forte stimulation nociceptive activent les récepteurs de type 1 (CB1)

localisés sur les interneurones inhibiteurs de la corne dorsale, ce qui entraîne une diminution du relargage synaptique de GABA et de glycine (Pernia-Andrade et al. 2009).

✓ Modification des contrôles inhibiteurs descendants :

Enfin, les neurones de la corne dorsale reçoivent de puissants contrôles inhibiteurs et facilitateurs descendants provenant des centres supraspinaux (Vanegas et al. 2004). Les neurotransmetteurs inhibiteurs incluent la noradrénaline, la sérotonine et les opioïdes endogènes. Après lésion nerveuse, ce système complexe de contrôles inhibiteurs est lui aussi modifié. L'inhibition tonique noradrénergique qui agit sur les α2-adrénorécepteurs semble être suspendue (Rahman et al. 2008), et les effets nets des voies descendantes sérotoninergiques changent de l'inhibition à la facilitation (Bee et al. 2008). Les antidépresseurs tricycliques empêchent la recapture de la noradrénaline et de la sérotonine, ce qui renforce les contrôles inhibiteurs descendants.

✓ Modification du gradient transmembranaire anionique :

La lésion d'un nerf induit aussi une diminution du co-transporteur potassium-chlorure KCC2. Cet effet trans-synaptique sur les cellules de la corne dorsale superficielle provoque un changement du potentiel d'équilibre des ions chlorures et le GABA induit une dépolarisation suffisante pour aboutir à une excitation au lieu d'une inhibition. De plus, un knock-down de l'expression de KCC2 entraîne une hyperalgésie (Coull et al. 2003). Il est toutefois important de noter le rôle crucial d'autres partenaires cellulaires dans la plasticité de la corne dorsale, notamment celui de la microglie (Scholz and Woolf 2007; Milligan et al. 2009). En effet, la microglie activée par l'ATP entraîne une libération de BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) qui est responsable de cette modification du gradient transmembranaire des ions chlorures dans les neurones nociceptifs de la lamina I (Coull et al. 2005). Il a notamment été montré une surexpression des récepteurs purinergiques P2X4 dans la microglie spinale après lésion nerveuse (Tsuda et al. 2003; Zhang et al. 2006). La stimulation de ces récepteurs P2X4 entraîne le relargage de BDNF et contribue ainsi à l'allodynie tactile (Tsuda et al. 2003; Tsuda et al. 2005; Ulmann et al. 2008). De plus, des données montrent que la fibronectine, protéine de la matrice extracellulaire, est surexprimée après lésion (Nasu-Tada et al. 2006) et est responsable de la surexpression des récepteurs P2X4 microgliales (Nasu-Tada et al. 2006; Tsuda et al. 2008; Tsuda et al. 2008).

3.3. Les conséquences d'une désinhibition spinale

3.3.1 Révélation de circuits dormants

Les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière constituent le principal relais de l'information nociceptive. Les phénomènes de désinhibition que nous avons vu précédemment peuvent activer des « circuits dormants », c'est à dire des voies normalement maintenues silencieuses via l'inhibition. *In vitro*, le blocage des inhibitions glycinergiques et GABAergiques révèle un circuit polysynaptique entre des fibres Aβ à bas seuil et les neurones de la lamina I NK1R négatifs. Les neurones NK1R positifs de la lamina I répondent normalement à des stimuli de haut seuil provenant des fibres Aδ/C (Torsney and MacDermott 2006). *In vivo*, un phénomène similaire est reporté avec les neurones nociceptifs spécifiques NK1R négatifs de la lamina I (Miraucourt et al. 2007). Shoffnegger et collaborateurs ont montré une propagation de l'excitation après stimulation des afférences Aβ non nociceptives de la lamina III vers les couches superficielles de la corne dorsale chez des animaux neuropathiques (modèle SNI) (Schoffnegger et al. 2008). Cette propagation de l'excitation est retrouvée lors d'une désinhibition (blocage des récepteurs $GABA_A$ et glycinergiques) chez des animaux contrôles (Schoffnegger et al. 2008). Cela suggère donc que des connexions synaptiques existent normalement entre les couches profondes et superficielles de la moelle, mais celles-ci sont activement inhibées chez des animaux sains. En revanche, chez les animaux neuropathiques, un phénomène de désinhibition révèle ce circuit et entraîne ainsi les phénomènes d'allodynie médiés par les fibres Aβ non nociceptives.

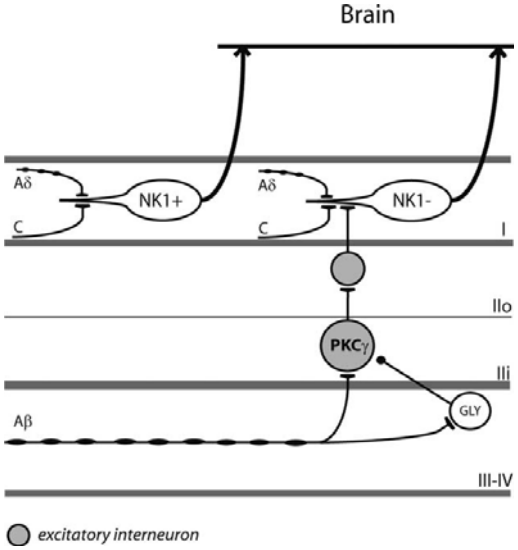


Figure 16: Digramme schématique illustrant le circuit de la corne dorsale de la moelle épinière impliqué dans l'allodynie mécanique dynamique. Les neurones PKC qui reçoivent des inputs inoffensifs via les fibres afférentes myélinisées font partie d'un circuit local excitateur qui provoque l'allodynie mécanique dynamique après une perte du contrôle inhibiteur glycinergique (Miraucourt et al. 2007). La localisation précise de ces interneurones glycinergiques (GLY) n'est pas encore connue. Bien que les cibles des interneurones PKC soient source de débats (Neumann et al. 2008), les neurones de sortie de la moelle épinière semblent être des neurones de la lamina I NK1 négatifs (Miraucourt et al. 2009).

De façon plus précise, ce circuit comprend des cellules exprimant PKCγ dans la lamina II, qui excitent d'autres interneurones excitateurs de la lamina II, qui à leur tour vont activer les neurones nociceptifs spécifiques de la lamina I (Miraucourt et al. 2009) **(Figure 16)**. La majorité des cellules PKCγ sont des interneurones excitateurs (Polgar et al. 1999), activés par des fibres afférentes myélinisées (Aβ) ou faiblement myélinisées (Aδ) qui transmettent l'information non douloureuse (Neumann et al. 2008). Les fibres tactiles Aβ myélinisées activent, en parallèle des interneurones PKCγ, des interneurones locaux glycinergiques, qui normalement inhibent les neurones PKCγ. Le blocage de cette inhibition glycinergique permet à un stimulus inoffensif d'atteindre les neurones de projection de la lamina I, et d'emprunter la voie de la douleur jusqu'au cerveau. Ce phénomène de désinhibition entraîne une allodynie mécanique dynamique (Miraucourt et al. 2009).
Toutefois, des interneurones GABAergiques localisés dans les couches superficielles de la moelle représentent aussi de bons candidats dans l'inhibition de ce circuit polysynaptique entre les neurones à bas seuil Aβ et les neurones de projection (Daniele and MacDermott 2009).

3.3.2 Action sur la transmission nociceptive

Dans la moelle épinière, le GABA (acide γ-aminobutyrique) agit comme le principal neurotransmetteur inhibiteur et est localisé dans les interneurones inhibiteurs (« islet cells », (Heinke et al. 2004)). Le GABA se fixe sur des récepteurs ionotropiques $GABA_A$ et métabotropiques $GABA_B$, localisés en pré et post-synaptique par rapport aux fibres afférentes. En ce qui concerne leurs cibles intracellulaires, les récepteurs $GABA_B$ bloquent l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants, facilitent l'ouverture des canaux potassiques rectifiants-entrants, et diminuent l'activité de l'adénylate cyclase. L'ensemble de ces effets conduit à une diminution de la transmission synaptique (Kangrga et al. 1991; Iyadomi et al. 2000), ou de l'expression des propriétés membranaires d'amplification du rapport entrées/sorties (Derjean et al. 2003).

L'activation des récepteurs $GABA_B$ a été impliquée dans l'inhibition pré-synaptique des fibres C afférentes de la moelle épinière (Cui et al. 1996; Cui et al. 1997; Ataka et al. 2000). Chez les souris transgéniques knock-out pour la sous-unité B1, le système nerveux périphérique présente non seulement des altérations de la gaine de myéline ou du nombre des neurones, mais aussi des modifications affectant l'activité même des neurones périphériques (Magnaghi et al. 2008). Ainsi, dans un modèle de neuropathie diabétique, la réduction du

nombre ou de l'efficacité des récepteurs $GABA_B$ pré-synaptiques provoque l'augmentation de la transmission glutamatergique des fibres sensorielles primaires aux neurones de la corne dorsale (Wang et al. 2007).

Si le récepteur $GABA_B$ joue un rôle prépondérant dans le compartiment pré-synaptique, en contrôlant la prolifération des neurones sensoriels, ou leur capacité à libérer le glutamate, des travaux récents, en particulier ceux du groupe de F.Nagy et collaborateurs, insistent également sur son action post-synaptique au niveau de la moelle épinière. D'une manière générale, les $GABA_B$ post-synaptiques activent les canaux potassiques rectifiants-entrants de type Kir, et induisent de ce fait une hyperpolarisation membranaire. De plus, ils induisent spécifiquement une inhibition à long terme des influx calciques dendritiques post-synaptiques (Perez-Garci et al. 2006). Comme nous l'avons vu précédemment, les récepteurs $GABA_B$ modulent les propriétés endogènes de membrane exprimées par les neurones spinaux et contribuent à la complexité de la transmission nociceptive et du relais de l'information des fibres afférentes vers ces neurones de projection (Derjean et al. 2003) **(Figure 17).**

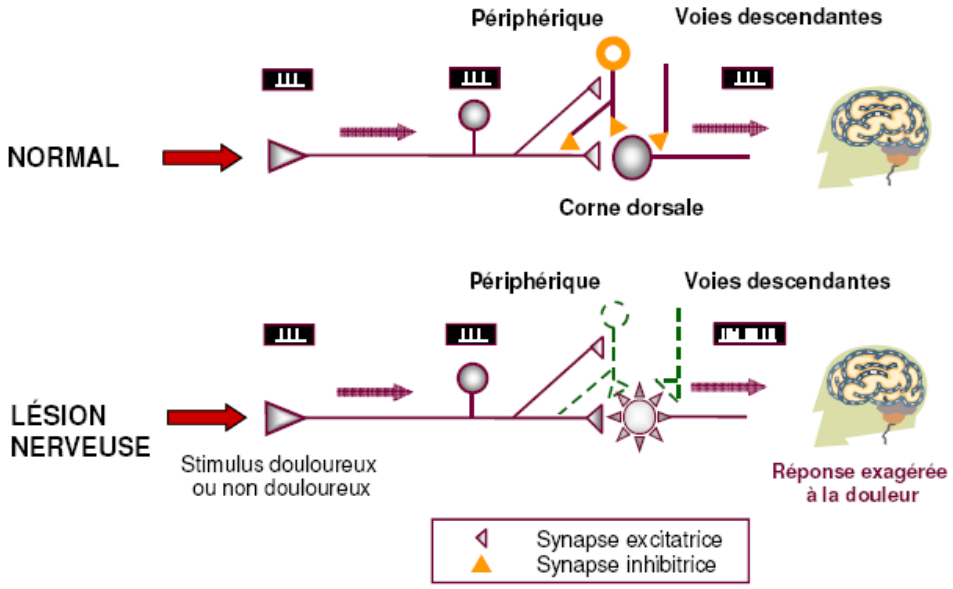


Figure 17 : Diminution de l'activité inhibitrice (Woolf et al. 1999).

Dans cette étude, nous avons envisagé la distribution des différents sous-types de récepteurs inhibiteurs $GABA_B$ dans les circuits nociceptifs spinaux et leur possible dysfonctionnement en conditions de douleurs pathologiques. Nous avons montré comment ce dysfonctionnement, en provoquant une désinhibition des voies nociceptives, pouvait participer aux mécanismes de sensibilisation douloureuse.

CHAPITRE 3 : Les récepteurs au GABA

1. Le GABA et ses récepteurs

Le GABA ou acide γ-amino butyrique est le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central où il est libéré par environ 40% des neurones. Il intervient dans de nombreux processus physiologiques comme la mémorisation, le sommeil ou l'addiction. Il apparaît également qu'un dysfonctionnement du système GABAergique est à l'origine de nombreux troubles du système nerveux (Bettler et al. 2004). Ainsi, une hyperactivité de ce système est associée à la schizophrénie alors qu'une hypoactivité peut provoquer des crises d'épilepsie, d'anxiété, des états dépressifs ainsi que des troubles du sommeil. De nombreuses données soutiennent un rôle des interneurones GABAergiques dans le contrôle de la nociception au niveau des voies afférentes primaires.

Le GABA participe au contrôle de l'excitabilité neuronale en activant les récepteurs ionotropiques, $GABA_A$ (Hevers et al. 1998) et $GABA_C$ (Johnston 1996) (inhibition synaptique rapide), et les récepteurs métabotropiques $GABA_B$ (Kerr et al. 1995) (inhibition synaptique prolongée).

En activant les récepteurs $GABA_A$, qui sont des canaux ioniques perméables aux ions chlorure, le GABA empêche la dépolarisation neuronale et contrôle ainsi la transmission du signal excitateur. Les benzodiazépines, classe médicamenteuse utilisée pour ses propriétés anxiolytique, hypnotique, et anti-épileptique, augmentent de façon allostérique l'activation du récepteur $GABA_A$ en se liant à des sites distincts du GABA. Ces modulateurs positifs agissent en augmentant l'affinité et la puissance du GABA et en facilitant l'ouverture du canal Cl^-.

Le GABA agit aussi sur des récepteurs $GABA_B$ couplés aux protéines G. C'est à ce dernier type de récepteur au GABA que nous nous sommes particulièrement intéressés lors de l'étude des douleurs neuropathiques.

2. Le récepteur $GABA_B$ métabotropique

2.1 Structure du récepteur $GABA_B$

Les récepteurs $GABA_B$ appartiennent à la classe C des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) **(Figures 18 et 19).** Celle-ci comprend également les mGluRs, les récepteurs sensibles au calcium, ainsi que plusieurs récepteurs aux phéromones et récepteurs orphelins (Brauner-Osborne et al. 2007). Les RCPGs de classe C possèdent trois particularités remarquables qui contribuent à leur régulation et à leurs fonctions **(Figure 19).** La première

caractéristique structurale de ces récepteurs (excepté les récepteurs aux phéromones) est la présence d'un large domaine extracellulaire bilobé qui fixe les ligands. Ce domaine bilobé joue un rôle important en spécifiant les caractéristiques pharmacologiques de ces récepteurs (Pin et al. 2004; Pin et al. 2004). Ce domaine extracellulaire est associé à un domaine transmembranaire composé de sept hélices, commun à tous les RCPGs et responsable du couplage aux protéines G.

Une deuxième caractéristique est l'existence de modulateurs allostériques qui représentent une nouvelle classe de ligand des RCPGs de classe C, identifiée à la fin des années 90. Ces modulateurs peuvent être positifs ou négatifs, selon qu'ils favorisent ou inhibent l'activité des RCPGs induite par les agonistes. Au contraire des composés orthostériques qui se fixent sur le site de liaison des ligands naturels, les modulateurs allostériques ciblent les domaines transmembranaires, stabilisant ou inhibant leur conformation active (Goudet et al. 2004). Ces modulateurs sont dépourvus d'activité propre et ne peuvent réguler un système que lorsqu'il est activé. En conséquence, ils devraient présenter des effets secondaires réduits et devraient conduire à une moindre désensibilisation que les agonistes.

La dernière caractéristique des RCPGs de classe C est leur structure dimérique (Kniazeff et al. 2004; Goudet et al. 2005; Hlavackova et al. 2005). Les mGluRs sont des homodimères stabilisés par un pont disulfure dans les domaines extracellulaires. Malgré leur nature homodimérique, ils fonctionnent cependant de manière asymétrique, c'est à dire que les deux sous-unités du dimère assurent des fonctions différentes (Kniazeff et al. 2004; Goudet et al. 2005; Hlavackova et al. 2005).

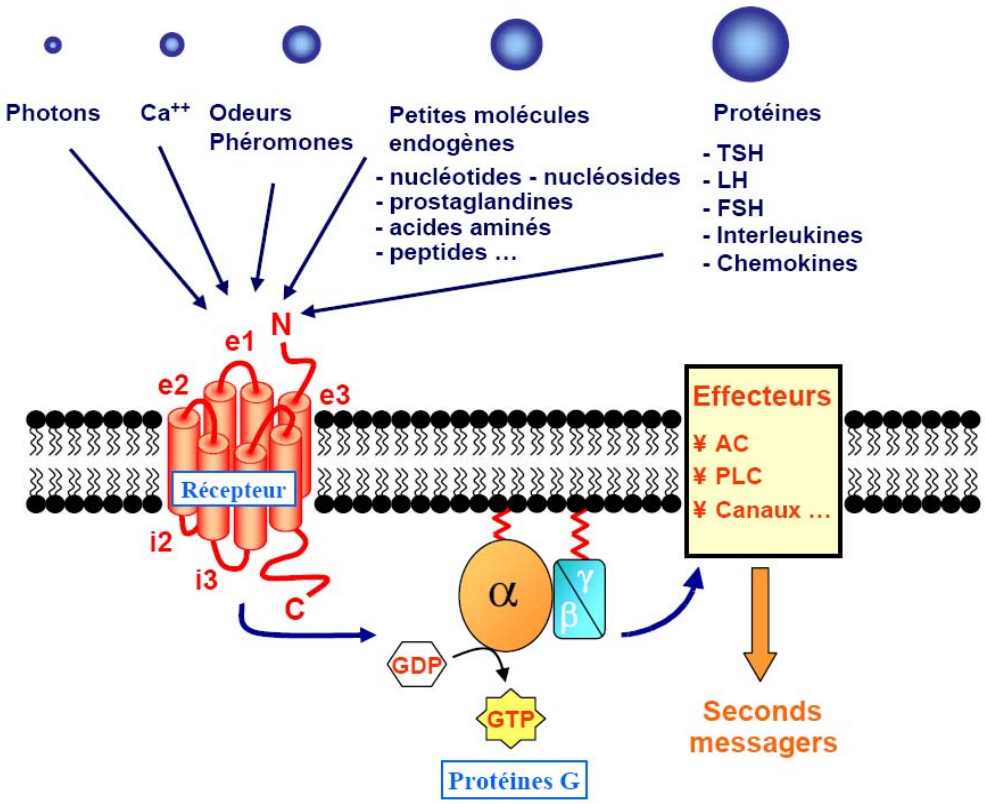


Figure 18: Structure des RCPGs. Ce sont des récepteurs membranaires constitués de 7 hélices transmembranaires (TM) connectées par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires. La liaison de molécules messages sur la face extracellulaire du récepteur permet l'activation au niveau intracellulaire de protéines G (échange GDP/GTP). Les protéines G, une fois activées, agissent à leur tour sur différents effecteurs responsables d'effets intracellulaires.

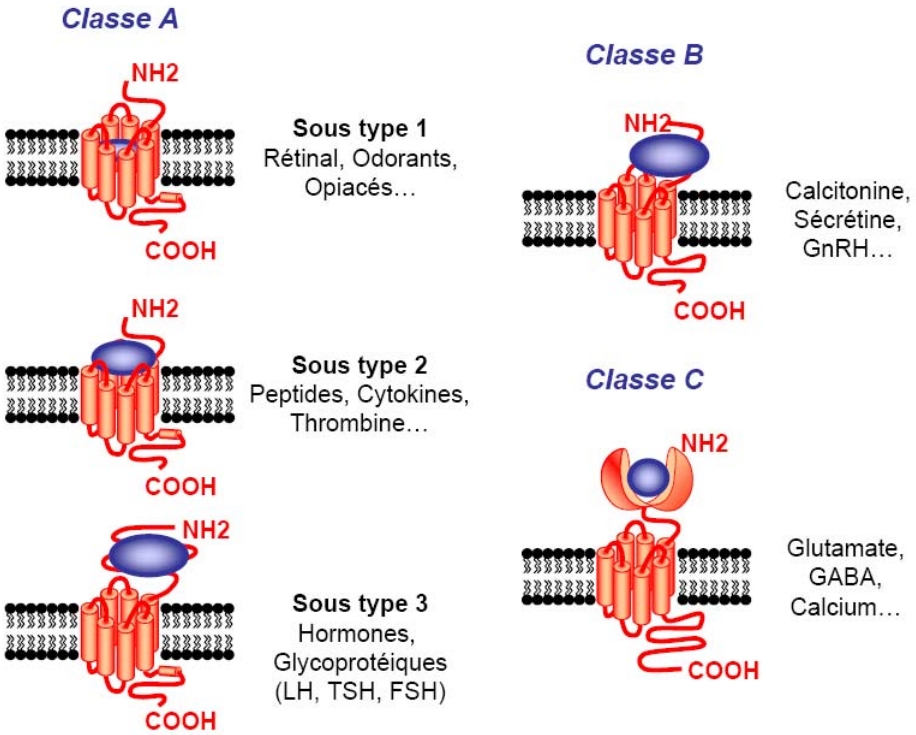


Figure 19: Les différentes classes de RCPGs. Représentation schématique des principales classes de RCPGs. Le site de liaison du ligand, représenté en bleu, est différemment positionné selon les récepteurs considérés.

Les récepteurs $GABA_B$ sont au contraire hétérodimériques **(Figure 20).** Ils sont constitués de deux sous-unités nommées $GABA_{B1}$ (B1) et $GABA_{B2}$ (B2). B1 est responsable de la liaison du ligand, alors que B2 assure le couplage aux protéines G (Duthey et al. 2002; Kniazeff et al. 2002).

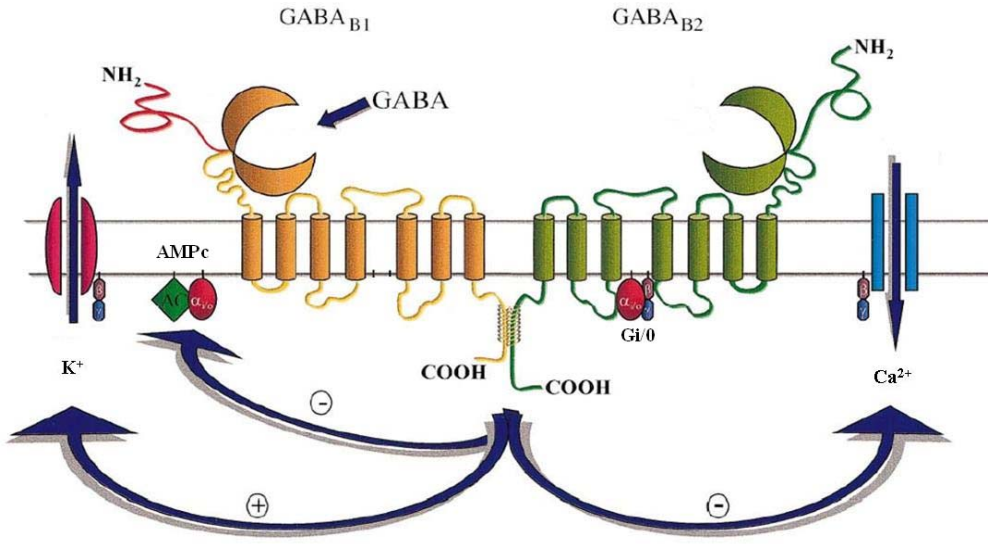


Figure 20 : Représentation schématique du récepteur $GABA_B$ et de ses cibles intracellulaires. Le récepteur fonctionnel est un hétérodimère obligatoire fait des sous-unités $GABA_{B1}$ (orange) qui lie le ligand et $GABA_{B2}$ (vert) couplée aux protéines $G_{i/o}$ (rouge). NH_2 et COOH représentent respectivement les parties N-(extra) et C-(intra) terminales des sous-unités. α, β, γ sont les sous-unités de la protéine G. Les cibles intracellulaires sont l'adénylate cyclase (AC en vert), les canaux calciques (en bleu) et les canaux potassiques (en rouge). (-) et (+) représentent les régulations exercées par le récepteur $GABA_B$, respectivement inhibition et activation.

En 1997, le premier ADNc du récepteur $GABA_B$ fut cloné (Kaupmann et al. 1997). Ce récepteur nommé B1, bien qu'étant capable de lier différents ligands dont le GABA, n'est pas fonctionnel car non adressé à la surface cellulaire (Couve et al. 1998). En effet, la présence d'une séquence minimale de type RSR au niveau de son domaine carboxy-terminal est responsable de sa rétention au niveau du RE. Récemment, des travaux ont permis d'identifier la liaison de protéines COPI au niveau de ce motif (Brock et al. 2005). Cette interaction avec COPI est responsable du transport rétrograde de B1, exprimé seul, du *cis*-Golgi vers le RE. Cependant, même lorsque ce système de rétention est rendu inopérant par mutation, la sous-unité B1 atteint la surface cellulaire seule mais ne peut activer les protéines G. Cela suggérait qu'une autre protéine associée à B1 était nécessaire à sa fonction.

Un an après la découverte de B1, un récepteur homologue nommé B2 fut cloné (Jones et al. 1998; Kaupmann et al. 1998; White et al. 1998; Kuner et al. 1999). Ce récepteur exprimé seul, est bien adressé à la surface cellulaire mais est incapable de lier le GABA. Lorsqu'il est co-exprimé avec B1, il permet alors la formation d'un récepteur fonctionnel possédant toutes les propriétés décrites pour le récepteur $GABA_B$ neuronal (Marshall et al. 1999).

L'identification d'un motif d'interaction de type superhélicoïdal entre les domaines C-terminaux de B1 et B2 a permis de mieux comprendre le mécanisme d'adressage de l'hétérodimère à la surface cellulaire (Kammerer et al. 1999). En effet, l'interaction des domaines C-terminaux de B1 et B2, à l'issue de leur synthèse dans le RE, conduirait à la formation de la structure superhélicoïdale essentielle au masquage du motif RSR présent chez B1. Cette interaction ne permettrait pas aux protéines COPI d'accéder à ce motif, favorisant ainsi l'envoi en surface de l'hétérodimère (Bouvier 2001; Pin et al. 2004) **(Figure 21).** Toutefois, B2 n'a pas qu'un rôle de protéine d'adressage. En effet, B1 muté en son site de rétention, nommé $B1_{ASA}$, atteint seul la surface cellulaire (Pagano et al. 2001). Cette sous-unité reconnaît les ligands (Galvez et al. 2001) mais n'active pas les protéines G.

La sous-unité B2 est donc indispensable à la fonctionnalité du récepteur. En fait, il semble que ce soit B2 qui se couple aux protéines G (Galvez et al. 2001; Duthey et al. 2002). Ces données supportent donc l'hypothèse d'une trans-activation allostérique du récepteur $GABA_B$. Ainsi, ce serait la liaison du GABA sur B1 qui conduirait à l'adoption par B2 d'une conformation favorable à un couplage aux protéines G (Galvez et al. 2001) **(Figure 21).**

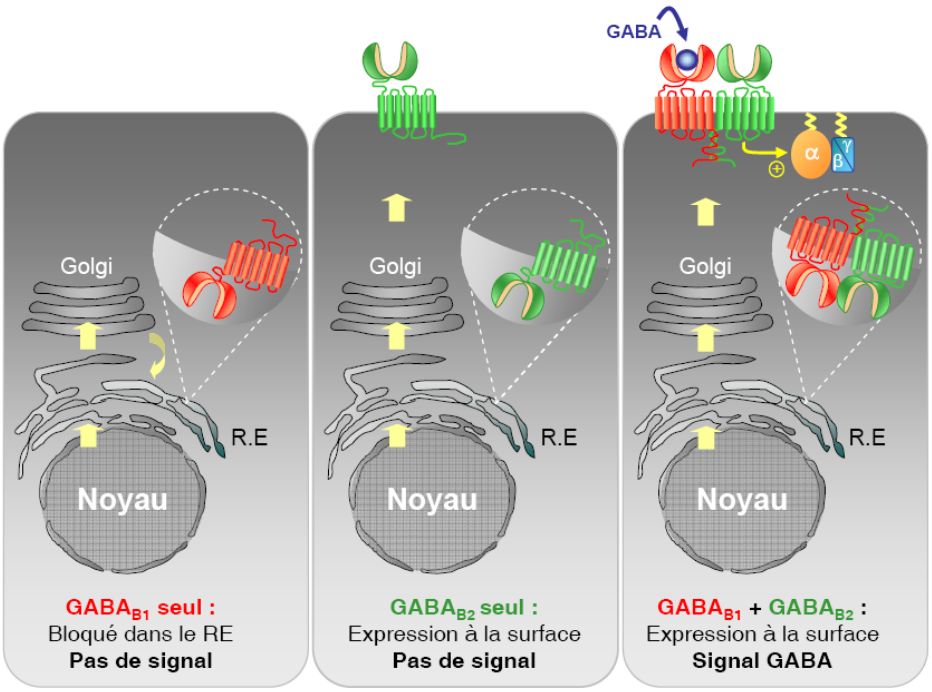


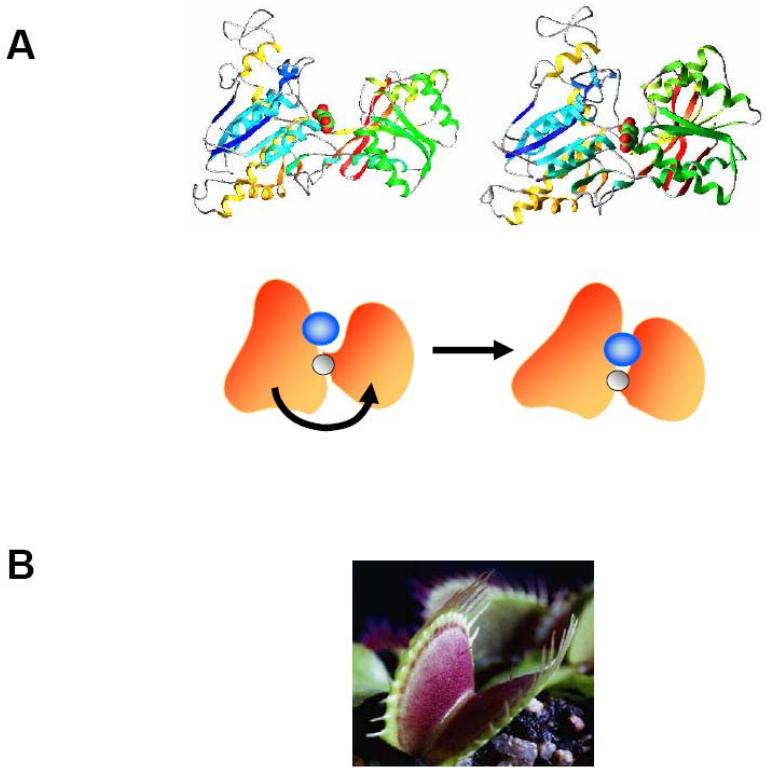
Figure 21 : Le récepteur $GABA_B$: un hétérodimère obligatoire. Système de contrôle de l'envoi en surface du récepteur $GABA_B$. B1 exprimée seule est retenue dans le RE à cause d'une séquence de rétention RSR présente dans son domaine C-terminal. B2 peut atteindre seule la membrane plasmique mais ne peut lier le GABA. Par contre, l'interaction des deux sous-unités notamment au niveau de leur extrémité C-terminale permet l'adressage à la surface cellulaire d'un hétérodimère parfaitement fonctionnel capable de lier le GABA via B1 et d'activer les protéines G via B2.

Cette interaction B1/B2 semble très spécifique. Cependant, les deux sous-unités généralement colocalisées dans la plupart des régions du cerveau (Bischoff et al. 1999) se retrouvent parfois exprimées dans des régions distinctes (Jones et al. 1998; Kaupmann et al. 1998; Kuner et al.

1999). La sous-unité B1 a été ainsi retrouvée dans certaines régions du cerveau n'exprimant pas la sous-unité B2. Ce dernier point ne permet donc pas d'exclure que B1 puisse présenter des rôles indépendants de B2 qui sont encore indéterminés à ce jour.

2.2 Mécanismes d'activation du récepteur $GABA_B$

La particularité des récepteurs de classe C vient de la structure de leur domaine N-terminal extracellulaire où se fixe le ligand. En effet, la résolution de la structure de ce domaine pour un récepteur (mGlu1) (Kunishima et al. 2000) de la même famille que le récepteur GABAB montre qu'il s'agit de deux lobes se faisant face (Kaupmann et al. 1997). Ces lobes sont capables de se refermer sur le ligand agoniste à l'image de la fermeture des deux lobes de la dionée (plante carnivore, de son nom anglais Venus Flytrap) au contact d'un insecte **(Figure 22).** Ainsi, alors que la forme ouverte semble prépondérante en l'absence de ligand, la fixation d'une molécule agoniste au niveau de ces domaines stabiliserait la forme fermée. La résolution des structures cristallographiques des domaines externes de mGlu1, en présence ou absence d'agoniste, a permis de montrer que cette fermeture s'accompagne d'un changement conformationnel aboutissant à une modification de l'orientation relative des deux protomères. Ce mouvement de grande amplitude entre sous-unités permettrait le passage à l'état actif du domaine heptahélice conduisant à l'activation des protéines G (Pin et al. 2004) **(Figure 22).**



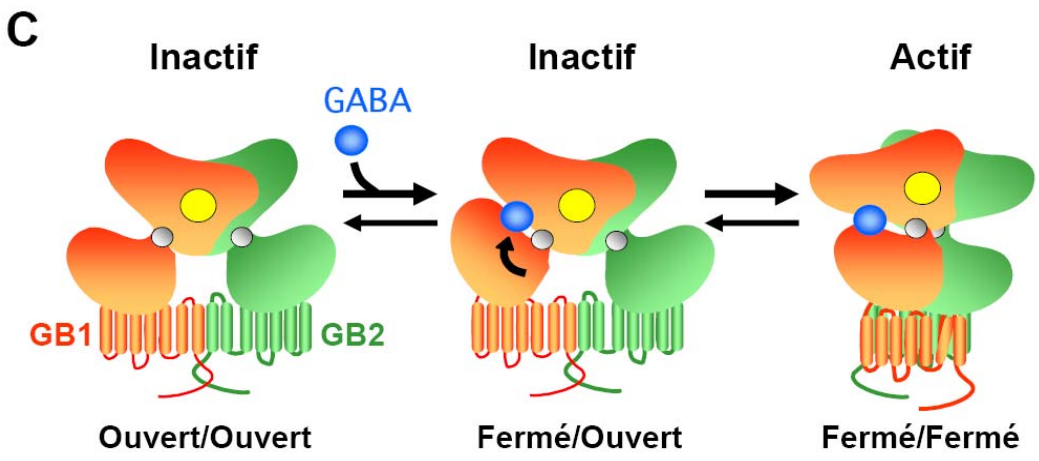


Figure 22 : Modèle de fonctionnement du domaine extracellulaire (DEC) du récepteur $GABA_B$. A. La liaison d'un agoniste (en bleu) au niveau de B1 stabilise la forme fermée du DEC. **B.** La dionée (de son nom anglais Venus Flytrap) qui a donné le nom de VFT à ce DEC. **C.** Modèle d'activation du récepteur $GABA_B$ d'après (Pin et al. 2004).

3. Variants d'épissage du récepteur $GABA_B$

Pour chacune des deux sous-unités, il existe plusieurs variants d'épissage : neuf isoformes pour la sous-unité B1, nommées de 1a à 1g ont été clonés **(Figure 23),** et deux sous-types de la sous-unité B2 ont été identifiés mais leur existence semble controversée (Billinton et al. 2001; Bowery et al. 2002; Bettler et al. 2004). Cependant, seuls deux variants d'épissage de $GABA_{B1}$ prédominent, B1a et B1b. Ceux-ci diffèrent par la présence d'une paire de domaines « Sushis » à l'extrémité N-terminale extracellulaire de B1a (Hawrot et al. 1998). Ces domaines « Sushis », ou petites séquences consensus, sont retrouvés dans d'autres récepteurs couplés aux protéines G (Parthier et al. 2007; Sun et al. 2007) et sont impliqués dans les interactions protéines-protéines (Lehtinen et al. 2004). La présence de ces domaines « Sushis » spécifiques de l'isoforme B1a ainsi que l'absence de différences pharmacologiques et fonctionnelles *in vitro* entre B1a/B2 et B1b/B2, suggèrent l'existence de protéines auxiliaires qui modifieraient l'activité, la pharmacologie et la localisation des deux sous-types de récepteurs (Marshall et al. 1999; Bettler et al. 2006), comme précédemment montré avec d'autres types de récepteurs couplés aux protéines G (McLatchie et al. 1998).

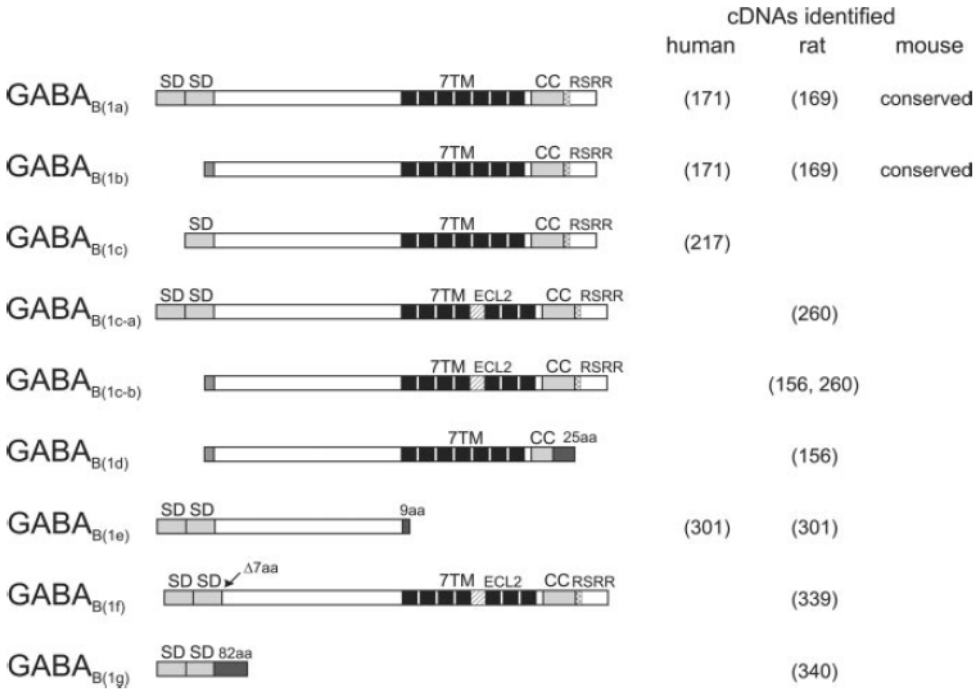


Figure 23 : Structure des différents isoformes de la sous-unité $GABA_{B1}$ chez les vertébrés. SD = domaines « Sushis »; 7TM = sept domaines transmembranaires ; CC = domaines coiled-coil ; RSRR = motif de rétention au réticulum endoplasmique (Bettler et al. 2004).

3.1 Différences de localisation

L'expression des sous-unités B1a, B1b et B2 dans le cortex cérébral, le thalamus, les couches I-V des cornes dorsales de la moelle épinière (Price et al. 1984; Malcangio and Bowery 1996; Charles et al. 2001) et les ganglions spinaux (Towers et al. 2000; Charles et al. 2001; Engle et al. 2006) fournit le substrat anatomique des effets antinociceptifs du baclofène, agoniste sélectif du $GABA_B$. Les mécanismes d'activation des différents sous-types de récepteurs $GABA_B$ dans les circuits nociceptifs, ainsi que leur localisation cellulaire et subcellulaire, ont fait l'objet de nombreuses études récentes. En particulier, une série de travaux a permis de mettre en évidence la distribution différentielle des variants d'épissage B1a et B1b (Billinton et al. 1999; Fritschy et al. 1999; Chen et al. 2004; Lujan et al. 2004; Bettler and Tiao 2006; Lujan et al. 2006; Vigot et al. 2006). Il est fréquent qu'un seul variant soit majoritairement exprimé dans certaines régions. Ainsi, l'expression de B1b dans le thalamus du rat et de l'Homme est plusieurs fois supérieure à celle de B1a (Bischoff et al. 1999). A l'inverse, plus de 90% des ARNm B1 codent pour le variant B1a dans les somas des ganglions spinaux, à l'origine des fibres nociceptives de type C et Aδ. Dans les couches superficielles des cornes dorsales, les deux variants sont exprimés à des niveaux comparables (Towers et al. 2000). Ces résultats sont à rapprocher de données récentes qui suggèrent, dans plusieurs régions cérébrales, une distribution différentielle des variants B1a et B1b dans les compartiments pré-

et post-synaptiques respectivement, notamment dans le cervelet de l'homme et du rat (Billinton et al. 1999), ainsi qu'au niveau des synapses glutamatergiques du noyau cochléaire chez le rat (Lujan et al. 2004). Cette localisation subcellulaire a été étudiée en détail dans l'hippocampe de rat, et se caractérise par l'expression sélective de B1a sur les terminaisons glutamatergiques alors que les deux variants B1a et B1b, sont présents sur les terminaisons GABAergiques (Kulik et al. 2003; Bettler and Tiao 2006; Ulrich et al. 2007) **(Figure 24).** En utilisant des méthodes complémentaires, les auteurs ont montré que les hétérodimères contenant B1a contrôlent principalement la libération pré-synaptique de glutamate (hétérorécepteurs) (Waldmeier et al. 2008), les variants B1b participant, quant à eux, à l'inhibition post-synaptique. Les deux isoformes sont présents sur les terminaisons GABAergiques (autorécepteurs) (Waldmeier et al. 2008). Des modèles de souris génétiquement modifiées, chez lesquelles l'invalidation génique porte sélectivement sur les variants d'épissage B1a ou B1b, ont également été développés (Ulrich and Bettler 2007). Ces modèles ont permis de préciser la localisation de ces variants, mais aussi leurs fonctions spécifiques à l'aide de méthodes morphologiques et électrophysiologiques. L'ensemble de ces études a mis en évidence des rôles spécifiques, et non redondants, pour ces deux variants (Vigot et al. 2006).

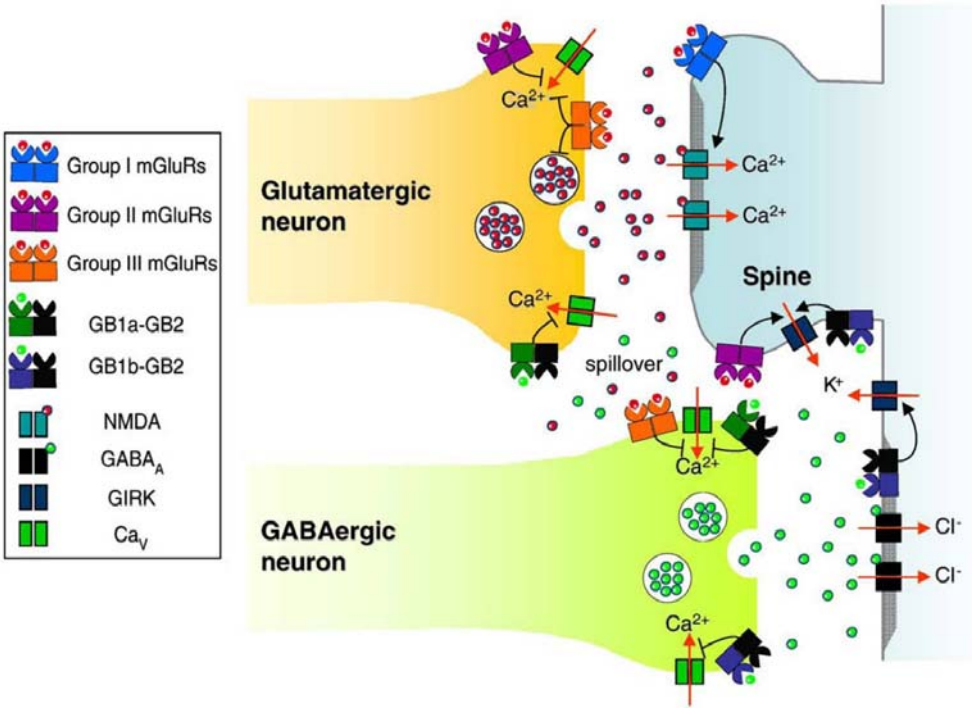


Figure 24 : Localisation synaptique des récepteurs GABA$_B$.
Les hétérodimères B1a/B2 et B1b/B2 sont coexprimés sur les terminaisons GABAergiques (autorécepteurs) où ils modulent le relargage du GABA via l'inhibition de canaux calciques voltage-dépendants. Les hétérorécepteurs GABA$_B$ se trouvent sur les terminaisons glutamatergiques et sont activés par le GABA ambiant. B1a/B2 est principalement associé avec les terminaisons glutamatergiques où il module le relargage du glutamate. Les récepteurs GABA$_B$ post-synaptiques (principalement B1b/B2) diminuent l'activité neuronale à travers l'activation des canaux potassiques.

La population pré-synaptique semble essentiellement couplée aux canaux calciques (blocage de l'entrée de calcium) et régule l'exocytose des neurotransmetteurs présents dans les terminaisons nerveuses **(Figure 24).** L'inhibition des canaux calciques passe par des protéines Gi/o couplées au récepteur (Strock et al. 2004) alors que l'inhibition de l'exocytose passe par un blocage de la machinerie de fusion membranaire dont le mécanisme reste encore méconnu à ce jour (Capogna et al. 1996; Wu et al. 1997; Spafford et al. 2003). La population post-synaptique semble quant à elle préférentiellement couplée aux canaux GIRK (Luscher et al. 1997). Cet effet passe par le complexe βγ associé aux protéines Gi/o, qui favorise la sortie d'ions potassium via l'ouverture de canaux potassiques. Cette sortie d'ions positifs entraîne une hyperpolarisation des neurones post-synaptiques qui contribue à augmenter le seuil d'excitabilité du neurone (McCormick 1989) **(Figure 24).**

Il faut noter, en outre, que l'expression et la localisation subcellulaire de B1 sont plastiques dans le cervelet et peuvent être modulées au cours du développement. L'isoforme B1a est ainsi prédominant au cours de la période prénatale. Son expression diminue ensuite après la naissance et celle de B1b devient prédominante à P10 (Fritschy et al. 1999).

3.2 Différences de fonction *in vivo*

La génération de souris qui expriment sélectivement l'isoforme B1a (B1b-/-) ou B1b (B1a-/-) a permis de montrer des différences pharmacologiques *in vivo* (Vigot et al. 2006). Notamment, l'isoforme B1a, localisé préférentiellement dans le compartiment présynaptique semble être essentiel dans les performances cognitives (Vigot et al. 2006; Jacobson et al. 2007). De plus, les deux isoformes B1a et B1b ont des rôles différents dans l'acquisition et l'extinction de la mémoire aversive (Jacobson et al. 2006).

4. Pharmacologie du récepteur $GABA_B$

Le domaine en N-terminal (Venus Flytrap, VFT) de la classe C des GPCRs contient le site de liaison des agonistes et antagonistes compétitifs (les ligands orthostériques). Dans le cas du récépteur $GABA_B$, le GABA et les autres ligands orthostériques se lient seulement au VFT de $GABA_{B1}$, notamment en interagissant avec la Ser246 et le Glu465 (nomenclature basée sur la séquence $GABA_{B1a}$ du rat) (Malitschek et al. 1999; Galvez et al. 2000; Kniazeff et al. 2002) **(Figure 25).** En effet, des analyses sur l'évolution du VFT de $GABA_{B2}$ montrent qu'aucun ligand ne lie ce domaine (Kniazeff et al. 2002).

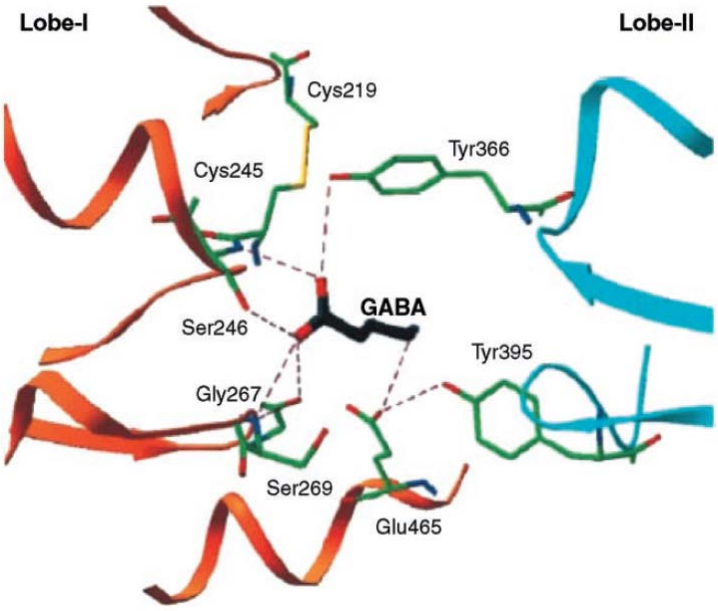


Figure. 25. Modèle tridimensionnel du module Venus flytrap (VFTM) de $GABA_{B1}$. Un modèle de liaison du GABA au niveau de la sous-unité $GABA_{B1}$. Les interactions supposées entre le GABA et les acides aminés de $GABA_{B1}$ sont montrés en pointillés. (Kniazeff et al. 2002).

Les récepteurs $GABA_B$ sont pharmacologiquement identifiés depuis le début des années 80, étant sélectivement activés par le baclofène (β-parachlorophényl-GABA) (Hill et al. 1981), une molécule utilisée dans le traitement de la spasticité chez des patients atteints de sclérose en plaque, grâce à ses propriétés myorelaxantes (Brogden et al. 1974) **(Figure 26).** Les agonistes du récepteur $GABA_B$ montrent de nombreux effets bénéfiques à la fois chez l'animal et chez l'Homme (Bowery 2006). En effet, l'activation du récepteur $GABA_B$ supprime le comportement de recherche de drogues (Cousins et al. 2002), et a quelques effets anxiolytiques sur des modèles animaux et chez l'Homme (Mombereau et al. 2005). Cependant, à cause de nombreux effets secondaires tels que l'hypothermie et la sédation, l'utilisation des agonistes $GABA_B$ est fortement limitée en thérapeutique (Bowery 2006). De plus, la tolérance au baclofène à la suite d'une administration chronique est bien établie (Lehmann et al. 2003).

Les récepteurs $GABA_B$ sont aussi impliqués dans de nombreux effets des drogues tels que l'acide gamma-hydroxybutyrique (GHB) qui agit comme un agoniste partiel du récepteur $GABA_B$ à fortes doses (Lingenhoehl et al. 1999; Kaupmann et al. 2003).

Les antagonistes du récepteur $GABA_B$ montrent aussi de nombreux effets thérapeutiques potentiels, notamment des actions antidépressives (Slattery et al. 2005), une amélioration de la cognition (Froestl et al. 2004), et des effets bénéfiques sur des modèles de rats épileptiques avec des états d'absence (Manning et al. 2003) **(Figure 26).** Parmi les antagonistes

spécifiques du récepteur $GABA_B$, on distingue le CGP55845 de forte affinité et le Saclofen (2-hydroxysaclofen) et le Phaclofen, antagonistes de faible affinité.

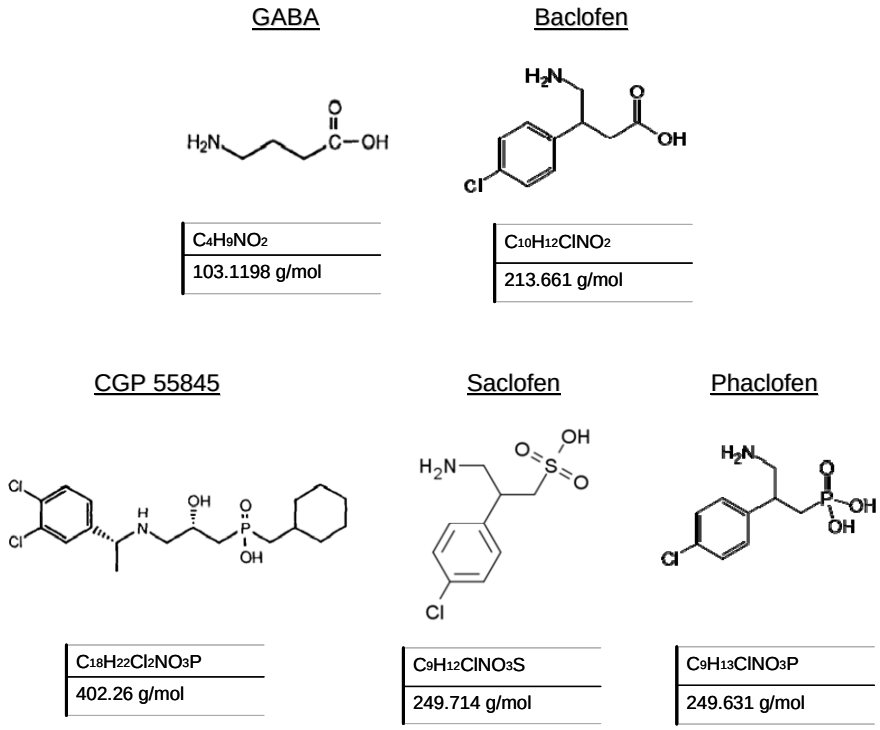
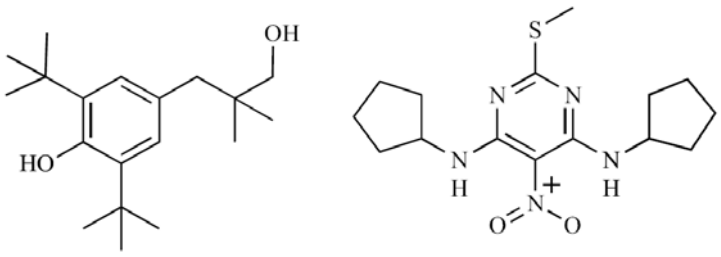


Figure 26 : Structure du GABA, ligand endogène des récepteurs du GABA; du baclofène agoniste sélectif du récepteur $GABA_B$, et des antagonistes compétitifs du récepteur $GABA_B$, de forte (CGP55845) et de faible affinité (Saclofene et Phaclofen) (Kerr and Ong 1995).

Grâce à des stratégies de screening, des modulateurs allostériques agissant sur le récepteur $GABA_B$ ont été découverts (Urwyler et al. 2001; Urwyler et al. 2003). Contrairement aux modulateurs allostériques déjà bien documentés concernant le récepteur au glutamate (mGluR), seulement des modulateurs allostériques positifs ont été décrits pour le récepteur $GABA_B$ (PAM : Positive Modulator Allosteric) **(Figure 27).** Ces composés ne montrent pas d'activité d'agoniste, mais augmentent à la fois la puissance et l'efficacité des agonistes $GABA_B$. Ainsi, ces molécules semblent être une meilleure alternative que les agonistes $GABA_B$, permettant une augmentation spécifique de l'activation du $GABA_B$ à l'endroit et au moment approprié. De plus, ils entraînent une moindre tolérance contrairement aux agonistes qui activent constamment le récepteur dans toutes les régions où il est exprimé (Pin et al. 2007).



CGP7930 GS39783

Figure 27 : Structure de deux modulateurs allostériques (PAMs) du récepteur $GABA_B$.

5. Désensibilisation et perte de fonction du récepteur $GABA_B$ en conditions douloureuses

Nous avons étudié les mécanismes de désinhibition dans la moelle épinière en conditions neuropathiques, et plus particulièrement, nous nous sommes intéressés à la perte du contrôle inhibiteur GABAergique $GABA_B$.

5.1. Effets controversés du baclofène

Beaucoup de drogues à action centrale, comme les benzodiazépines, agissent via l'activation des récepteurs $GABA_A$. Par contre, un seul composé utilisé actuellement en clinique est connu pour agir spécifiquement sur les récepteurs $GABA_B$: c'est le baclofène **(Figure 26).** Cette molécule a été introduite en thérapeutique en 1972 (Faigle et al. 1972), initialement pour réduire les phénomènes de spasticité, bien avant que l'existence du récepteur $GABA_B$ soit reconnue. Comme pour bien d'autres molécules actives « anciennes », son introduction en médecine n'a pas été accompagnée de la caractérisation de son mécanisme d'action, bien qu'il fût désigné sous le nom de « mimétisme GABA ».

Depuis, de nombreux travaux ont montré que le baclofène pouvait agir sur les récepteurs $GABA_B$ à la fois présynaptiques (Hammond et al. 1984; Sawynok et al. 1985; Iyadomi et al. 2000) et postsynaptiques (Kangrga et al. 1991; Voisin and Nagy 2001; Derjean et al. 2003). Les premiers effets analgésiques / antinociceptifs du baclofène administré par voie systémique ont été décrits il y a environ 25 ans et ont été depuis, de nombreuses fois confirmés et controversés (Bowery 2006). Son efficacité en clinique comme agent antinociceptif est partielle (Loubser et al. 1996; Becker et al. 2000) et souvent restreinte aux douleurs liées à la spasticité. De plus, comme les patients développent rapidement une tolérance et que les effets secondaires sont importants lors de son injection systémique, son usage est limité (Bowery 2006). Les phénomènes de tolérance n'ont cependant pas été rapportés lorsque le baclofène est administré par voie intrathécale. De très rares rapports

cliniques ont montré une efficacité satisfaisante sur des douleurs non associées à la spasticité (Zuniga et al. 2000; Zuniga et al. 2002). Le baclofène peut aussi être utilisé comme adjuvant thérapeutique aux stimulations électriques de la moelle épinière lors de neuropathies (Lind et al. 2004), mais ces thérapeutiques sont lourdes de mise en oeuvre. En recherche expérimentale chez l'animal, il a été montré que le baclofène pouvait modérer les phénomènes d'allodynie mécanique développés par des rats rendus neuropathiques (Hwang et al. 1997; Patel et al. 2001). Mais la réversion du phénomène n'est que partielle (Idanpaan-Heikkila et al. 1999; Franek et al. 2004; Gwak et al. 2006) lorsque les effets sur rats neuropathiques sont comparés aux naïfs. Il y aurait donc bien une limitation des contrôles inhibiteurs $GABA_B$ en conditions de douleur chronique puisque, que ce soit en clinique ou chez l'animal, les effets antinociceptifs décrits ne sont que partiels et ne permettent pas de réverser complètement les états douloureux chroniques. Notons que des injections intrathécales d'antagoniste du récepteur $GABA_B$, entraînent chez l'animal des comportements hyperalgiques et augmentent la réponse des neurones spinaux à une stimulation nociceptive (Hao et al. 1994; Sokal et al. 2001).

De nombreuses hypothèses ont été soulevées pour tenter d'élucider cette perte de contrôle inhibiteur GABAergique $GABA_B$ en conditions douloureuses, en visant les différents points de contrôle possibles de cette régulation. Il a été montré que cette désinhibition n'est pas due à une régulation génique des sous-unités du récepteur. En effet, les travaux de Engle et collaborateurs ont ainsi montré, par des approches immunohistochimiques et biochimiques, que les taux protéiques des sous-unités B1 et B2 restent inchangés après lésion nerveuse, dans la corne dorsale de la moelle épinière et dans les ganglions rachidiens (Engle et al. 2006). Nous avons aussi vérifié cette hypothèse par des approches de RT-PCR dans notre modèle de douleur SNL. Nous montrons que les expressions de B1a, de B1b, et de B2 restent inchangées entre les animaux Sham et les animaux SNL (cf Publication I). Cette perte de contrôle GABAergique $GABA_B$ n'est pas due non plus à un mécanisme de désensibilisation comme nous le verrons ci-dessous.

5.2. Mécanismes de désensibilisation rapide

Un mécanisme de désensibilisation classique des RCPGs repose sur l'internalisation par endocytose du récepteur après son activation par un ligand. Ce mécanisme de désensibilisation restait controversé pour le récepteur $GABA_B$ (Gonzalez-Maeso et al. 2003; Perroy et al. 2003; Fairfax et al. 2004). Nous avons montré au laboratoire que l'activation du récepteur $GABA_B$ par son agoniste induisait bien une internalisation dépendante des

clathrines, mais que le récepteur était rapidement recyclé à la membrane plasmique des neurones (Laffray et al. 2007). Ceci suggère que les récepteurs $GABA_B$ sont toujours disponibles à la membrane plasmique même après activation du récepteur par l'agoniste. Par contre, une stimulation chronique à la capsaïcine du réseau neuronal tend à diminuer l'endocytose du récepteur (Laffray et al. 2007). Comme cette stimulation des fibres de type nociceptif induit la dissociation de l'hétérodimère, nous pouvons envisager que la désensibilisation du récepteur soit liée à cette dissociation (Laffray et al. 2007). L'altération de l'endocytose et du recyclage confirme la séparation des sous-unités. En effet, la sous-unité B1 seule ne peut lier l'agoniste qu'avec une efficacité réduite (Galvez et al. 2001), ce qui a pour effet de diminuer l'endocytose stimulée par un ligand.

Suite à l'ensemble de ces résultats, notre hypothèse est que l'activation du récepteur $GABA_B$ peut être altérée en conditions de douleurs neuropathiques via son interaction avec des protéines partenaires.

5.3. Mécanismes de dysfonctionnement du récepteur $GABA_B$

5.3.1. Interactions possibles avec des protéines partenaires spécifiques

L'intervention des protéines associées au récepteur fournit un niveau additionnel de complexité dans la liste des mécanismes susceptibles de contrôler le trafic ou l'activation des récepteurs couplés aux protéines G. Ces protéines pourraient en particulier augmenter la diversité des récepteurs *in vivo* en modifiant l'activité, la pharmacologie ou le trafic et l'ancrage membranaire des récepteurs. En effet, Bouvier avait suggéré que des protéines adaptatrices, jouant le rôle de protéines chaperonnes pouvaient interagir avec des RCPGs et moduler leur fonction (Bouvier 2001). C'est par exemple le cas des protéines RAMPs *(Receptor Activity Modifying Proteins)* qui interagissent avec les CRLRs *(Calcitonin-Receptor_Like Receptors)* (McLatchie et al. 1998). De plus, il a aussi été envisagé que de telles protéines dites chaperonnes influenceraient l'assemblage et l'adressage des RCPGs oligomériques (Ciruela et al. 2000). C'est ainsi que nous nous sommes intéressés au rôle de protéines chaperonnes dans la régulation de l'état hétérodimérique du récepteur $GABA_B$.
De nombreuses protéines interagissent avec les queues cytoplasmiques des sous-unités du récepteur $GABA_B$ **(Figure 28).** Parmi ces protéines, certaines sont des facteurs de transcription leucine-zipper (CREB2/ATF-4, CHOP), suggérant que le récepteur $GABA_B$ entraîne des changements métaboliques à long terme en faisant intervenir des synthèses

protéiques. De plus, de nombreuses protéines d'échafaudages telles que 14-3-3ζ, le NSF (*N*-ethylmaleimide-sensitive factor), la tamaline, et MUPP-1 interagissent avec les domaines en C-terminal de B1 et/ou B2. Ces protéines semblent jouer un rôle dans la régulation de la dimérisation du récepteur, de son trafic intracellulaire et de sa localisation synaptique. La β-filamine, une protéine liant l'actine, est supposée ancrer l'hétérodimère $GABA_B$ au cytosquelette via son interaction avec la sous-unité B2. HNK-1, un carbohydrate porté par des protéines de la matrice extracellulaire telles que la tenascine, se lie aux domaines extracellulaires de B1a et de B1b.

Ces interactions pourraient de plus s'avérer spécifiques des différents sous-types B1a/B1b, et/ou d'une localisation subcellulaire particulière. Ainsi, les domaines extracellulaires spécifiques de B1a (les domaines « Sushis ») interagissent avec une protéine de la matrice extracellulaire, nommée la fibuline-2.

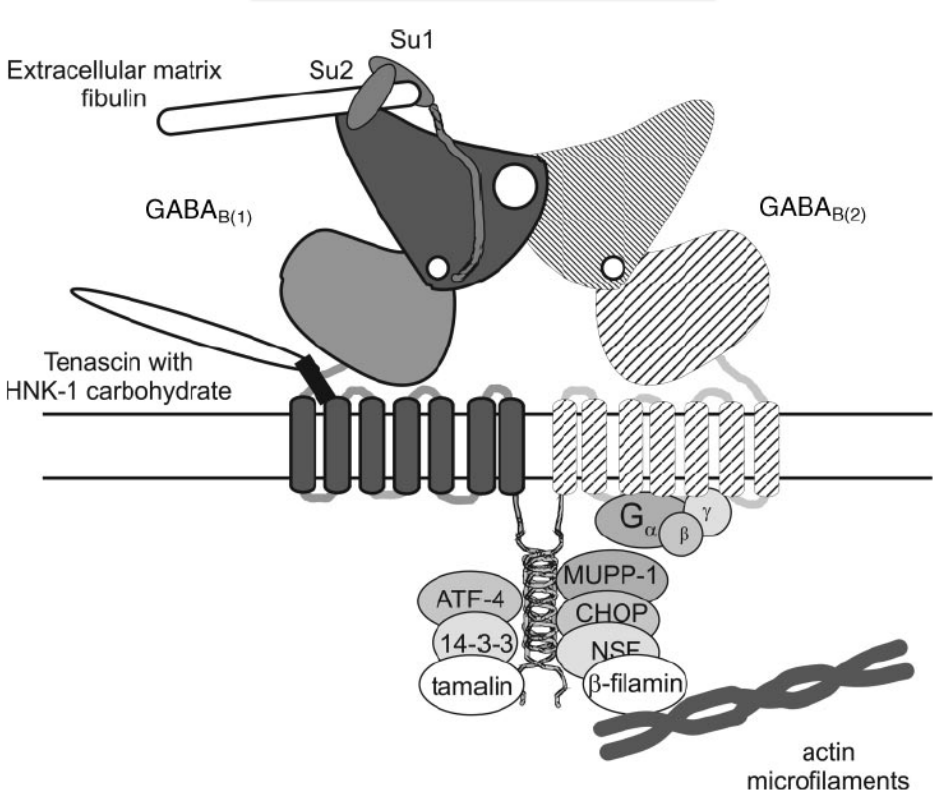


Figure 28: Les protéines d'interactions avec le récepteur $GABA_B$ (Bettler et al., 2004).

L'ensemble de ce travail porte sur l'étude du dysfonctionnement du récepteur $GABA_B$ en conditions de douleurs neuropathiques, via l'interaction avec des protéines partenaires spécifiques susceptibles de réguler son activité. Notre étude a porté plus précisément sur trois candidats possibles, la protéine 14-3-3ζ, la fibuline-2 et la protéine CHOP, qui sont présentées dans le chapitre suivant.

5.3.2. Altérations de la diffusion membranaire

L'interaction du récepteur $GABA_B$ avec des protéines partenaires peut aussi altérer la diffusion membranaire du récepteur. En effet, des modifications de la mobilité membranaire latérale des différentes sous-unités constitutives des récepteurs $GABA_B$ pourraient représenter un autre mécanisme non-génomique putatif de modulation de la signalisation $GABA_B$. Il a été démontré que l'extrêmité C-terminale de la sous-unité B2 est impliquée dans le contrôle de cette diffusion membranaire (Pooler et al. 2007; Pooler et al. 2009). La restriction de cette diffusion confinerait le récepteur dans des compartiments membranaires spécifiques tels que les domaines membranaires enrichis en radeaux lipidiques. Il a été récemment proposé qu'un tel confinement favoriserait l'inhibition du récepteur (Bettler and Tiao 2006). La diffusion latérale du récepteur pourrait aussi l'empêcher d'atteindre une localisation subcellulaire adéquate et de s'associer avec ses cibles intracellulaires. La localisation du récepteur $GABA_B$ à la membrane est donc un phénomène dynamique. De plus, des techniques de microscopie à haute résolution, combinées à une reconstruction tridimensionnelle ont montré une régulation à plus long terme de la localisation subcellulaire du récepteur $GABA_B$ à la surface des cellules de Purkinje au cours du développement. En effet, les sous-unités B1 passent du tronc dendritique aux épines au cours de la différenciation. Ces changements de localisation accompagnent l'établissement et la maturation des synapses excitatrices (Lujan and Shigemoto 2006; Lujan 2007). Une telle modification de la localisation du récepteur, dans un contexte développemental, pourrait survenir également dans des situations lésionnelles. En effet, la plasticité post-lésionnelle des neurones se caractérise par la mise en jeu de programmes ontogénétiques (Lujan and Shigemoto 2006). Nous avons donc étudié d'éventuelles variations de distribution du récepteur $GABA_B$ et de ses protéines associées en situation de douleur neuropathique.

CHAPITRE 4 : Interactions protéiques différentielles

1 Etude d'une protéine chaperonne cytosolique, 14-3-3

Parmi les candidats possibles, les protéines 14-3-3 représentaient des candidats intéressants. Couve et collaborateurs en 2001, avaient montré *in vitro* par la méthode de double hybride que les sous-types ζ et η pouvaient s'associer avec la sous-unité B1 du récepteur $GABA_B$ (Couve et al. 2001). El Far et Betz ont ensuite proposé un modèle d'interactions de la sous-unité B2 (El Far et al. 2002) et de 14-3-3 (Couve et al. 2001) sur le domaine C-terminal de la sous-unité B1. Ces interactions se trouvent sur des sites partiellement chevauchants **(Figure 29).**

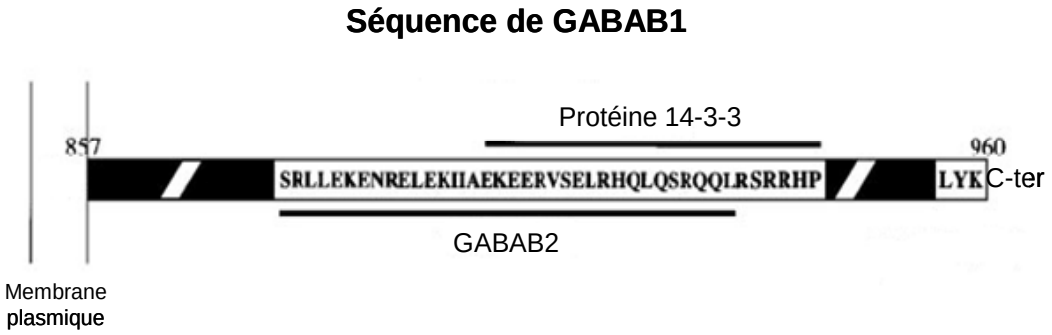


Figure 29 : Représentation schématique des domaines d'interactions protéiques localisés dans la région de la queue C-terminale de la sous-unité B1. Barre supérieure : interaction avec la protéine 14-3-3 ; Barre inférieure : interaction avec la sous-unité B2 (El Far and Betz 2002).

Les protéines 14-3-3 sont une famille de protéines solubles, ubiquitaires, d'environ 30kDa très conservées au cours de l'évolution et composées de sept isoformes appelés β, γ, ζ, η, θ, et δ dans les cellules de mammifères. Initialement décrites comme des protéines acides abondamment retrouvées dans le cerveau par Moore et Perez (Moore 1967), ces protéines sont largement distribuées dans les tissus nerveux et non nerveux. Cependant, elles sont très abondantes dans les neurones du système nerveux central, et y représentent 1% des protéines cytosoliques (Berg et al. 2003). Les protéines 14-3-3 peuvent s'associer en homo- ou hétérodimères et former des structures en forme de coupe avec un sillon amphiphile possédant deux sites de liaison au ligand (Fu et al. 2000; van Hemert et al. 2001). Ces complexes dimériques agissent comme des adaptateurs moléculaires auprès de plus de 300 cibles (Mackintosh 2004; Pozuelo Rubio et al. 2004; Mhawech 2005; Satoh et al. 2006). Elles vont interagir avec des molécules clefs de la signalisation impliquées dans la différenciation cellulaire, la prolifération, le trafic cellulaire et les processus apoptotiques, mais aussi avec

des protéines dont les dérégulations sont impliquées dans des maladies de type cancer, diabète, ou bien neurologiques comme les maladies de Parkinson et de Creutzfeldt Jacob.

D'un point de vue fonctionnel, une première hypothèse stipulait que 14-3-3 entrait en compétition avec les protéines du manteau de type COPI pour la liaison à l'extrêmité C-terminale de la sous-unité B1. Cette liaison pourrait dans ce cas réguler l'exportation hors du réticulum endoplasmique et/ou le recyclage de la sous-unité B1 (Bettler and Tiao 2006). Toutefois, des données récentes montrent que l'association entre B1 et 14-3-3 ne perturbe pas le trafic intracellulaire du récepteur (Brock et al. 2005). De plus, dans la moelle épinière, les protéines 14-3-3 sont localisées en dehors du réticulum endoplasmique, en étroite association avec des domaines membranaires (Laffray et al. soumis) qui pourraient être enrichis en radeaux lipidiques (Couve et al. 2001). Dans un modèle de douleur neuropathique chez le rat (modèle SNL), des résultats de notre laboratoire ont montré une augmentation spécifique de l'expression du gène 14-3-3ζ (ARNm et protéine) dans la corne dorsale de la moelle épinière ipsilatérale à la lésion nerveuse. Les conséquences de cette surexpression ont été étudiées sur des modèles de culture cellulaire. Il a ainsi été montré, par des approches biochimiques dans des cellules de lignées COS, que la protéine 14-3-3ζ dissocie l'hétérodimère B1b/B2 en interagissant spécifiquement avec la sous-unité B1b du récepteur. De plus, des études d'imagerie cellulaire de type FRET/FLIM montrent que l'interaction entre B1b et B2 diminue lorsque la protéine 14-3-3ζ est surexprimée dans les neurones. Sur le plan fonctionnel, des études de patch clamp et de dosage de GTPgammaS ont montré que la surexpression de 14-3-3ζ entraîne une diminution de la signalisation GABAergique. L'ensemble de cette étude permet de conclure qu'en conditions de douleurs neuropathiques, la protéine 14-3-3ζ est surexprimée et que cette surexpression entraîne une perte de l'inhibition GABAergique par dissociation de l'hétérodimère dans la moelle épinière (Laffray et al. soumis).

2 Etude d'une protéine de la matrice extracellulaire, la fibuline-2

Un autre partenaire potentiel est une protéine de la matrice extracellulaire, nommée fibuline-2. L'intérêt particulier de cette protéine est qu'elle intéragit spécifiquement avec les domaines « Sushis » présents uniquement à l'extrêmité N-terminale de la sous-unité B1a, interaction identifiée *in vitro* par un test de double hybride (Blein et al. 2004). Il nous semblait alors intéressant d'étudier la fibuline-2 qui représente un partenaire spécifique d'un sous-type de récepteur (B1a/B2).

Les fibulines, du nom latin *fibul* « étreinte, boucle » sont des glycoprotéines de la matrice extracellulaire que l'on trouve aussi en très faibles concentrations dans le plasma. Elles comprennent sept protéines différentes chez les mammifères, moins chez C.elegans, le poulet et le poisson zèbre (Barth et al. 1998).

Les fibulines consistent en plusieurs modules regroupés en trois domaines, I, II et III (de Vega et al. 2009) **(Figure 30).** Le domaine I représente le domaine N-terminal et constitue une partie variable entre chaque membre. Le domaine II représente la portion centrale et contient un nombre variable de module EGF-like en tandem. La plupart de ces modules EGF-like contiennent des séquences consensus de liaison au calcium et sont ainsi appelé cbEGF pour « calcium binding EGF-like modules ». Enfin, le domaine III qui représente le domaine en C-terminal, est spécifique aux fibulines et aux fibrillines (Giltay et al. 1999). Les membres de la famille des fibulines ont été classés en deux sous-groupes. Le premier sous-groupe comprend la fibuline-1 et la fibuline-2. Elles sont plus imposantes que les autres de par la présence dans leur domaine I de leurs trois modules anaphylatoxines, qui sont des composants du système du complément ayant un rôle dans l'inflammation et la défense contre les parasites. De plus, ces deux fibulines possèdent davantage de modules EGF-like dans leur portion centrale. La fibuline-1 est une protéine de 100kDa isolée à partir de fibroblastes en culture, issus de lignées de tératocarcinomes et du placenta. Elle présente 4 isoformes A, B, C et D qui diffèrent par leurs extrémités carboxy-terminales. Elles possèdent en commun une séquence unique de 537 acides aminés riche en cystéines et un peptide signal de 29 acides aminés.

La fibuline-2, isolée à partir d'une banque d'ADNc de fibroblastes de souris, a un poids moléculaire de 195kDa, et correspond à une chaîne polypeptidique de 1195 acides aminés précédée d'un peptide signal de 27 acides aminés. Précédant le domaine I, analogue à celui de la fibuline-1, elle possède un domaine de 150 acides aminés, domaine Na, riche en cystéines suivi d'un domaine Nb sans cystéine. Le domaine II contient 10 motifs répétés EGF. Dans la fibuline-2, le segment de connexion entre les domaines I et II est séparé par une région II* de type EGF. L'extrémité carboxy-terminale ou domaine III, comporte 115 acides aminés et est identique à celle de l'isoforme C de la fibuline-1. Les fibulines-1 et 2 sont localisées au niveau des membranes basales, des fibres élastiques et d'autres structures du tissu conjonctif (Roark et al. 1995; Reinhardt et al. 1996; Zhang et al. 1996).

Le deuxième sous-groupe comprend le reste des membres, de la fibuline-3 à la fibuline-7. Ce sont des protéines plus petites de 50-60 kDa, sauf la fibuline-6 qui contient un large domaine en N-terminal.

Les fibulines interagissent avec de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire (aggrecan, versican, laminine, tropoélastine entre autres). Les fibulines-1, 2 et 7 interagissent

aussi avec la fibronectine produite par les fibroblastes et d'autres types cellulaires (Godyna et al. 1995; Sasaki et al. 1996).

Des mutations des gènes des fibulines ont été identifiées dans des maladies génétiques humaines (Chu et al. 2004). Il a notamment été rapporté une altération du gène de la fibuline-1 dans la synpolydactylie, une malformation héréditaire rare dominante des membres distaux (Debeer et al. 2002). Des mutations de la fibuline-3 et -5 semblent entraîner des rétinopathies comme la dégénerescence maculaire (Michaelides et al. 2006). Des mutations de la fibuline-4 et -5 causent la Cutis Laxa (Peau Lâche ou Relâchée), une maladie autosomale récessive du tissu conjonctif dans laquelle la peau perd son élasticité (Hoyer et al. 2009).

Des souris knock-out pour les différents gènes de la fibuline montrent que toutes, excepté la fibuline-2, ont des défauts phénotypiques importants dans de nombreux organes. En effet, les souris knock-out pour la fibuline-2 (Sicot et al. 2008) sont viables, fertiles et ne montrent aucune anomalie anatomique. Cependant, la fibuline-2 semble jouer un rôle dans des conditions pathologiques. En effet, il a notamment été montré une surexpression des fibulines-1 et -2 lors de cirrhoses hépatiques chez le rat (Piscaglia et al. 2009). Au contraire, une perte de l'expression de la fibuline-2 facilite la progression du cancer du sein (Yi et al. 2007).

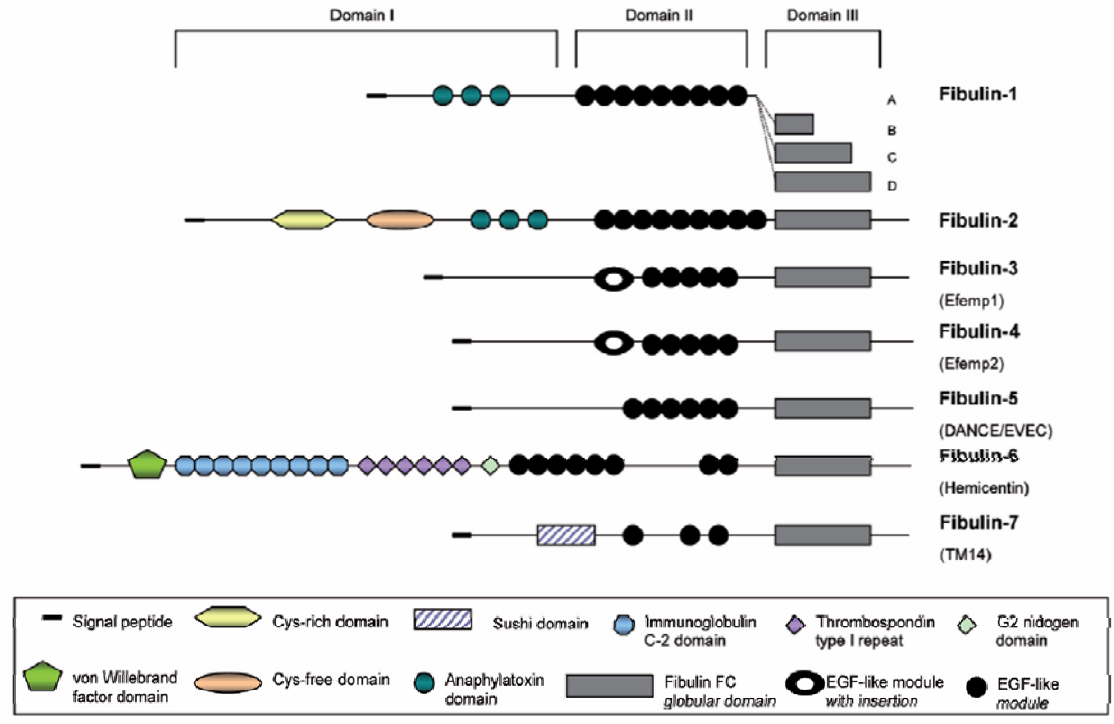


Figure 30: Structure des différents membres de la famille des fibulines. Les sept membres de la famille ont des arrangements similaires, avec un domaine I, II et III. Le domaine III en C-terminal contient un motif « Sushi » et le domaine II au centre consiste en plusieurs motifs EGF-like. Ces motifs dans les domaines II et III sont communs à toutes les fibulines. Le domaine I en N-terminal varie de part sa taille et sa composition entre les différents membres de la famille (de Vega et al. 2009).

3 Etude d'un facteur de transcription, CHOP

L'utilisation d'un système de double hybride a identifié un facteur de transcription, CHOP (CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) homologous protein), comme une protéine associée à la sous-unité B2 (Sauter et al. 2005). Cette protéine CHOP (aussi désigné gadd153 « DNA damage-inducible gene 153 ») appartient à la famille des facteurs de transcription C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein), qui ont tous pour caractéristique un motif basic-leucine zipper à l'extrémité de leur domaine C-terminal. La région basique sert de liaison à l'ADN et la leucine zipper de module d'interaction protéine-protéine (Ramji et al. 2002). La protéine CHOP est fortement surexprimée par des facteurs qui interfèrent avec la fonction normale du réticulum endoplasmique (Oyadomari et al. 2002) et a été impliquée dans le contrôle de l'apoptose induite par un stress du réticulum endoplasmique associée avec le diabète (Oyadomari et al. 2002; Oyadomari et al. 2004). De plus, CHOP semble être impliqué dans l'apoptose induite par l'ischémie. En effet, des souris n'exprimant plus la protéine CHOP montrent une forte diminution de la mort cellulaire induite par l'ischémie. Sauter et collaborateurs ont montré que CHOP interagit spécifiquement avec l'hétérodimère B1a/B2 via deux sites de liaisons distincts. Son domaine en C-terminal leucine zipper s'associe avec le domaine leucine zipper présent sur le domaine C-terminal de B2, et son domaine N-terminal s'associe avec une région encore inconnue de B1a. Il a été montré que cette interaction entraîne une accumulation intracellulaire du récepteur et par conséquent, une diminution de l'expression à la surface cellulaire de ce récepteur (Sauter et al. 2005). Par conséquent, il nous avait semblé intéressant d'étudier cette protéine CHOP qui peut provoquer un mécanisme puissant de régulation de l'expression à la surface d'un sous-type de récepteur spécifique, B1a/B2, dans des conditions physiopathologiques.

OBJECTIFS

OBJECTIF PRINCIPAL :

Notre thématique concerne les mécanismes de désinhibition en conditions neuropathiques dans la moelle épinière. Dans ce contexte, notre objectif principal est d'étudier la régulation de l'activation du récepteur $GABA_B$ par des protéines partenaires.

OBJECTIFS SPECIFIQUES :

1) La première protéine partenaire étudiée est la protéine 14-3-3ζ. Nous avions montré au laboratoire qu'en se liant à la sous-unité B1b du récepteur *in vitro* (Couve et al. 2001), elle entraîne une dissociation de l'hétérodimère. Il en résulte une diminution de la signalisation GABAergique. Cette protéine 14-3-3ζ est surexprimée en conditions de neuropathie et diminue l'activation du récepteur $GABA_B$ *in vivo*, contribuant ainsi aux processus de désinhibition et à la sensibilisation douloureuse.

Question : Peut-on cibler de manière spécifique cette interaction B1b/14-3-3ζ ?

Objectifs spécifiques :

- Valider des outils pour cibler spécifiquement l'interaction B1b/14-3-3ζ. Nous avons ainsi développé et testé des peptides de compétition analogues au domaine C-terminal de la sous-unité B1b.
- Utiliser ces outils pour confirmer le mécanisme de dissociation de l'hétérodimère B1b/B2 par la protéine 14-3-3ζ et ses conséquences fonctionnelles *in vitro* et *in vivo*.

2) L'absence de 14-3-3ζ dans les terminaisons afférentes, ainsi que la diffusion restreinte des siRNA anti-14-3-3ζ confinés à la moelle épinière, indiquent que la dé-dimérisation ne se produit pas dans les compartiments pré-synaptiques, mais plutôt dans des compartiments post-synaptiques, où B1b (Vigot et al. 2006) et 14-3-3ζ (Rajan et al. 2002) ont été décrits.

Question : Existe-t-il aussi des mécanismes de régulation du récepteur $GABA_B$ dans les compartiments pré-synaptiques, c'est-à dire sur l'hétérodimère B1a/B2, en conditions douloureuses? Nous avons considéré la fibuline-2, protéine de la matrice extracellulaire, qui interagit avec les domaines « Sushis » exprimés spécifiquement en N-terminal de la sous-unité B1a (Blein et al. 2004).

Objectifs spécifiques :

- Etudier le rôle de la protéine fibuline-2 sur la régulation de l'activité du sous-type de récepteur B1a/B2.
- Etudier son implication dans la physiopathologie des douleurs neuropathiques.

3) Les mécanismes précédents insistent sur une régulation de l'activation du récepteur par des protéines partenaires. L'efficacité du récepteur $GABA_B$ pourrait aussi dépendre de sa distribution subcellulaire (Lujan and Shigemoto 2006; Lujan 2007).

Question : Quelle est la mobilité et la distribution du récepteur $GABA_B$ et de ses protéines associées en conditions normales et douloureuses ?

Objectifs spécifiques :

- Etudier le rôle de la fibuline-2 sur la mobilité du récepteur par une approche dynamique (FRAP).
- Etudier les modifications de distribution du récepteur $GABA_B$ et de ses protéines associées en conditions de douleurs neuropathiques par une approche ultrastructurale.

Nous montrerons que le récepteur $GABA_B$, localisé en pré- (B1a/B2) ou en post-synaptique (B1b/B2), est associé à des protéines partenaires distinctes (fibuline-2 et 14-3-3ζ resp.) qui peuvent réguler l'efficacité du récepteur selon des mécanismes différents en conditions de neuropathie.

En effet, l'efficacité du récepteur $GABA_B$ post-synaptique est régulée au niveau structural par la protéine 14-3-3ζ qui dissocie l'hétérodimère B1b/B2. L'efficacité du récepteur $GABA_B$ pré-synaptique est quant à elle régulée par la fibuline-2 qui diminue l'activation du récepteur B1a/B2 par ses ligands. Ainsi, les deux premiers points sont présentés dans le chapitre « Données expérimentales », sous forme de deux publications respectivement soumise et en préparation. Enfin, nous montrerons que l'efficacité du récepteur $GABA_B$ peut aussi dépendre de sa localisation subcellulaire mais ce dernier point reste à approfondir. Ce troisième objectif a nécessité la mise au point de plusieurs techniques. Les données préliminaires obtenues sont présentées dans la troisième partie du chapitre « Données expérimentales ».

DONNEES EXPERIMENTALES

Contexte:

Comme nous l'avons vu précédemment, le récepteur $GABA_B$ interagit avec de nombreuses protéines partenaires (Bettler et al. 2004). Nous nous sommes intéressées à l'étude de trois de ces protéines associées : la protéine 14-3-3ζ, la fibuline-2 et CHOP. Ces trois protéines sont présentées dans le chapitre 4 de l'introduction. Dans un premier temps, il nous semblait important de savoir si l'expression de ces gènes était modifiée en conditions de douleurs neuropathiques, suggérant ainsi un rôle possible dans les mécanismes de sensibilisation douloureuse.

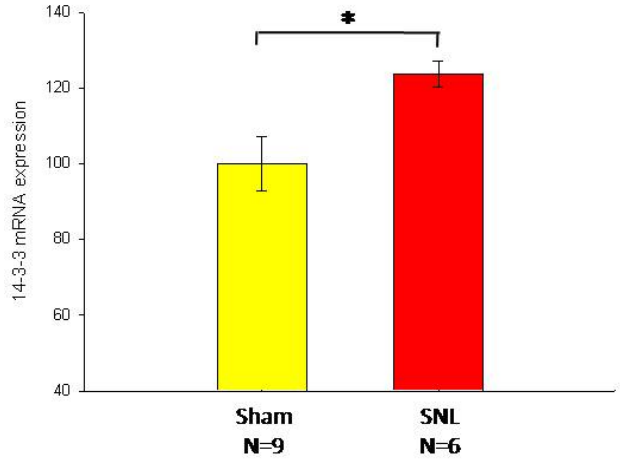
1) La première partie de notre travail s'intéresse à la régulation de l'activation du récepteur $GABA_B$ par la protéine 14-3-3ζ. En effet, il avait été montré par S. Laffray que l'expression de ce gène était surexprimée de 28% dans notre modèle de neuropathie. J'ai également confirmé ces résultats par RT-PCR quantitative qui montre une augmentation de 24% de la variation du taux d'ARNm de 14-3-3ζ dans la corne dorsale de moelle épinière lombaire de rats neuropathiques, du coté ipsilatéral à la lésion **(Fig.1A).**

2) L'étude de la fibuline-2 sur l'activation du récepteur $GABA_B$ nous est apparue elle aussi particulièrement intéressante car le taux d'ARNm est lui aussi surexprimé en conditions de douleurs neuropathiques. Son augmentation atteint 41% comparé aux rats Sham **(Fig.1B).**

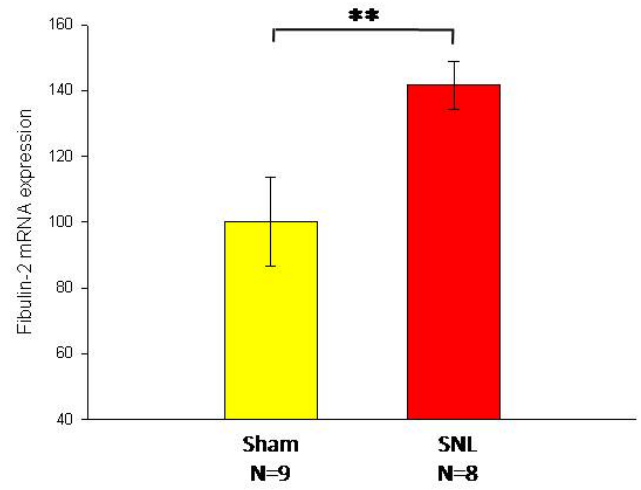
3) Au contraire, dans notre modèle de douleur neuropathique, nous n'avons pas observé de variation d'expression du gène CHOP **(Fig.1C).** Nous avons donc considéré que cette protéine ne représentait pas un bon candidat pour expliquer le dysfonctionnement du récepteur $GABA_B$ en conditions de douleurs neuropathiques.

Les résultats concernant la protéine 14-3-3ζ sont présentés dans la publication I, ceux de la fibuline-2 sont présentés dans la publication II et dans la partie III des résultats. Dans chaque cas, nous aborderons d'abord les mécanismes cellulaires des interactions entre les protéines partenaires et le récepteur $GABA_B$. Puis, nous préciserons les conséquences de ces interactions sur le comportement douloureux *in vivo*.

A.



B.



C.

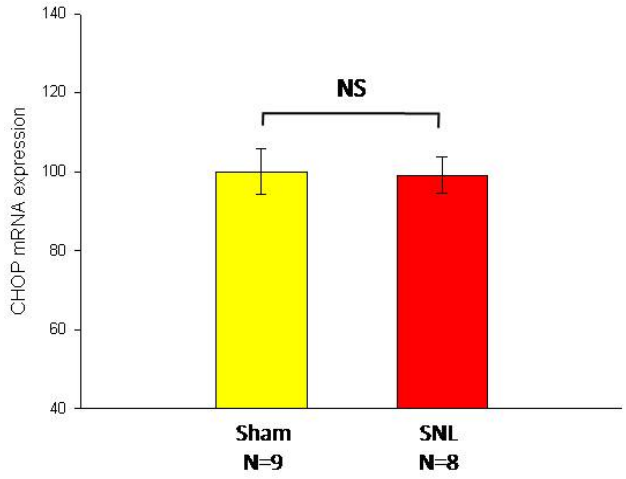


Figure 1 : Analyse par RT-PCR quantitative de la variation d'expression des gènes **(A)** 14-3-3ζ; **(B)** fibuline-2 et **(C)** CHOP dans la corne dorsale de moelle épinière lombaire de rats contrôles (Sham) et neuropathiques (SNL). Les données sont exprimées en pourcentage du Sham ± sem. Le taux d'ARNm de 14-3-3ζ et de la fibuline-2 est augmenté dans la corne dorsale de rats SNL du coté ipsilatéral à la lésion. Aucune variation d'expression n'est observée pour le gène CHOP. * :$p<0,05$; ** :$p<0,01$.

PUBLICATION I

PRESENTATION

Dans cette étude, nous avons montré que la protéine 14-3-3ζ, en se liant à la sous-unité $GABA_{B1b}$ (Couve et al. 2001), entraîne une dissociation de l'hétérodimère $GABA_{B1b}/GABA_{B2}$. Il s'ensuit une diminution de la signalisation GABAergique. Dans la corne dorsale de la moelle épinière de rats neuropathiques, cette protéine 14-3-3ζ est surexprimée contribuant ainsi aux processus de désinhibition et à la sensibilisation douloureuse.

Mon travail a consisté à poursuivre ce vaste projet de recherche initié par Sophie Laffray sous la direction de Marc Landry et à valider des outils pour cibler spécifiquement l'interaction B1b/14-3-3ζ. Pour cela, nous avons développé et testé une approche de « down-régulation fonctionnelle » en utilisant des peptides de compétition. La conception et la synthèse de ces peptides a été faite en collaboration avec le laboratoire d'Ulo Langel (Department of Neurochemistry, Stockholm University, Sweden) **(Annexe 2).** La séquence de ces peptides est spécifique du site d'interaction de 14-3-3ζ (mais pas de $GABA_{B2}$) sur $GABA_{B1b}$. Ces séquences, nommées B1(919-927) et B1(922-930) diffèrent seulement par trois acides aminés. Ces séquences dites natives ont aussi été modifiées pour faciliter leur internalisation. Elles sont soit couplées à des acides aminés chargés positivement (RRK ou RRKR), soit couplées à un peptide de type « cell-penetrating peptide » (CPP), connu pour sa capacité à traverser les membranes, et appelé pVEC (El-Andaloussi et al. 2005; Pooga et al. 2005). Le pVEC est un peptide de 18 acides aminés dérivé d'une molécule d'adhésion cellulaire, la cadhérine endothéliale vasculaire. Nous disposons d'un peptide contrôle positif (pVEC seul, capable de pénétrer dans les cellules) et d'un contrôle négatif (Dextran, incapable de pénétrer dans les cellules). Enfin, ces différents peptides sont couplés ou non à un fluorophore (fluorescéine) (cf tableau 01 dans le chapitre « Matériel et Méthodes »).

Il a fallu dans un premier temps tester *in vitro* et *in vivo* la pertinence de ces différents peptides. Nous avons dans un premier temps comparé leur internalisation cellulaire, en faisant varier la concentration (0,1µM, 1µM ou 5µM) et la durée d'incubation (1hr ou 2hr). Afin de connaître le mécanisme d'internalisation des peptides, nous les avons incubés à deux températures différentes (4°C ou 37°C). En effet, l'absence d'internalisation cellulaire à basse température indiquera un mécanisme qui est dépendant d'une voie d'endocytose classique. Nous avons de plus utilisé un inhibiteur de l'endocytose qui est la Wortaninn. Enfin, nous avons testé leur cytotoxicité sur des cultures de cellules neuronales (test LDH).

Dans un deuxième temps, nous avons voulu nous assurer que ces peptides ciblent l'interaction B1b/14-3-3ζ tout en laissant la protéine 14-3-3ζ disponible pour lier ses nombreux autres partenaires tels que Raf (Pozuelo Rubio et al. 2004). Nous avons réalisé pour cela des expériences de co-immunoprécipitation. Puis, nous avons ensuite analysé les conséquences de cette interaction peptide/14-3-3ζ sur l'état dimérique du récepteur $GABA_B$ par des expériences de FRET/FLIM.

Finalement, nous avons testé l'efficacité de ces peptides *in vivo*, en réalisant des injections intrathécales. Nous avons évalué l'effet antinociceptif du baclofène suite à ces injections, grâce à des tests comportementaux de Von Frey.

Nous montrons que de tels peptides de compétition représentent un moyen efficace d'augmenter le contrôle inhibiteur GABAergique $GABA_B$ en condition de sensibilisation douloureuse.

D'autre part, mon travail a été d'utiliser ces outils pour confirmer et préciser le mécanisme de dissociation de l'hétérodimère B1b/B2 par la protéine 14-3-3ζ. Ainsi, nous nous sommes intéressés aux sites d'action de la protéine 14-3-3ζ au sein du réseau nociceptif spinal. L'ensemble de cette étude montre l'effet de 14-3-3ζ sur l'hétérodimère B1b/B2 principalement localisé dans des compartiments post-synaptique. Nous voulions donc savoir si cette protéine pouvait agir aussi sur l'hétérodimère B1a/B2 localisé quant à lui préférentiellement en pré-synaptique, en particulier dans les terminaisons des afférences primaires. Nous avons pour cela réalisé des immunohistochimies de 14-3-3ζ avec différents marqueurs pré-synaptiques.

Finalement, nous voulions préciser la localisation des effets de 14-3-3ζ sur le récepteur $GABA_B$ au niveau subcellulaire. Nous avons mesuré les effets de 14-3-3ζ sur l'efficacité de FRET entre les deux sous-unités du $GABA_B$ dans deux régions distinctes, correspondant au cytosol et à la membrane plasmique. Pour confirmer nos résultats, nous avons aussi réalisé des expériences de FRET à la membrane plasmique, sur des hétérodimères déjà insérés à la membrane avant la surexpression de 14-3-3ζ. Pour cela, nous avons réalisé des transfections séquentielles et utilisé la toxine Botulinique de type C (Botox), capable de bloquer la fusion des vésicules sécrétoires et par conséquent d'empêcher l'insertion d'hétérodimères nouvellement synthétisés. Nous nous sommes assuré que la Botox est bien transfectée avec les deux sous-unités du récepteur en observant la disparition de la syntaxine (immunohistochimie), une cible de la Botox.

Nous montrons ainsi que l'interaction B1/14-3-3ζ a lieu principalement dans les compartiments post-synaptiques des neurones de la corne dorsale en condition de neuropathie et que 14-3-3ζ dissocie des hétérodimères $GABA_B$ déjà préformés et insérés à la membrane plasmique.

De-dimerization of GABAB receptor: a novel mechanism of disinhibition triggered by up-regulation of endogenous 14-3-3ζ

Sophie Laffray[1,2], Rabia Bouali-Benazzouz[1,2,*], Marie-Amélie Papon[1,2,*], Alexandre Favereaux[1,2], Yang Jiang[3], Tina Holm[3], Corentin Spriet[4], Pascal Desbarats[5], Pascal Fossat[1,2], Yves Le Feuvre[1,2], Marion Decossas[6], Laurent Héliot[4], Ulo Langel[3], Frédéric Nagy[1,2], Marc Landry[1,2]

[1] INSERM U862, 33 077 Bordeaux, France
[2] Bordeaux University, 33 076 Bordeaux, France
[3] Department of Neurochemistry, Stockholm University, Stockholm, Sweden
[4] Laboratoire d'Imagerie Cellulaire Fonctionnelle, Institut de Recherche Interdisciplinaire, 59 021 Lille, France
[5] LaBRi, CNRS UMR 5800, Bordeaux University, 33 405 Bordeaux, France
[6] Bordeaux Imaging Center, Bordeaux University, 33 076 Bordeaux, France,

* : equal contribution

Corresponding author: Pr. Marc Landry, email : marc.landry@u-bordeaux2.fr; Phone/Fax : +33 5 57 57 40 50/51

Key words: 14-3-3ζ, cell-penetrating peptide, disinhibition, G-protein coupled receptor, neuropathic pain, oligomer, spinal cord.

SUMMARY

In the central nervous system, the inhibitory GABAB receptor is the archetype of heterodimeric G protein-coupled receptors (GPCRs). The physiological regulation of GPCR oligomerization remains largely unknown. We propose a novel mechanism to inhibit GPCR activity through de-dimerization. We show here that 14-3-3ζ, a GABAB1-binding protein, dissociates the GABAB heterodimer, resulting in the impairment of GABAB signaling to Kir channels in spinal neurons. In the dorsal spinal cord of neuropathic rats, 14-3-3ζ is overexpressed and weakens GABAB inhibition. Using anti-14-3-3ζ siRNA or competing peptides disrupts 14-3-3ζ/GABAB1 interaction and restores functional heterodimers in the dorsal horn. Importantly, both strategies greatly enhance the antinociceptive effect of intrathecal Baclofen in neuropathic rats. Taken together, our data provide the first example of endogenous regulation of a GPCR oligomeric state and demonstrate its functional impact on pathophysiological processes, especially pain sensitization.

G protein-coupled receptors (GPCRs) modulate a wide range of physiological processes and new drug candidates are continually being developed for selective GPCRs [1, 2]. Biochemical and biophysical evidence indicate that a large variety of GPCRs exist as dimers or higher order oligomers [3, 4]. Oligomerization has physiological importance and the question of the dynamic regulation of oligomeric states is central in understanding receptor function [5]. Very recently, the implication of GPCR oligomers has been highlighted in pathophysiological conditions such as psychosis [6].

In the central nervous system, the GABAB receptor is archetypical of dimeric GPCRs. Functional GABAB receptors are expressed as obligate heterodimers of the two subunits GABAB1 (B1) and GABAB2 (B2) [7, 8]. Since GABAB-mediated inhibition is an essential control of neuronal activity throughout the central nervous system [9], altered dimerization of GABAB receptors could have pathophysiological implications.

In this context, the present study demonstrates a novel mechanism of GABAB inactivation based on de-dimerization by partner proteins, and we provide evidence for its involvement in pain sensitization. We show that 14-3-3ζ, interacting with B1 *in vitro* [10], de-dimerizes the GABAB receptor, and impairs GABAB signaling.

We further show the functional impact of this mechanism on pain sensitization in the dorsal horn of the spinal cord. Although the GABAB agonist Baclofen has antinociceptive properties [11-13], its effectiveness is limited in clinics, even after intrathecal injection [14]. In rat pain models, Baclofen effects are likely to be only partial [15-17]. Limited effects of Baclofen do not rely on classical desensitization through ligand-induced endocytosis [18-20]. In contrast, we demonstrate that 14-3-3ζ overexpression in the dorsal horn of neuropathic rats impairs GABAB signaling *in vivo*. In chronic pain conditions, we improved the efficiency of GABAB-mediated inhibition either by knocking-down the protein expression with *in vivo* application of anti-14-3-3ζ siRNA, or by preventing B1/14-3-3ζ interaction with injection of competing peptides.

Finally, our demonstration that endogenous partner proteins regulate receptor oligomeric states highlights a novel mechanism for the control of GPCR activity, and provides the groundwork for further studies of pathophysiological regulations.

RESULTS

1. B1 and 14-3-3ζ subunit colocalize, and presumably interact in neurons

We first investigated the spatial distribution of 14-3-3ζ and GABAB subunits. The B1 subunit exists as either of the two splice variants, B1a and B1b. In the present study, we

focused on the B1b variant and we expressed recombinant Flag-14-3-3ζ, myc-B1b and HA-B2 subunits in spinal cultured neurons.

When B1b and B2 were co-expressed, both immunostaining were entirely overlapping (Fig. 1A, a to c). In contrast, the expression of 14-3-3ζ induced the loss of B2 staining in subcellular domains where 14-3-3ζ was expressed (Fig. 1B, a to d). The colocalization rate between B1b and B2 decreased from 58% ± 4 in double transfected cells to 17% ± 3.1 in triple transfected cells (Fig. 1C; $p<0.01$). The quantification also showed that 14-3-3ζ was preferentially colocalized with B1b, rather than with B2 (Fig. 1C; $p<0.05$).

Next, we addressed the more fundamental question of whether these colocalized proteins belong to the same complex. In this case, the intensity of both labeling should vary in synchrony [21]. Therefore, we developed a method to analyze in parallel the colocalization and correlation of staining intensities (see Supplemental methods).

In double transfected cells, variations in labeling intensities for B1b and B2 appeared strongly correlated as expected for heterodimers (Fig. 1D; +0.64). In triple transfected cells, only labeling intensities for B1b and 14-3-3ζ were positively correlated indicating that they belong to the same complex (Fig. 1D; +0.46). In contrast, B1b and B2 staining intensities varied randomly, although the two subunits remained partially colocalized (Fig. 1D; -0.13). B2 and 14-3-3ζ staining tended to be mutually exclusive (Fig. 1D; -0.24).

In summary, when 14-3-3ζ was overexpressed in neurons, the colocalization and correlation between B1b and B2 significantly decreased whereas correlation between B1b and 14-3-3ζ was positive. These results prompted us to consider the physical interaction between B1 and 14-3-3ζ, and the possible dissociation of the GABAB heterodimer by 14-3-3ζ.

2. B1b but not B2 subunit interacts with 14-3-3ζ

To investigate the physical interaction between 14-3-3ζ and either GABAB subunits in cells, we used a double approach based on biochemical (co-immunoprecipitation, IP) and biophysical (two-photon fluorescence lifetime imaging measurement, 2P-FLIM) methods.

First, myc-B1b or HA-B2 was transfected in COS-7 cells together with Flag-14-3-3ζ. We found that 14-3-3ζ partly co-precipitated with B1b, but not with B2 (Fig. 1E, IP lane). Next, we investigated the B1 binding sequence to 14-3-3ζ. For this purpose, we chose to mutate the putative 14-3-3ζ/B1 binding motif that comprises a RSR signal [22] by changing it into an ASA sequence [23]. GFP-tagged wild-type B1b or $B1_{ASA}$ mutant subunit was co-transfected in COS cells together with Flag-14-3-3ζ. The very faint band corresponding to 14-3-3ζ co-immunoprecipitation with $B1_{ASA}$ (Fig. 1F) indicated that the RSR sequence was crucial for B1 binding to 14-3-3ζ .

To ensure the interaction between GABAB subunits and 14-3-3ζ in neuronal cells, we calculated the FRET efficiency on double transfected cells. FRET interaction of mCherry-14-3-3ζ with GFP-B1b was higher than with GFP-B2 (Fig. 1G). This interaction is abolished with the mutant $B1_{ASA}$ subunit.

By using complementary approaches, we thus demonstrated that B1b, but not B2, interacted with 14-3-3ζ through its RSR domain. This interaction occured preferentially at the plasma membrane after proper targeting of the GABAB heterodimer (Supplemental results, §1, Fig. S1A1, A2, B).

3. siRNA and competing peptides preclude interaction between GABAB1b and 14-3-3ζ

Next, we validated tools to inhibit the interaction between B1 and 14-3-3ζ. For this purpose, we used anti-14-3-3ζ siRNA, and we developed short peptidergic analogues of the B1 C-terminus.

Efficiency of siRNA to inhibit 14-3-3ζ expression was assessed with qRT-PCR and immunohistochemistry (Supplemental results, §2, Fig. S2).

Two sequences of competing peptides were designed and modified to facilitate their cellular uptake (Fig. S3). Conjugating either of the two competing peptide native sequences to pVEC, a well-established cell penetrating peptide [24], dramatically increased internalization of the peptides (Supplemental results, §3). In comparison, other modifications, e.g. adding positively charged amino-acid at peptide N-terminus, were less efficient (Fig. S4A and B, pVEC *vs* RRKR). In addition, the cellular uptake mechanism was shown to be independent of classical, energy-dependent endocytotic processes (Fig. S4B and C). Finally, we showed with lactate dehydrogenase assay, that neither pVEC, nor the two conjugates exhibited cytotoxicity (Fig. S4D).

In contrast to siRNA, this peptide strategy has the advantage to target the 14-3-3ζ interaction site with B1 while 14-3-3ζ proteins remain available to bind other interacting partners such as the small GTPase Raf [25]. Therefore, we tested the competing peptides for their ability to prevent 14-3-3ζ binding to B1b, but not to other partners, as exemplified in Fig. S4E for Raf. After peptide incubation in transfected cells, co-immunoprecipitation between B1b and 14-3-3ζ was abolished (Fig. S4E, upper right panel). However, in contrast to B1b, peptide incubation did not hamper Raf binding to 14-3-3ζ (Fig. S4E, lower right panel), thus indicating (i) differences in the binding motif to B1b and Raf, and (ii) specificity of the peptides to block selectively 14-3-3ζ/B1 binding [22].

4. The GABAB heterodimer is dissociated by 14-3-3ζ

Once siRNA and competing peptides validated, we investigated the role of 14-3-3ζ/B1 interaction on GABAB dimerization with IP on COS cells and 2P-FLIM on neurons.

COS cells were transfected with myc-B1b and HA-B2, with or without Flag-14-3-3ζ (Fig. 2A). As expected, we found co-immunoprecipitation of B2 and B1b in the absence of 14-3-3ζ (left panel). In contrast, when 14-3-3ζ was also expressed, B2 did not co-precipitate with B1b (right panel), and was detected in the supernatant ("S" lane) only at low levels.

Since the ASA mutation does not impede GABAB heterodimerization [23] but inhibits the interaction between B1 and 14-3-3ζ (Fig. 1E), we used the $B1_{ASA}$ mutant as a negative control of 14-3-3ζ-induced effects (Fig. 2B). We showed that B2 remained associated to $B1_{ASA}$ in the presence of 14-3-3ζ (right panel), indicating that the heterodimer was not disrupted when 14-3-3 protein was unable to bind a mutant B1 subunit.

In neuronal cultures, we calculated percentages of FRET efficiency between GFP-B1b and t-dimer DsRed-B2 (Fig. 2C). The co-expression of B1b and B2 triggers FRET interactions with a mean efficiency of around 20%, showing their association in a heterodimer (Fig. 2C, "B1b/B2"). Expression of 14-3-3ζ induced a decrease in FRET efficiency by more than 50% (Fig. 3C, "B1b/B2/14-3-3ζ" *vs* "B1b/B2"; $p < 0.05$). This dissociating effect was restricted to the plasma membrane and did not occur in the cytosol (Supplemental results, §3, Fig. S1C, D1, D2).

To further ensure the specificity of 14-3-3ζ-induced dissociation of the heterodimer, we incubated triple transfected cells with siRNA (Fig. 2C, "B1b/B2/14-3-3ζ/siRNA"). FRET efficiency was not significantly different from double transfected cells ("B1b/B2"), indicating that 14-3-3ζ effects were suppressed. In contrast, mismatch RNA did not modify 14-3-3ζ-induced inhibition of B1b/B2 interaction (Fig. 2C, "B1b/B2/14-3-3ζ/mmRNA").

We next investigated the role of competing peptides to inhibit 14-3-3ζ-induced changes in GABAB dimeric state with 2P-FLIM. As already shown, co-transfection of 14-3-3ζ induced a significant decrease in FRET interactions between B1b and B2 (Fig. 2D; "B1b/B2/14-3-3ζ" *vs* "B1b/B2"; $p < 0.01$). We found that incubation of triple transfected neurons with pVEC-B1 (922-930) restored FRET efficiency similar to that observed in double transfected cells (Fig. 2D; "B1b/B2/14-3-3ζ" *vs* "+ pVEC-B1 (922-930)"; $p<0.05$). After pVEC-B1 (919-927) peptide incubation, FRET efficiency had a tendency to increase but the changes were not significant.

Altogether, biochemical and biophysical approaches demonstrated that 14-3-3ζ dissociates the GABAB heterodimer. This structural modification can be reverted by disrupting B1/14-3-3ζ interaction by the mean of siRNA or competing peptides.

5. GABAB signaling to kir channels is impaired by 14-3-3ζ

Next, we investigated functional implications of 14-3-3ζ-mediated dissociation of the GABAB heterodimer. We first recorded currents induced by GABAB activation in cultures of spinal neurons. Membrane currents induced by application of Baclofen were analyzed using a voltage ramp and a subtraction procedure (Fig. 2E1, S5A). Superfusion of Baclofen (25 µM) activated an outward current at membrane potentials near the resting potential (Fig. 2E1). This current became inward around the K^+ equilibrium potential (-95.8 mV) (Fig. S5A, red trace, and Fig. 2E1; mean reversal potential = -96.32 ± 1.13 mV). The Baclofen-induced current from -40 to -130 mV was 38.7± 1.5% of the total control current (Fig. 2G, black bar). To identify the K^+ current activated by Baclofen, the chord conductance was measured at two different potentials that were equidistant from E_{rev}. The majority of spinal neurons (11 out of 14 cells tested) presented a strong inward rectification with a membrane current significantly higher for the most negative potential (Fig. 2E2). The addition of low concentrations of Cs^+, selectively blocked the inward component of the Baclofen-induced current (Fig. S5B, 2F1, grey traces; Fig. 2F2). This voltage-dependent blockade of the Baclofen effect is characteristic of Kir currents [26], which are typical post-synaptic targets of the GABAB receptor [27]. The Baclofen-induced K^+ current was abolished by co-application of the selective GABAB antagonist CGP55845 together with Baclofen (Fig. S5A, grey trace, Fig. 2G; light grey bar).

Next, we tested the effects of 14-3-3ζ overexpression in neurons. This caused a near-abolition of the Baclofen-induced potassium current, similar to the blockade by the antagonist CGP (Fig. 2G, dark grey bar; $p < 0.001$), without affecting the expression level of B1 and B2 (Fig. S5C).

Taken together, our *in vitro* results showed that 14-3-3ζ inhibits GABAB signaling by disrupting the functional heterodimer.

6. 14-3-3ζ expression is increased in the spinal dorsal horn of neuropathic rats

We next investigated whether changes in 14-3-3ζ expression can alter GABAB inhibition *in vivo*. Since GABAB is involved in the modulation of nociceptive transmission [9], we first studied 14-3-3ζ expression in rats with spinal nerve ligation (SNL), i.e. rats with neuropathic behavior. After *in situ* hybridization in SNL rats, a marked increase was observed

in the intensity of 14-3-3ζ mRNA labeling in the ipsilateral dorsal but not ventral horn (Fig. 3A1 and B1). Densitometry and grain counting showed that 14-3-3ζ mRNA radioactivity levels increased only in the ipsilateral dorsal, but not ventral, horn (Fig. 3A2 and B2). 14-3-3ζ upregulation in rats was confirmed with qRT-PCR. Upregulation was reversed below control levels after anti-14-3-3ζ siRNA injections (Fig. 3C). qRT-PCR (Fig. S6A) and *in situ* hybridization (Fig. S6B and C) showed that 14-3-3ζ mRNA is not overexpressed in dorsal root ganglia (Supplemental results, §4). Expression of 14-3-3ζ protein was examined by Western Blotting in total extracts of ipsilateral lumbar spinal cord. The quantification showed an increase of protein level in the ipsilateral spinal cord of SNL animals (Fig. 3D1 and D2). Overexpression was specific to the zeta isoform of the 14-3-3 family since the level of 14-3-3η mRNA, the other isoform possibly interacting with B1 [10], rather decreased in neuropathic rats, making its involvement in GABAB de-dimerization very unlikely (Supplemental results, §4, Fig. S7B1). Moreover, overexpression of 14-3-3η in cultures induced no de-dimerization of the GABAB heterodimer (Fig. S7B3).

Taken together, our results showed that, in neuropathic pain conditions, 14-3-3ζ was specifically overexpressed in dorsal horn neurons.

7. Endogenous GABAB subunits and 14-3-3ζ are co-distributed in spinal neurons

GABAB subunits and 14-3-3ζ colocalize in cell bodies of the spinal cord (Supplemental results §5, Fig. S8A). In contrast, 14-3-3ζ was not found in terminals arising from primary afferents or from local interneurons (Fig. S9). The co-detection of GABAB subunits with light microscopy showed the loss of B1/B2 association in neuropathic rats with control (iFect) injection (Fig. 4). B2 labeling appeared restricted to discrete domains of the plasma membrane whereas B1 showed a wider distribution at the plasma membrane (Fig. 4Af). It further demonstrated that *in vivo* anti-14-3-3ζ siRNA applications were able to restore colocalization in spinal neurons (Fig. 4Ai and B).

In naive and sham animals, electron microscopy immunogold confirmed tight association between B2 and B1b, both at the plasma membrane and in endoplasmic-containing domains (Fig. 5A, a and d). Only few colocalizations between B1b and 14-3-3ζ were observed, mainly at the cell surface (Fig. 5Ad). In SNL rats, the association between B2 and B1b was less frequent and mainly confined to the endoplasmic reticulum (Fig. 5Ac). In contrast, colocalization between B1b and 14-3-3ζ was repeatedly observed at the plasma membrane (Fig. 5A, c and e), although also seen within the cytoplasm (Fig. 5Ae). Interestingly, the triple association of B1b, B2 and 14-3-3ζ was observed at the cell surface (Fig. 5Ab).

The distance between B1b and B2 subunits increased significantly in SNL rats (Fig. 5B; $p<0.05$ SNL *vs* sham), indicating a separation between the two subunits. Conversely, the distance between B1 and 14-3-3ζ decreased in neuropathic conditions (Fig. 5B; $p<0.05$ SNL *vs* sham). No significant changes were observed in the relative distribution of B2 and 14-3-3ζ (Fig. 5B). No differences were noticed between naive and sham animals for any association studied.

This morphological analysis showed that the close association between the GABAB subunits was disrupted in neuropathic rats whereas colocalization between endogenous B1b and 14-3-3ζ was strengthened. Furthermore, our data demonstrate the causal role of 14-3-3ζ in subunit dissociation under pain conditions.

8. 14-3-3ζ overexpression impairs GABAB signaling *in vivo*.

To demonstrate that 14-3-3ζ overexpression alters GABAB signaling *in vivo*, we performed GTP binding studies on tissue sections (Fig. 6A and B, examples of autoradiograms and quantitative densitometry, respectively).

In the sham group, basal [^{35}S]GTPγS binding increased both in the contra- and ipsilateral dorsal horn after Baclofen application (131 ± 3% and 128 ± 2%, respectively). In the SNL group, Baclofen-induced increase was weaker in the ipsilateral dorsal horn (110 ± 3%; $p < 0.01$ *vs* SNL contralateral dorsal horn). In the group of SNL rats intrathecally administered with anti-14-3-3ζ siRNA, Baclofen-induced increase of radioactivity was restored and was similar both in the contra- (130 ± 3%) and ipsilateral (131 ± 5%) dorsal horn.

9. *In vivo* injections of 14-3-3ζ siRNAs or competing peptides partially inhibit chronic pain states.

Finally, to assess the behavioral consequences of 14-3-3ζ overexpression on GABAB inhibition in chronic pain conditions, we tested the effect of disrupting 14-3-3ζ/GABAB interaction on mechanical allodynia. For this purpose, we performed genetic or functional knock-down of 14-3-3ζ by using the siRNA-based strategy or competing peptide application, respectively. Two sets of experiments were carried out with intrathecal injections in sham or SNL rats: (i) injections of anti-14-3-3ζ siRNAs (siRNA) or mismatch RNAs (mmRNA), and (ii) injections of pVEC-B1 (922-930) or pVEC alone. After injections, the withdrawal threshold was assessed with the von Frey test and compared to that measured at Day 12 (siRNA) or 14 after surgery (competing peptides). Detailed procedures are presented in supplemental Fig. S10.

Surgery resulted in a decrease in paw withdrawal threshold of around 60%. The injection of vehicle (iFect or saline solution) after surgery did not further change the mechanical threshold of neuropathic rats (Fig. 6C and E).

The injection of Baclofen at day 12 induced an increase in mechanical threshold indicating GABAB-mediated antinociceptive effects (Fig. 6C, "Baclofen, day 12" *vs* "iFect, day 12"; $p<0.01$). Treatments for three days either with mmRNA or siRNA ("RNA, day 15") did not modify paw withdrawal thresholds which appeared similar to that observed in neuropathic rats before treatment. In contrast, the mean threshold for SNL animals after Baclofen application was significantly increased upon siRNA treatment ("RNA + Baclofen, day 15" *vs* "Baclofen, day 12", $p<0.01$). Changes in paw withdrawal threshold were not observed in animals injected with mmRNA.

An additional experiment was carried out to measure possible changes in spontaneous locomotor activity. The injection of anti-14-3-3ζ siRNA had no apparent side effects since it did not induce sedation in neuropathic animals (Fig. S11).

Similarly, the consequences of 14-3-3ζ/GABAB interactions were assessed with intrathecal injections of the competing peptide conjugate pVEC-B1 (922-930) *in vivo*. Baclofen administration in neuropathic rats had antinociceptive effects comparable to the other set of experiment (Fig. 6E; "Baclofen, day 14" *vs* "Vehicle, day 14", $p<0.001$). In contrast to siRNA injection, pVEC-B1 (922-930) administration in SNL animals induced *per se* a significant increase of the mean threshold as compared to neuropathic control conditions, i.e. vehicle injection (Fig. 6E, "Peptide, day 15" *vs* "Vehicle, day 14", $p<0.001$). Peptide injection resulted in an effect similar to that of Baclofen. Finally, intrathecal injections of pVEC-B1 (922-930) peptide together with Baclofen caused a significant increase of paw withdrawal threshold as compared to the effects of Baclofen or peptide alone (Fig. 6E, "Peptide + Baclofen, day 15" *vs* "Baclofen, day 14"; $p<0.05$). Injection of pVEC alone did not modify mechanical threshold (Fig. 6E).

Our results demonstrated that disrupting 14-3-3ζ/GABAB interactions *in vivo*, with anti-14-3-3ζ siRNA or with competing peptide, specifically enhanced the antinociceptive effect of Baclofen on mechanical allodynia in SNL animals but had no effect in sham animals (Fig. 6D and F). In addition, the present data showed that our competing peptides efficiently counteracted protein-protein interaction *in vivo*, and modified pain behavior.

DISCUSSION

To date, experimental data show that the assembly of GPCR oligomers is regulated by receptor targeting [28, 29] or ligand binding [30]. Our data demonstrate a novel, alternative mechanism by which the obligate heterodimeric state of GABAB receptors is disrupted by 14-3-3ζ protein, leading to reduction in receptor efficacy. Importantly, our study provides the first example of an endogenous process that dissociates mature GPCR oligomers. This dissociation results in a partial loss of GABAB control in the spinal dorsal horn of neuropathic rats, thus contributing to disinhibition in pathological pain processing.

14-3-3ζ impairs GABAB signaling through receptor de-dimerization

In agreement with previous reports [10, 23], 14-3-3ζ is shown to bind the B1 but not B2 subunit. We have designed competing peptides that specifically target the interaction site with B1 and do not prevent 14-3-3 proteins to bind most of their other partners, as exemplified for Raf. This shows that the interaction between B1 coiled-coil domain and 14-3-3ζ is distinct from the well-characterized interaction mediated by the two canonical mode I (RSXpSXP) and mode II (RXXXpSXP) binding motifs. Instead, B1/14-3-3ζ interaction appears characteristic of the mode III binding [31].

14-3-3ζ binding to GPCRs alters their activity through different mechanisms. For instance, 14-3-3ζ directly interacts with the α2-adrenergic receptor, and influences G protein coupling efficiency [32]. With regards to oligomerization, it is generally assumed that 14-3-3 proteins promote the dimerization of ion channels and their forward trafficking to the plasma membrane [33, 34]. By analogy, it has been postulated that 14-3-3 proteins may similarly control GABAB clustering [22, 35], or GABAB dimerization and trafficking out of the endoplasmic reticulum [34]. In fact, the latter hypothesis has been ruled out since 14-3-3 interaction with B1 is not necessary at the endoplasmic level for membrane targeting of the GABAB receptor [23]. By using complementary approaches, we show that, on the contrary, 14-3-3ζ does dissociate the GABAB heterodimer at the plasma membrane. The loss of B2 subunit at the membrane where 14-3-3/B1 complexes are formed is consistent with the decreased stability of B2 alone at the membrane in cultured cells [36].

Thus, 14-3-3ζ does not regulate the formation of the dimer but rather interferes with an already constituted heterodimer at the membrane. Our study highlights that 14-3-3 proteins cannot simply be viewed as scaffolding proteins in the assembly of ion channels, but also as regulatory proteins able to dissociate GPCR oligomers.

Since the heterodimerization of B1 and B2 subunits is essential to the formation of a functional receptor [29], de-dimerization is expected to cause a loss in GABAB signaling.

Indeed, we show here that GABAB signaling to the G-protein cascade, and coupling to intracellular effectors such as Kir channels, were altered by 14-3-3ζ overexpression. Some discrepancies exist with other recent data showing no change in GABAB-induced activation of G proteins in neuropathic rats [37]. However, the authors used tissue homogenates that could not discriminate between spinal laminae whereas we detected impairment of GABAB signalling in superficial laminae of tissue sections.

Taken together, our results indicate a new mechanism by which partner proteins can regulate the activity of oligomeric GPCR.

De-dimerization of the GABAB receptor weakens the inhibitory control of pain

14-3-3 proteins are dimeric chaperone proteins constitutively expressed in the central nervous system in normal conditions [38]. De-regulation of 14-3-3 expression has a causal role in various pathologies, including diseases of the nervous system [39], although the mechanism of action often remains elusive. Actually, 14-3-3 ζ up-regulation after neuronal insult was reported to be protective by promoting cell survival [40] or regeneration [41]. Our data show that 14-3-3 ζ overexpression has also detrimental effects in neuropathic pain sensitization through its direct interaction with the GABAB heterodimer.

In the present study, the local knock-down of 14-3-3ζ restores GABAB signaling in superficial laminae and enhances the efficiency of exogenously applied Baclofen to attenuate mechanical allodynia, showing the importance *in vivo* of de-dimerization mechanisms in pathophysiological processes.

Our data indicate that 14-3-3ζ-induced dissociation of the GABAB heterodimer hampers the inhibition of pain transmission mediated by GABAB. These results are in agreement with the loss of GABAB agonist binding in the spinal cord of pain models [42]. Since there is no pain-associated decrease in GABAB subunit expression [37], nor receptor loss by endocytosis [20], the dissociation may be the principal mechanisms that limits GABAB activation in neuropathic conditions. The lack of 14-3-3ζ in nerve endings, and the restricted diffusion of anti-14-3-3ζ siRNA to the spinal cord, indicate that de-dimerization does not occur in the presynaptic, but rather in the postsynaptic compartment, where B1b [43] and 14-3-3ζ [44] have been described.

Although B1/B2 heterodimer is not fully dissociated after 14-3-3ζ overexpression, as shown here with 2P-FLIM, GABAB signaling to Kir channels is fully abolished. We conclude that below a certain threshold, heterodimeric GABAB receptors are not sufficient to drive effective intracellular signaling, and to inhibit pain sensitization. 14-3-3ζ silencing restores a level of functional GABAB heterodimers that overcomes this threshold and permits

metabotropic inhibition to reduce allodynia. However, in sham-operated animals invalidation of 14-3-3ζ did not modify mechanical sensitivity. This implies that the behavioral effects of 14-3-3ζ/GABAB interactions remain negligible in normal conditions.

We detected 14-3-3ζ up-regulation in SNL rat dorsal horn, but not in the ventral horn. Moreover, the analysis of spontaneous horizontal locomotor activity indicates that 14-3-3ζ overexpression alters specifically nociceptive transmission, without affecting motor control. These data are in line with the actual recommendations for clinical use of Baclofen. In fact, Baclofen administration is not proposed in EFNS guidelines of pharmacological treatment of neuropathic pain [45] and its general effectiveness as an analgesic is limited [13]. In contrast, intrathecal Baclofen offers one of the best options in many patients with severe spasticity refractory to medical management [46]. This action is due to Baclofen-induced pre- and post-synaptic inhibition on spinal motoneurons [13]. Taken together, these data suggest that Baclofen becomes ineffective where 14-3-3ζ is overexpressed and impairs GABAB signaling, i.e. in the dorsal but not the ventral horn.

GABAB impairment can be reverted by siRNA, or by our synthetic peptide pVEC-B1R (922-930) that competes with B1 for 14-3-3ζ binding. The injected pVEC-B1R (922-930) had anti-nociceptive properties *per se* in neuropathic conditions. This result suggests a partial recovery of the GABAB dimeric state and of the response to the endogenous release of GABA. An interesting feature of our competing peptides is their higher selectivity as compared to siRNA, since they target only mode III binding partners of the ubiquitary 14-3-3 family, among more than 300 possible partners identified so far [25].

In patients with spinal cord injury, spasticity is often combined with pain originating from both muscle spasms and central sensitization processes. In severe conditions, these patients are implanted with a pump for intrathecal delivery of Baclofen. Our data suggest that co-application of 14-3-3ζ inhibitor could enhance Baclofen effect when needed, and improve quality of life and autonomy by decreasing the neuropathic component of pain in spastic patients.

In conclusion, our results provide new insights in cell biology of GPCRs. We reveal a novel, atypical mechanism of de-dimerization to control GPCR activity based on a new, unexpected role for a well-known chaperone protein. Furthermore, they suggest new therapeutic ways to treat neuropathic pain. Together with the recent elucidation of other mechanisms involving reduced GABA release [47] or loss of GABAA inhibition [48, 49], our data support the view that disinhibition dramatically twists the excitability of spinal neurons and leads to pain sensitization [50]. Targeting this de-dimerization process may be of therapeutic interest by enhancing the action of classical pain killers.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell cultures and transfection

Dissociated rat spinal neurons, or COS-7 cells were transiently transfected with various constructs or siRNA using the procedures described in Supplemental Material and Methods.

Immunohistochemistry on spinal cell cultures

Immunodetection in cell cultures was carried out sequentially according to previously published protocols as detailed in the Supplemental Data.

Colocalization of myc-B1b with HA-B2 or Flag-14-3-3ζ, or colocalization of HA-B2 with Flag-14-3-3ζ was quantified as the percentage of colocalized area of the total labeled area in double and triple transfected cells. We also measured staining intensity correlation (see Supplemental Data). This method discriminates colocalization between interacting proteins, whose staining intensity should vary in synchrony from randomly colocalized proteins, whose overlapping might be due to the broad distribution of one protein across the cell.

qRT-PCR

Expression analysis of 14-3-3ζ, 14-3-3η, B1 and B2 mRNA was performed with the DyNAmo^{TM} SYBR Green qPCR kit (Finnzymes, Espoo, Finland). Triplicate runs were performed and Succinate dehydrogenase Complex, Subunit A (SDHA) was used as a normalizer. The relative level of expression was calculated using the comparative ($2^{\Delta\Delta CT}$) method.

Immunoprecipitation

Co-immunoprecipitation was performed after transfection in COS-7 cells as described in Supplemental Data. Total proteins, immunoprecipitated proteins, and supernatant proteins were loaded into L, IP, and S lanes, respectively. Proteins were then transferred, probed with anti-Flag, or anti-HA antibodies (1/1000), and visualized with enhanced chemiluminescence.

The density of bands was quantitated by densitometry using a Syngene machine (ChemiGenius 2XE model, Synoptics Ltd, Cambridge, UK) and Genetool analysis program (Syngene). For immunoprecipitation, immunoblots were semiquantified by normalizing the IP band density to that of the lysate band.

Competing peptides

Two different competing peptides were used, corresponding to amino acid 919-927 or 922-930 of the GABAB1 protein. Peptides sequences were used as native sequences, or modified by adding positively charged amino acids, or by coupling to the cell penetrating peptide pVEC, derived from the cell adhesion molecule vascular endothelial cadherin [24]. Competing

peptides and pVEC were synthesized with Fmoc and t-Boc methods, respectively, purified, and then conjugated (see supplemental data). For some experiments, peptides were labeled with carboxyfluorescein (see all sequences used in Fig. S4). For *in vitro* experiments, cells were treated for 1hr with 1µM peptide solution, washed and detached (COS-7 cells) or fixed (primary cultures). No differences were seen when using 5µM peptide solution (data not shown).

Peptide and conjugate uptake was studied with confocal microscopy after incubating 1 µM peptide solutions for 1 hr at 4°C and 37°C, or after inhibiting endocytosis with Wortmanin. Fluoresceinyl-peptide uptake was further quantified by fluorometry. Cytotoxicity was assessed with Lactate Dehydrogenase assay.

Spectral and lifetime correlated acquisitions

The interaction between GFP-tagged proteins and t-dimer DsRed-tagged proteins was studied using quantitative FRET (Fluorescence or Förster Resonance Energy Transfer) determination with FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Measurements) using Time Correlated-Single Photon Counting (Becker and Hickl,Berlin, Germany) as detailed in Supplemental Data.

To assess protein interactions, we calculated a relative FRET efficiency for each acquisition as: FRET Efficiency (%) = $(\tau_{Dmean} - \tau_{DA}) / \tau_{Dmean}$ x100 where τ is the time constant of the exponential fit with τ_{Dmean} being the mean lifetime of the donor fluorophore (GFP) when expressed alone and τ_{DA} being the lifetime of the donor fluorophore in the presence of the acceptor (t-dimer DsRed). Results were expressed as a mean FRET efficiency (n=31 or 21 cells in each condition) ± SEM.

Patch Clamp

Experiments were conducted as previously described [27]. Voltage-clamp recordings were performed on 8 to 10 days-aged cultured spinal neurons The following drugs were added to the normal Krebs solution and continuously superfused on the preparation: 25µM Baclofen (Sigma), 50µM CGP55845 (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France). Cs^+ was added to a modified perfusion medium. The detailed experimental set-up and data analysis procedure are described in Supplemental Data.

Animal models and behavioral tests

A total number of 136 adult male Wistar rats (250-300 g; Charles River France, St Aubin les Elbeuf, France) were used. The experiments followed the ethical guidelines of the International Association for the Study of Pain and were approved by the local ethics committee in Bordeaux (AP 1/04/2005).

Persistent neuropathic pain in rats was evoked by ligation of the right L5-L6 spinal nerve (Spinal Nerve Ligation, SNL) [51]. Mechanical response thresholds were monitored with the von Frey test as described in Supplemental Data.

Western Blotting

Briefly, tissue homogenates from lumbar spinal cord segments of sham or SNL animals were loaded on SDS-PAGE, transferred, probed with anti-14-3-3ζ (1/1000) antibody, and visualized with enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Tubulin was used as loading control.

***In situ* Hybridization**

Cryostat sections from SNL, sham-operated, and naive animals (n = 5 in each group) were hybridized with 3 different oligonucleotide probes complementary to 14-3-3ζ mRNA. The procedures for *in situ* hybridization and quantification are described in supplemental data.

Immunohistochemistry on tissue sections

Naive, sham- and SNL-operated animals were processed for immunohistochemistry with light (n = 5 in each group) and electron (n = 3 in each group) microscopy, after intra-cardiac perfusion. For electron microscopy, tissue samples from deep dorsal horn laminae were processed for post-embedding immunogold labeling (see supplemental data). The distance between gold particle pairs were measured on digitalized micrographs with Image J software. Results were expressed as the mean distance (nm) between pairs ± SEM. The detailed procedures and antibodies are described in the Supplemental Data.

GTPγS binding

The [35S]GTPγS) binding autoradiographic procedure was carried out as described in Supplemental Data. [35S]GTPγS binding was measured in transverse lumbar spinal cord sections from sham, and SNL animals, and SNL with siRNA injections (n = 5 in each condition).

***In vivo* intrathecal injections and behavioural tests**

For intrathecal injections of Baclofen, RNAs (anti-14-3-3ζ siRNA or mismatch RNA), or peptide conjugates (pVEC-B1 (922-930) or pVEC alone), sham and SNL rats were implanted with a catheter. The threshold to mechanical stimulation was monitored before and after surgery, and after the various injections. Results were expressed as percentages of changes in the threshold of neuropathic rats.

The open field method was used to evaluate spontaneous horizontal locomotor activity of sham or neuropathic rats after i-Fect or anti-14-3-3ζ siRNA injections.

The experimental schedules are presented in Fig. S10, and the detailed procedures are described in Supplemental Data.

Statistical Analysis:

Student's *t*-tests were used to compare two series of data. Kruskal-Wallis one way Analyses of Variance (ANOVAs) coupled with Dunn's post hoc comparison was used to analyse non parametric sets of data. One way or two way ANOVAs were performed for parametric data analyses, associated with Newman-Keuls tests for post-hoc comparisons. $p < 0.05$ was considered significant.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the "Conseil Régional d'Aquitaine" (#20010301213), and the "Fondation de France" (#RAF05020GGA). U. Langel is grateful to the Swedish Research Council (VR-NT and VR-Med). We are grateful to Dr. R. Tsien (Dpt of Pharmacology, UCSD, CA) and to Dr. H. Fu (Dpt of Pharmacology, Emory University, GA) for the generous gifts of the t-dimer DsRed pRSET B and Flag-14-3-3ζ/histidine-14-3-3η pcDNA3 constructs, respectively. We thank Dr. A Calver (GlaxoSmithKline Pharmaceuticals, UK) and Dr J.P. Pin (IGF, Montpellier, France) for the gift of myc-B1b and HA-B2 pcDNA3, and of $B1_{ASA}$-GFP pcDNA plasmids, respectively. We thank Dr C. Poujol and P. Legros (PICIN, Bordeaux University) for help in FRET imaging.

REFERENCES

1. Lagerstrom, M.C. & Schioth, H.B. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 339-357 (2008).
2. Panetta, R. & Greenwood, M.T. Physiological relevance of GPCR oligomerization and its impact on drug discovery. *Drug Discov Today* **13**, 1059-1066 (2008).
3. Bouvier, M. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* **2**, 274-286 (2001).
4. Szidonya, L., Cserzo, M. & Hunyady, L. Dimerization and oligomerization of G-protein-coupled receptors: debated structures with established and emerging functions. *J Endocrinol* **196**, 435-453 (2008).
5. Gurevich, V.V. & Gurevich, E.V. GPCR monomers and oligomers: it takes all kinds. *Trends Neurosci* **31**, 74-81 (2008).
6. Gonzalez-Maeso, J.*, et al.* Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature* **452**, 93-97 (2008).
7. Kaupmann, K.*, et al.* GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* **396**, 683-687 (1998).
8. Jones, K.A.*, et al.* GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* **396**, 674-679 (1998).
9. Bowery, N.G. GABAB receptor: a site of therapeutic benefit. *Curr Opin Pharmacol* **6**, 37-43 (2006).
10. Couve, A.*, et al.* Association of GABA(B) receptors and members of the 14-3-3 family of signaling proteins. *Mol Cell Neurosci* **17**, 317-328 (2001).
11. Schuler, V.*, et al.* Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B(1)). *Neuron* **31**, 47-58. (2001).
12. Malcangio, M. & Bowery, N.G. GABA and its receptors in the spinal cord. *Trends Pharmacol Sci* **17**, 457-462 (1996).
13. Bowery, N.G.*, et al.* International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma- Aminobutyric Acid(B) Receptors: Structure and Function. *Pharmacol Rev* **54**, 247-264. (2002).
14. Loubser, P.G. & Akman, N.M. Effects of intrathecal baclofen on chronic spinal cord injury pain. *J Pain Symptom Manage* **12**, 241-247 (1996).
15. Franek, M., Vaculin, S. & Rokyta, R. GABA(B) receptor agonist baclofen has non-specific antinociceptive effect in the model of peripheral neuropathy in the rat. *Physiol Res* **53**, 351-355 (2004).
16. Gwak, Y.S.*, et al.* Activation of Spinal GABA Receptors Attenuates Chronic Central Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma* **23**, 1111-1124 (2006).
17. Wang, X.L., Zhang, H.M., Chen, S.R. & Pan, H.L. Altered synaptic input and GABAB receptor function in spinal superficial dorsal horn neurons in rats with diabetic neuropathy. *J Physiol* **579**, 849-861 (2007).
18. Perroy, J., Adam, L., Qanbar, R., Chenier, S. & Bouvier, M. Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *Embo J* **22**, 3816-3824 (2003).
19. Fairfax, B.P.*, et al.* Phosphorylation and chronic agonist treatment atypically modulate GABAB receptor cell surface stability. *J Biol Chem* **279**, 12565-12573 (2004).
20. Laffray, S.*, et al.* Dissociation and trafficking of rat $GABA_B$ receptor heterodimer upon capsaicin treatment. *Eur J Neurosci* **25**, 1402-1416 (2007).
21. Li, C.Y., Song, Y.H., Higuera, E.S. & Luo, Z.D. Spinal dorsal horn calcium channel alpha2delta-1 subunit upregulation contributes to peripheral nerve injury-induced tactile allodynia. *J Neurosci* **24**, 8494-8499 (2004).
22. El Far, O. & Betz, H. G-protein-coupled receptors for neurotransmitter amino acids: C-terminal tails, crowded signalosomes. *Biochem J* **365**, 329-336 (2002).
23. Brock, C., Boudier, L., Maurel, D., Blahos, J. & Pin, J.P. Assembly-dependent Surface Targeting of the Heterodimeric GABAB Receptor Is Controlled by COPI but Not 14-3-3. *Mol Biol Cell* **16**, 5572-5578 (2005).

24. Elmquist, A., Lindgren, M., Bartfai, T. & Langel, U. VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions. *Exp Cell Res* **269**, 237-244 (2001).
25. Pozuelo Rubio, M.*, et al.* 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking. *Biochem J* **379**, 395-408 (2004).
26. Sodickson, D.L. & Bean, B.P. GABAB receptor-activated inwardly rectifying potassium current in dissociated hippocampal CA3 neurons. *J Neurosci* **16**, 6374-6385 (1996).
27. Derjean, D.*, et al.* Dynamic balance of metabotropic inputs causes dorsal horn neurons to switch functional states. *Nat Neurosci* **6**, 274-281. (2003).
28. McLatchie, L.M.*, et al.* RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* **393**, 333-339 (1998).
29. Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* **27**, 97-106 (2000).
30. Rocheville, M.*, et al.* Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J Biol Chem* **275**, 7862-7869 (2000).
31. Coblitz, B., Wu, M., Shikano, S. & Li, M. C-terminal binding: an expanded repertoire and function of 14-3-3 proteins. *FEBS Lett* **580**, 1531-1535 (2006).
32. Prezeau, L., Richman, J.G., Edwards, S.W. & Limbird, L.E. The zeta isoform of 14-3-3 proteins interacts with the third intracellular loop of different alpha2-adrenergic receptor subtypes. *J Biol Chem* **274**, 13462-13469 (1999).
33. O'Kelly, I., Butler, M.H., Zilberberg, N. & Goldstein, S.A. Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* **111**, 577-588 (2002).
34. Yuan, H., Michelsen, K. & Schwappach, B. 14-3-3 dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. *Curr Biol* **13**, 638-646 (2003).
35. Bettler, B., Kaupmann, K., Mosbacher, J. & Gassmann, M. Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev* **84**, 835-867 (2004).
36. Galvez, T.*, et al.* Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function. *Embo J* **20**, 2152-2159 (2001).
37. Engle, M.P., Gassman, M., Sykes, K.T., Bettler, B. & Hammond, D.L. Spinal nerve ligation does not alter the expression or function of GABA(B) receptors in spinal cord and dorsal root ganglia of the rat. *Neuroscience* **138**, 1277-1287 (2006).
38. Fu, H., Subramanian, R.R. & Masters, S.C. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**, 617-647 (2000).
39. Berg, D., Holzmann, C. & Riess, O. 14-3-3 proteins in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* **4**, 752-762 (2003).
40. Murphy, N.*, et al.* Depletion of 14-3-3 zeta elicits endoplasmic reticulum stress and cell death, and increases vulnerability to kainate-induced injury in mouse hippocampal cultures. *J Neurochem* **106**, 978-988 (2008).
41. Namikawa, K., Su, Q., Kiryu-Seo, S. & Kiyama, H. Enhanced expression of 14-3-3 family members in injured motoneurons. *Brain Res Mol Brain Res* **55**, 315-320 (1998).
42. Castro-Lopes, J.M., Malcangio, M., Pan, B.H. & Bowery, N.G. Complex changes of GABAA and GABAB receptor binding in the spinal cord dorsal horn following peripheral inflammation or neurectomy. *Brain Res* **679**, 289-297 (1995).
43. Vigot, R.*, et al.* Differential compartmentalization and distinct functions of GABAB receptor variants. *Neuron* **50**, 589-601 (2006).
44. Rajan, S.*, et al.* Interaction with 14-3-3 proteins promotes functional expression of the potassium channels TASK-1 and TASK-3. *J Physiol* **545**, 13-26 (2002).
45. Attal, N.*, et al.* EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. *Eur J Neurol* **13**, 1153-1169 (2006).
46. Hsieh, J.C. & Penn, R.D. Intrathecal baclofen in the treatment of adult spasticity. *Neurosurg Focus* **21**, e5 (2006).

47. Moore, K.A., *et al.* Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci* **22**, 6724-6731 (2002).
48. Coull, J.A., *et al.* BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* **438**, 1017-1021 (2005).
49. Knabl, J., *et al.* Reversal of pathological pain through specific spinal GABAA receptor subtypes. *Nature* **451**, 330-334 (2008).
50. Woolf, C.J. & Salter, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* **288**, 1765-1769 (2000).
51. Kim, S.H. & Chung, J.M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* **50**, 355-363 (1992).

FIGURE LEGENDS

Figure 1 *B1b colocalizes and interacts with 14-3-3ζ. in cell cultures.*

A. Colocalization between myc-B1b (a) and HA-B2 (b) at the plasma membrane (double arrowheads) in cultured spinal neurons. Bar: 20µm

B. Colocalization between B1b (a) and 14-3-3ζ (c) only (double arrows) in the domains lacking B2. B1 and B2 remain colocalized in the absence of 14-3-3ζ (double arrowhead) in cultured spinal neurons. Bar: 10µm

C. Colocalization in double (B1b/B2) and triple (B1b/B2/14-3-3ζ) transfected neurons.
*: $p<0.05$; **: $p<0.01$.

D. Coefficient of correlation of labeling intensity in double (B1b/B2) and triple (B1b/B2/14-3-3ζ) transfected neurons.

E. 14-3-3ζ co-immunoprecipitates with B1b, but not with B2 (left *vs* right panel) in COS-7 cells.

F. 14-3-3ζ co-immunoprecipitates with B1b, but virtually not with the mutated $B1_{ASA}$ (left *vs* right panel) in COS-7 cells.

G. FRET efficiency (mean % ± SEM, n = 31 cells) between intracellular GFP (B1b, B2 or $B1b_{ASA}$) and mCherry (14-3-3ζ) in primary neurons transfected with B1b/14-3-3ζ, B2/14-3-3ζ, or $B1_{ASA}$/14-3-3ζ. *: $p<0.05$ *vs* "C-ter B1b".

IP: co-immunoprecipitation; S: supernatant, L: lysate

Figure 2 In vitro *oveexpression of 14-3-3ζ dissociates the GABAB heterodimer and impaired GABAB signaling.*

A. In double transfected COS-7 cells, HA-B2 co-immunoprecipitates with myc-B1b (left panel). In triple transfected cells also overexpressing Flag-14-3-3ζ, the interaction between B1 and B2 subunits is abolished (right panel).

B. HA-B2 co-immunoprecipitates with $B1_{ASA}$-GFP in double and triple transfected cells

C. and **D.** FRET efficiency (mean % ± SEM, n = 31 or 21 cells) between extracellular N-ter GFP (B1b), and t-dimer DsRed (B2) in primary cultures transfected with GFP-B1b and t-dimer DsRed-B2 alone (B1b/B2), or together with Flag-14-3-3ζ (B1b/B2/14-3-3ζ). Cultures are further incubated with RNAs (**C**) or competing peptides (**D**). *: $p<0.05$.
IP lanes: co-immunoprecipitation; S lanes: supernatant. NS: non significant.

E1. Membrane currents induced by application of Baclofen in cultured spinal neurons were analyzed using a voltage ramp and a subtraction procedure **E2.** Mean Baclofen-induced currents at $E_{rev} \pm 25$ (dotted lines in **E1**) showing inward rectification ($p<0.05$, n = 14).

F1. Blockade of the inward component of the Baclofen-induced current (2) with Cs^+ (3). **F2.** Baclofen-induced current measured at E_{rev}-25 before and after Cs^+ ($p<0.05$, n = 6).

G. Baclofen-induced current during a voltage ramp in control (black bar, n = 13), in the presence of 50 µM CGP 55845 (light grey bar, $p<0.01$, n = 6), in neurons overexpressing 14-3-3ζ- (dark grey bar, $p<0.01$, n = 9), and in neurons overexpressing the DsRed vector alone (white bar, n = 8). NT cells: non transfected cells

Figure 3 *Increased expression of 14-3-3ζ in the spinal cord of neuropathic rats.*

A1. In situ hybridization to 14-3-3ζ mRNA illustrated with autoradiographic films showing an increase in ipsilateral dorsal horn of SNL rats (double arrowhead in b). Bar: 200 µm

A2. Quantification of in situ hybridization by densitometry

B1. In situ hybridization to 14-3-3ζ mRNA illustrated with micrographs from emulsion-dipped sections in dark (a-d) and bright (e-h) field. Bars: 50µm (a-d), 20µm (e-h)

B2. Quantification of in situ hybridization by grain counting.

C. qRT-PCR measurement of 14-3-3ζ mRNA

D1. Mean intensity of 14-3-3ζ immunoblot

D2. Example of 14-3-3ζ immunoblot

B to **D** : % ± SEM of the reference value set to 100%, n = 5 in each condition ; ***: $p<0.001$; **: $p<0.01$; NS = non significant. DH = Dorsal Horn, VH = Ventral Horn, Contra = Contralateral, Ipsi = Ipsilateral.

Figure 4 *Endogenous co-expression of B1 and B2 in sham and neuropathic rats*

A. Immunohistochemistry for endogenous B1 and B2 in lamina II of the dorsal horn of three groups of rat (n = 4 in each group): sham (a to c), and neuropathic with intrathecal injections of vehicle only (iFect) (d to f) or anti-14-3-3ζ siRNA (g to i).

The colocalization was very prominent in sham rats (double arrowheads, a to c). In neuropathic rats with control injection (iFect), B1 labeling (green) was often found alone at the plasma membrane of spinal neurons (double arrows, d to f). After siRNA injection in neuropathic rats, the colocalization was restored (double arrowheads, g to i).

B. Quantification of the percentage of B1 labeling colocalized with B2 in lamina I-II (n = 20 cells in each conditions).

Figure 5 *GABAB subunits and 14-3-3ζ protein are co-distributed in spinal neurons.*

A. Triple immunogold in deep dorsal horn neurons of naive (a, d) and SNL (b, c, e) rats.

a and d: Isolated B2 (arrowheads) or B2 colocalization with B1b (double arrowheads). Rare association between 14-3-3ζ and B1b at the plasma membrane (arrow).

b, c and d: Prominent association between 14-3-3ζ and B1b at the plasma membrane or in the cytoplasm (arrows). Colocalization between B2 and B1b, mainly in the cytoplasm (double arrowhead). Triple colocalization showing 14-3-3ζ between B2 and B1b (double arrows). Bar: 100nm.

B. Quantification of distances (nm) between gold particles. Mean distances ± SEM. *: $p<0.05$; NS = non significant.

Figure 6 In vivo *alteration of GABAB signaling and alleviation of mechanical allodynia in SNL rats.*

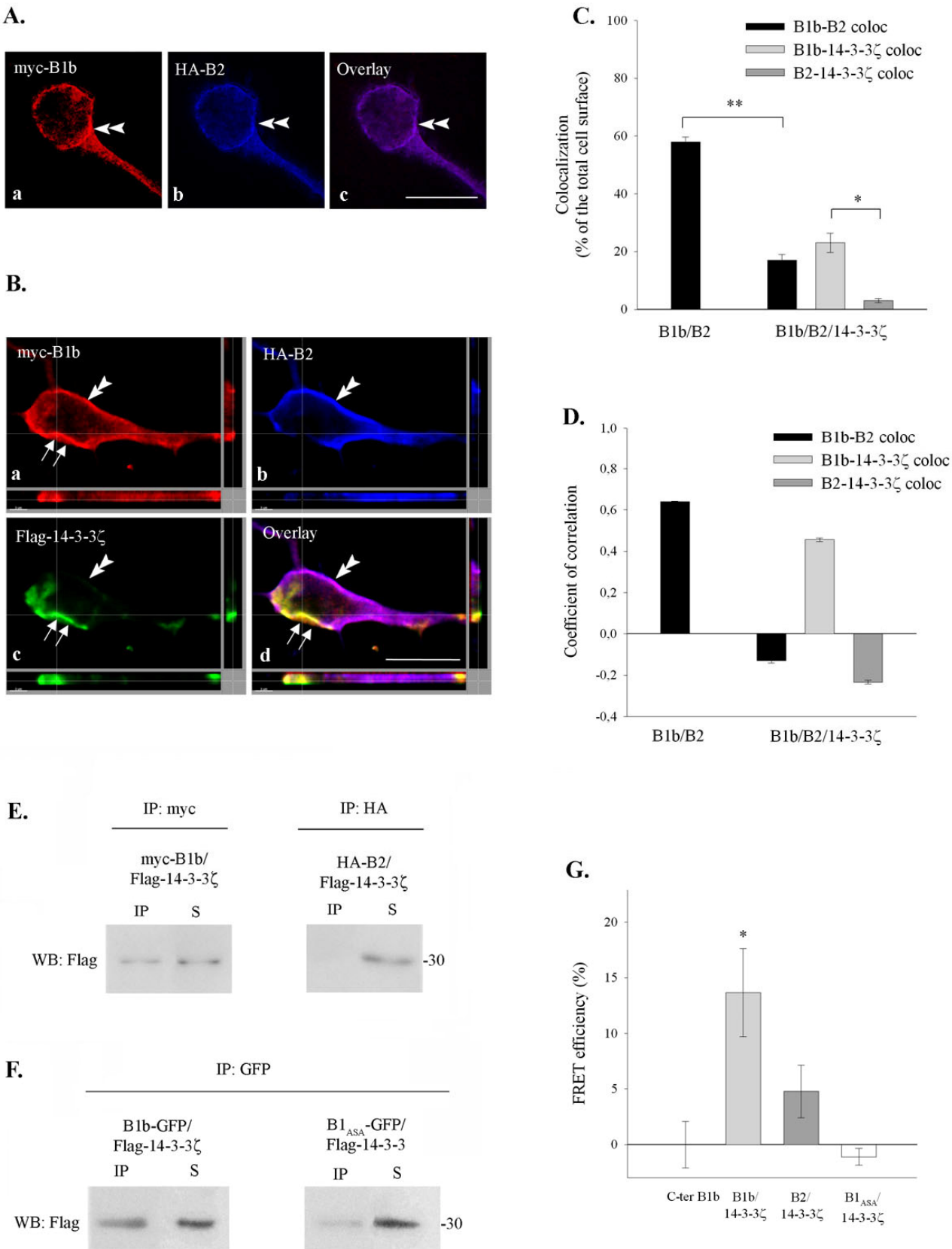
A. Autoradiographic images of [35S]GTPγS in sham (upper panel) and SNL (lower panel) rat spinal cord showing the basal binding (left), 1 µM Baclofen-stimulated binding (middle), and 1 µM Baclofen-stimulated binding after anti-14-3-3ζ siRNA injections (right). Arrowheads: ipsilateral side. Bar: 1.5 mm.

B. Quantification of autoradiograms.

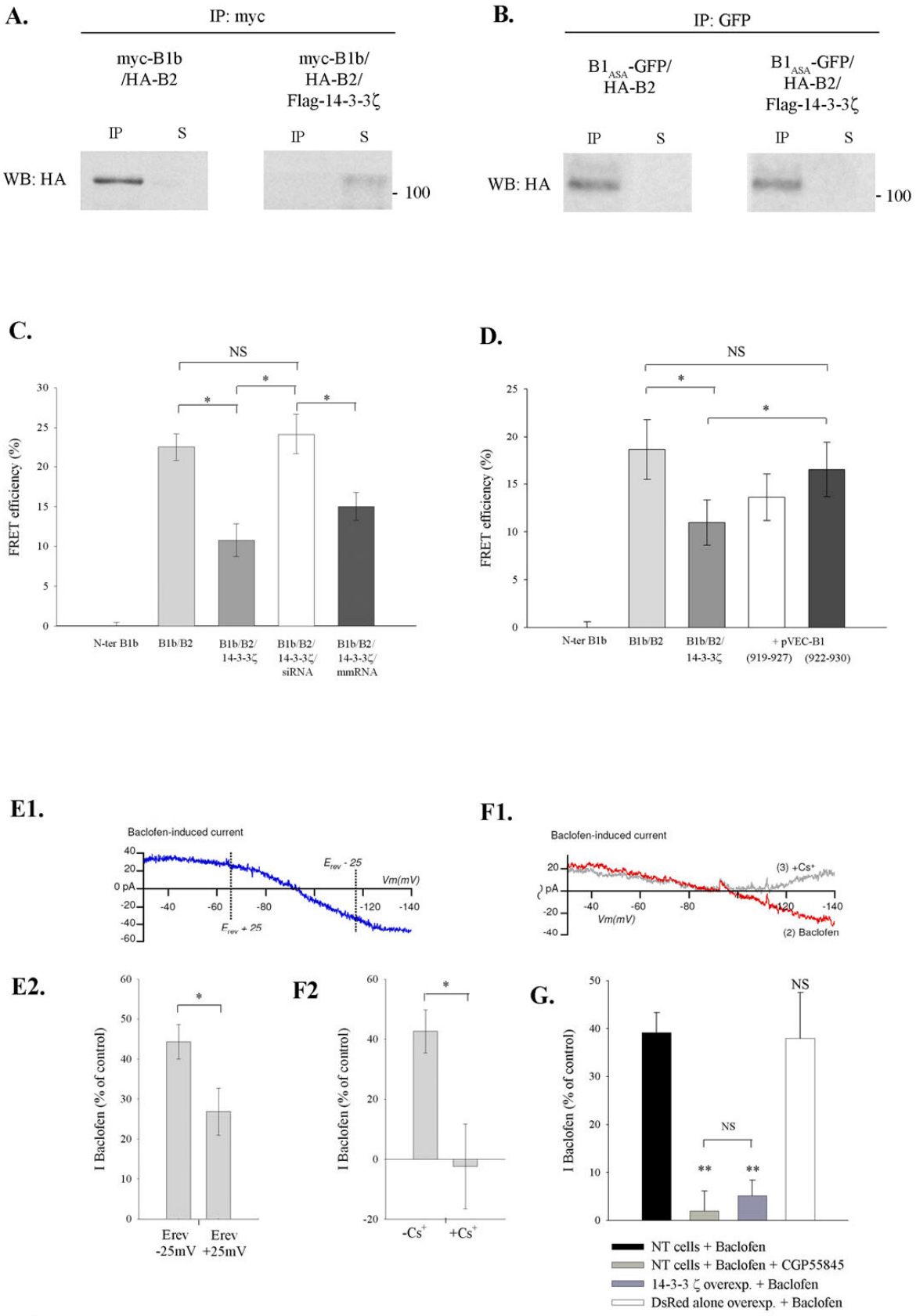
C. to F. Threshold to mechanical stimulation measured in SNL (**C, E**) and sham (**D, F**) rats before intrathecal injections at day 12 (**C, D**), or day 14 (**E, F**) after surgery. The threshold before surgery is set to 100%.

Baclofen produces an antinociceptive effect in SNL rats (**C** Baclofen, day 12, **E** Baclofen, day 14). Anti-14-3-3ζ siRNA has no effect *per se* in SNL rats (**C** △; RNA, day 15). In contrast, pVEC-B1 (922-930) has an effect similar to that of Baclofen (**E** △; peptide, day 15). The effects of Baclofen are significantly enhanced after injection of siRNA (**C** RNA + Baclofen, day 15) or competing peptide conjugate (**E** peptide + Baclofen, day 15). Mismatch RNA (**C** ▼), or pVEC only (**E,** ▼) have no effect when injected alone or in conjugation with Baclofen.

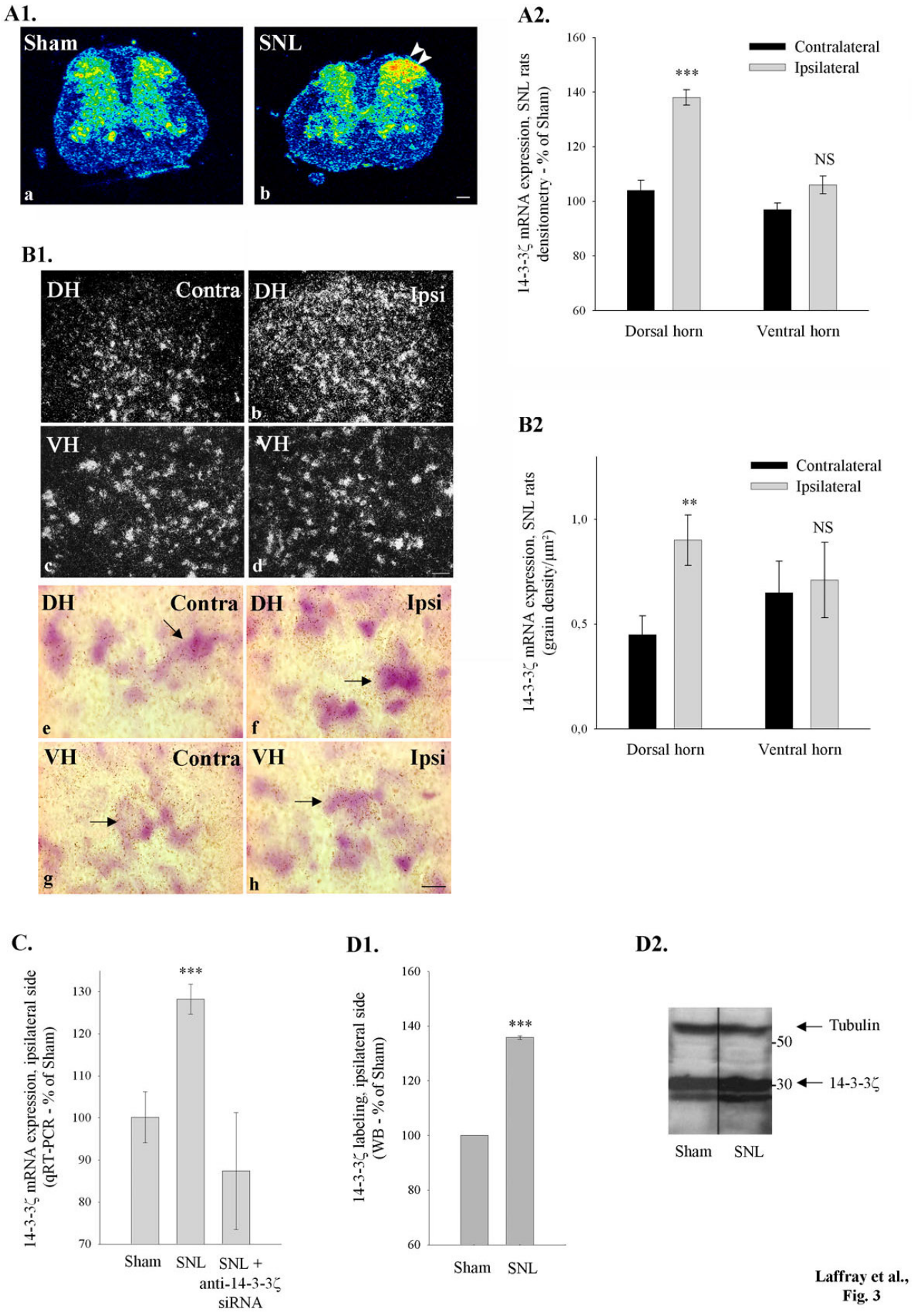
No changes of the mechanical threshold are seen in Sham rats after intrathecal injections of Baclofen (**D, E**), siRNA (**D**, ○), or pVEC-B1 (922-930) (**F**, ○).



Laffray et al.,
Fig. 1

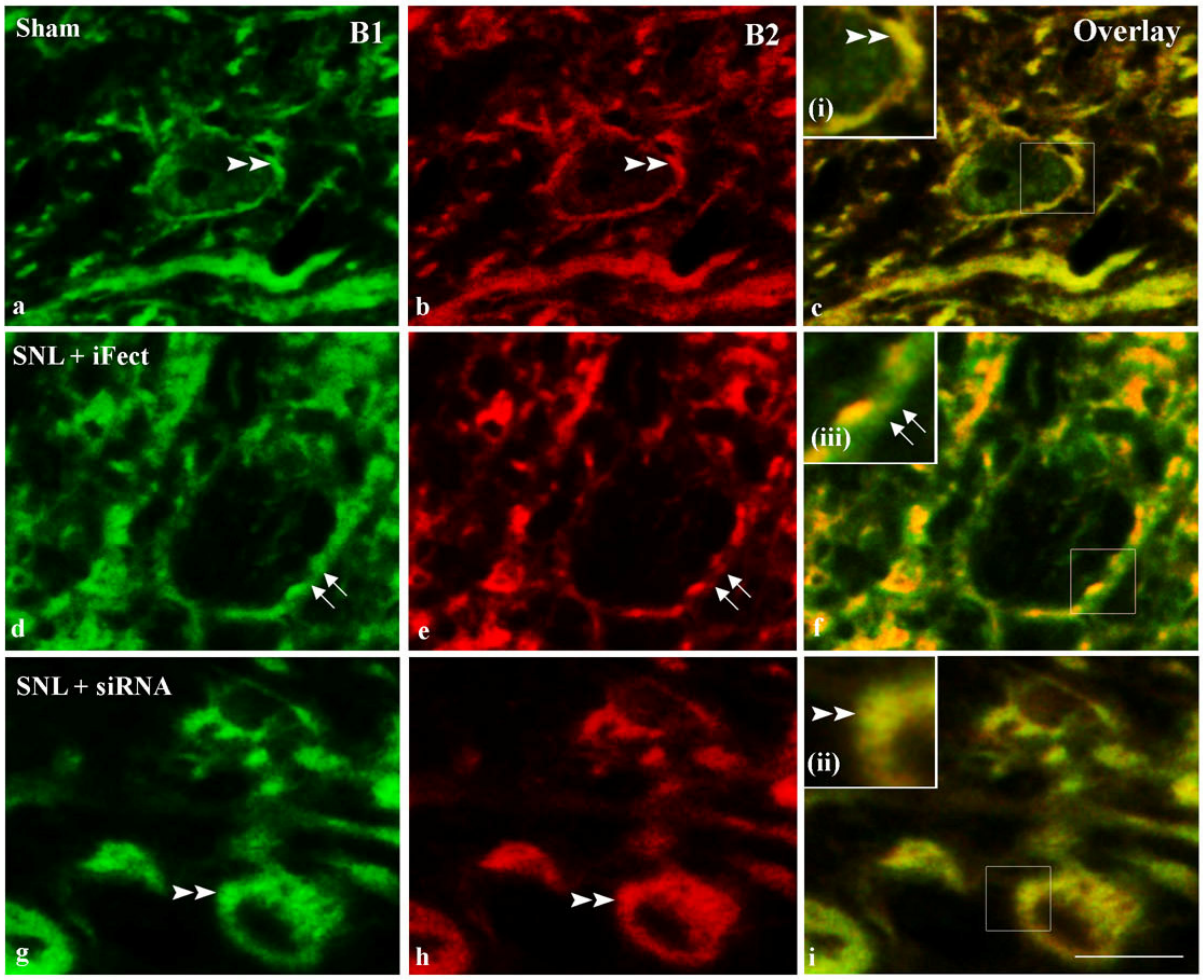


Laffray et al.
Figure 2

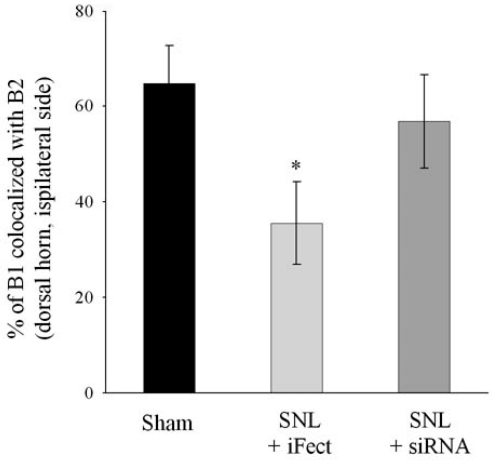


Laffray et al., Fig. 3

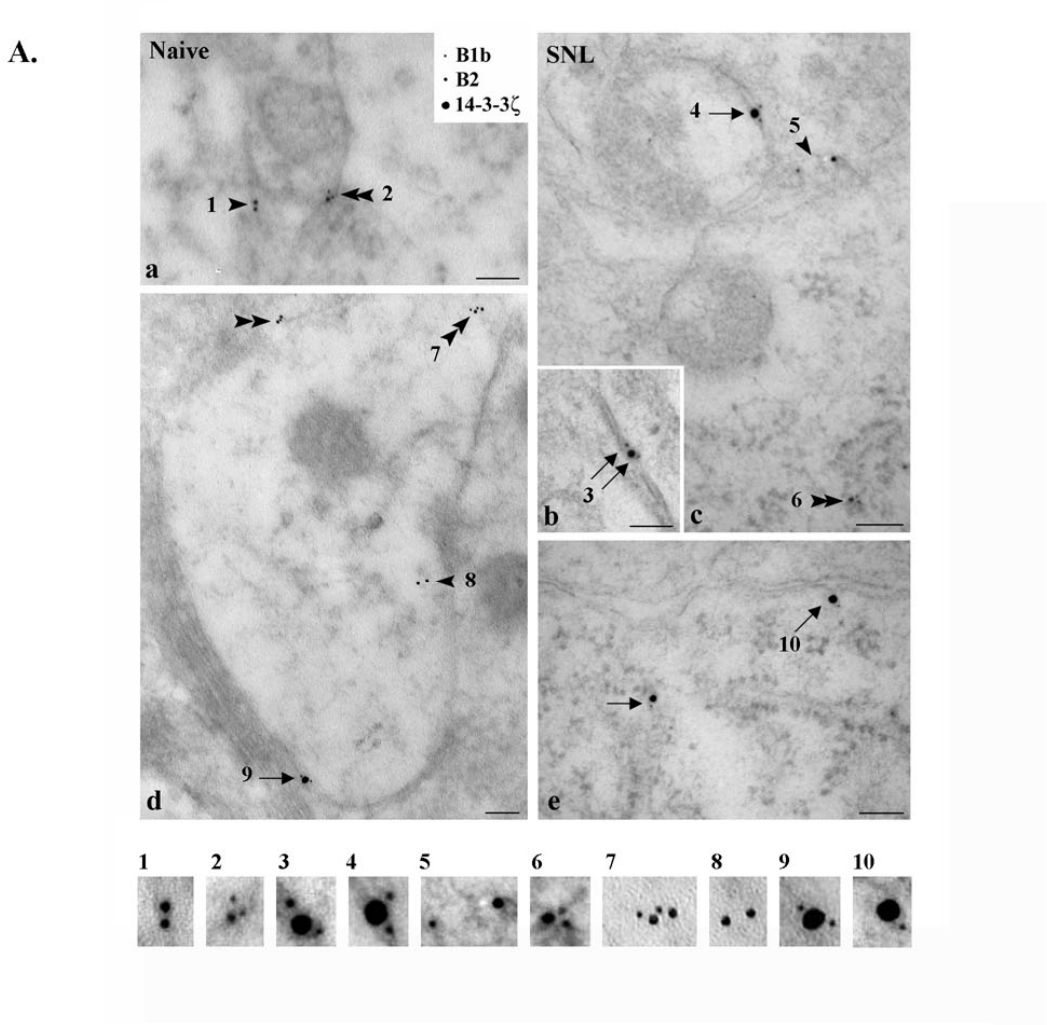
A.



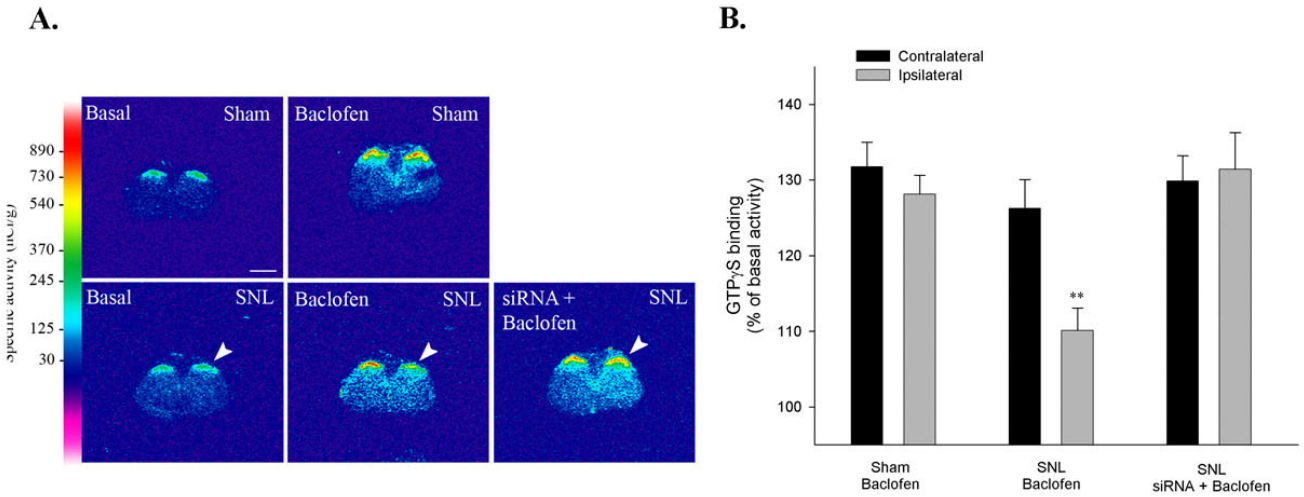
B.

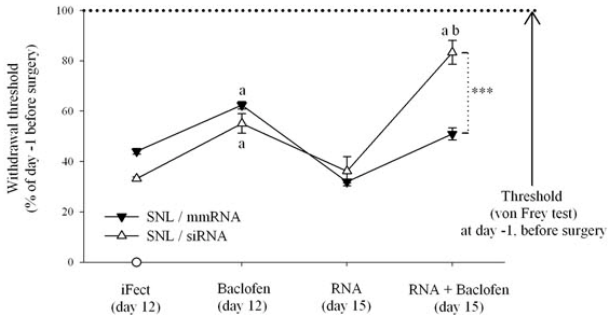


Laffray et al.
Fig. 4

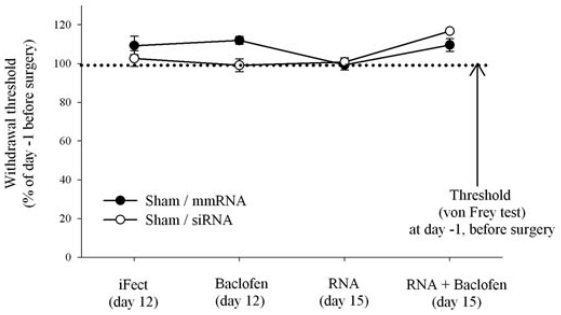


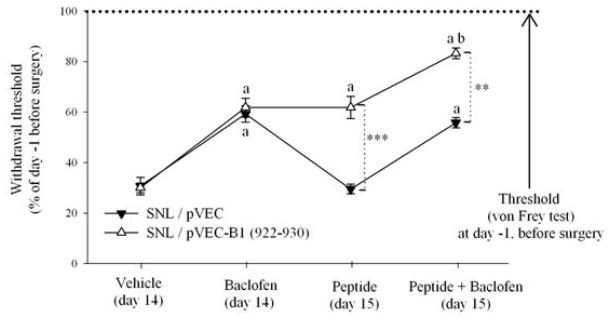
Laffray et al.,
Fig. 5



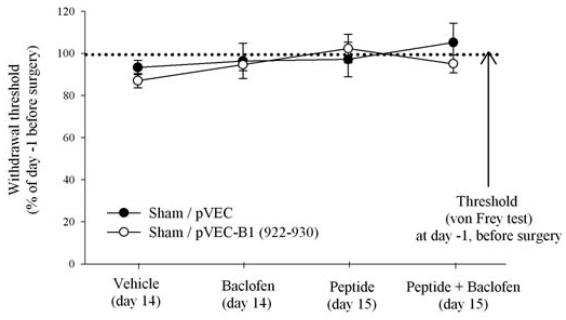


a : p < 0.01 versus iFect
b : p < 0.01 versus SNL / siRNA, Baclofen (day 12)
*** : p < 0.001





a : p < 0.001 versus Vehicle
b : p < 0.05 versus SNL / pVEC-B1 (922-930), Baclofen (day 14)
** : p < 0.01
***: p < 0.001



Laffray et al.,
Fig. 6

SUPPLEMENTAL DATA

SUPPLEMENTAL RESULTS

1. 14-3-3ζ -induced de-dimerization of the GABAB receptor occurs mainly at the plasma membrane.

First, we showed that B1 interacts with 14-3-3ζ at the plasma membrane. For this purpose, we investigated whether the surface targeting of the GABAB heterodimer modified the IP of B1b and 14-3-3ζ. Since B2 is known to achieve surface targeting of B1, we decided to compare the results of IP experiments in double (myc-B1b/Flag-14-3-3ζ) and triple (myc-B1b/HA-B2/Flag-14-3-3ζ) transfected COS-7 cells. The amount of co-precipitated 14-3-3ζ was higher in the latter than in the former condition (Fig. S1A1, IP lane, left panel). The quantification confirmed the increase of 14-3-3ζ fraction that co-precipitated with myc-B1b in triple transfected cells (Fig. S1A2; $p<0.05$), thus indicating a preferential association at the plasma membrane. In contrast, co-IP between B2 and 14-3-3ζ remained very weak, if detectable (Fig. S1A1, right panel).

To further confirm this site of interaction in neurons, we colocalized B1b-GFP and t-dimer DsRed 14-3-3ζ in cultured neurons with confocal microscopy (Fig. S1B, a and b). In the absence of B2, B1b was located in cytoplasmic domains enriched with endoplasmic reticulum, identified by the presence of calreticulin (blue, Fig. S1B, a and b), and weakly labeled for 14-3-3ζ (Fig. S1B, a). After B2 overexpression, B1b was not retained in the endoplasmic reticulum and colocalized with 14-3-3ζ in subcellular domains encompassing the plasma membrane (Fig. S1B, b).

Second, we demonstrated that the de-dimerization process affected only heterodimers that were already inserted at the plasma membrane. We measured the effect of 14-3-3ζ on FRET efficiency in two distinct regions of interest corresponding to the cytosol, and to a region encompassing the plasma membrane. Decrease of FRET efficiency was detectable at the plasma membrane, but not in the cytosol (Fig. S1C), suggesting that de-dimerization affects only GABAB heterodimers already inserted at the plasma membrane. To further confirm this finding, we designed an experiment aiming to measure FRET efficiency at the plasma membrane, on heterodimers that have been properly trafficked and inserted into the plasma membrane before overexpression of 14-3-3ζ. The rationale for this experiment relied on sequential transfections, and on the use of type C Botulinum toxin (Botox) (see Supplemental Material and Methods). This toxin is known to block the fusion of secretory vesicles and therefore to hinder the insertion of newly synthesized heterodimers. The Botox method was previously validated [1, 2]. In the present study, we first ensured that Botox was

actually co-transfected with GABAB subunits by monitoring the disappearance of syntaxin, a target of Botox. For this purpose, we demonstrated (Fig. S1D1) that most cells transfected with B1 (a, green) and B2 (c, red) lacked syntaxin (e, far red), thus indicating that they were also transfected with Botox. In contrast, neighboring, not transfected cells displayed high amount of syntaxin (Fig. S1D1, e). For sequential transfections, neurons were first transfected with B1 and B2 constructs so that the heterodimers can reach the surface. After 12h, a Botox construct was also transfected in the same cultures, therefore impeding new secretory granules to fuse with the plasma membrane. By this mean, we prevented the insertion of new heterodimers at the plasma membrane. Finally, after another 12h, 14-3-3ζ was also transfected. Consequently, any changes in B1/B2 FRET efficiency at the plasma membrane is due to alterations of preformed heterodimers since no newly synthesized heterodimer can reach the membrane. Under these conditions, we showed that 14-3-3ζ was still able to decrease the FRET efficiency between B1 and B2 in a region of interest encompassing the plasma membrane (Fig. S1D2). This effect of 14-3-3ζ demonstrates its ability to dissociate preformed, already inserted, GABAB heterodimers.

2. Anti-14-3-3ζ siRNA are efficient to inhibit 14-3-3ζ expression both *in vitro* and *in vivo*

Anti-14-3-3ζ siRNA dose-dependently decreases the level of 14-3-3ζ mRNA as assessed with qRT-PCR in cultured spinal neurons (Fig. S2A). The lowest efficient dose that we have tested was 600 nM of siRNA. This induces the significant loss of around 20% of the mRNA amount, as compared to control conditions. However, 1200 nM proved to be a much more efficient dose, resulting in a decrease of around one half (42.5%) of the amount of mRNA.

When compared to naive rats, mismatch (mm) RNA injected animals showed no variation in 14-3-3ζ expression. In contrast, after three intrathecal injections of 2 µg siRNA in naive rats, the immunoreactivity for 14-3-3ζ dropped dramatically (Fig. S2B, b), thus indicating inhibition of 14-3-3ζ protein synthesis in the spinal cord. To test for the site of action of siRNA, we applied fluorescent siRNA (Fig. S2C). The intrathecal injection of such fluorescent siRNA confirmed that our injection procedure allowed siRNA to enter the spinal cord (Fig. S2C, a). In contrast, fluorescent siRNA did not reach the dorsal root ganglia (Fig. S3C, b; see also §4 Supplemental results, Fig. S6A).

Taken together, our results showed the efficacy of siRNA, either incubated *in vitro* or injected intrathecally *in vivo*, to prevent synthesis of 14-3-3ζ in the spinal cord.

3. Uptake and cytotoxicity of competing peptide

We investigated the influence of peptide concentration, and of the duration of peptide incubation, on cellular uptake profiles. Three internalized peptides were considered here: the positive control pVEC, pVEC-B1 (919-927), and pVEC-B1 (922-930). At low concentration (0.1µM), the intracellular labeling remained very weak (data not shown), whatever the incubation time (1 or 2 hr). Peptide uptake was increased when incubated at higher concentration for 1 or 2hr. No differences were observed between the two concentrations that have been tested, 1 or 5µM. In all cases, fluorescence was detected in the soma and processes (Fig. S4A).

As the role of cell fixation in generating artefactual uptake was controversial in the literature [3, 4], we also incubated peptides on living cells in the same conditions of concentration and time as described above. No differences were seen in the peptide internalization profiles. This demonstrated that in our hands, fixation does not induce artefactual uptake of peptide and does not modify the peptide distribution in soma, nucleus and processes that was similar in fixed and living cells.

Taken together, our results suggest that pVEC is an efficient carrier permitting non-endocytotic internalization of cargoes without inducing *in vitro* cell toxicity. In particular, it allowed the uptake of pVEC-B1 (919-927) and B1 (922-930) peptides in neurones.

To assess whether the mechanism of cellular uptake of peptides depended on classical endocytosis pathway, we tested the effect of temperature (37°C or 4°C) on peptide internalization. In fact, the abolition of cellular uptake at low temperature would indicate a mechanism that is dependent of the classical endocytotic pathway [5]. As already shown by Elmquist et al. [6, 7], pVEC alone was internalized both at 37°C and at 4°C (Fig. S4B). Identical labeling patterns were observed for pVEC-B1 (919-927) and pVEC-B1 (922-930) whatever the incubation temperature. Therefore, for all the tested molecules, including positive (pVEC) and negative (Dextran) controls, there were no significant differences between the rate of internalization at 37°C and at 4°C (Fig. S4B), confirming that peptides were taken up into neurons mainly by an endocytosis-independent mechanism.

For each native sequence, we demonstrated that the coupling to pVEC significantly increase peptide internalization as compared to the RRKR modification ($p<0.001$ *vs* all other peptides). Interestingly, internalization was significantly higher for pVEC-B1 (922-930) than for pVEC-B1 (919-927) ($p<0.05$). As a control, we showed that Dextran internalization was undetectable (Fig. S4A and B). At the opposite, the positive control pVEC alone was internalized at the highest rate ($p<0.001$), which was similar to data from Holm et al. [8].

Finally, neuronal cultures were incubated with Wortmaninn, an inhibitor of endocytosis (Fig. S4C). This does not prevent cellular uptake of fluorescein-labelled peptide conjugates, indicating that they are taken up by a mechanism different from classical endoctyosis.

This analysis demonstrated that pVEC-driven cell penetration was energy-independent. It also showed that pVEC-B1 (922-930) was more efficiently internalized than pVEC-B1 (919-927).

To check whether peptides were taken up into healthy cells, we performed Lactate dehydrogenase cytotoxicity assay on neuronal cell cultures (Fig. S4D). No cytotoxicity was measured in cultured cells prior to incubation (cells only), or after incubation with pVEC alone (pVEC) or with either of the peptides (pVEC-B1 (919-927) and pVEC-B1 (922-930)). In contrast, incubation with Triton X-100, used as a positive control, resulted in a complete cell loss (Triton).

4. Specificity of 14-3-3ζ overexpression in spinal neurons

To better specify the site of action of 14-3-3ζ, we studied its regulation in the dorsal root ganglia with qRT-PCR (Fig. S6A) and in situ hybridization (Fig. S6B and C). Quantitative analysis showed that mRNA levels tends to decrease, or showed no changes; in the ipsilateral ganglia of neuropathic rats as compared to sham animals (Fig. S6A), or to the contralateral ganglia (Fig. S6B and C). The lack of 14-3-3ζ regulation in the dorsal root ganglia thus indicates that this protein is unlikely involved in the regulation of GABAB activity in sensory neurons under pain conditions. Moreover, intrathecal injection of anti-14-3-3ζ siRNA failed to alter the content of sensory neurons in 14-3-3ζ mRNA (Fig. S6A). This result is in agreement with the absence of siRNA penetration into the dorsal root ganglia (see also Supplemental results, §2, Fig. S2C, b). We conclude that the effects of siRNA described *in vivo* (Fig. 6) are therefore restricted to changes in spinal neurons, thus strengthening the demonstration that 14-3-3ζ exerts its adverse effect on the GABAB heterodimer in spinal neurons but not in sensory neurons.

In the spinal cord, our qRT-PCR results showed that the expression of the GABAB subunits is not altered in the spinal cord of neuropathic rats (Fig. S7A1 and A2), thus confirming previous data from another group [9].

With regards to the selectivity of 14-3-3ζ for interaction with B1, we tested for the possible involvement of 14-3-3η, the other 14-3-3 isoform that has been described to potentially interact with B1 [10]. First, the expression of 14-3-3η decreases in neuropathic conditions (Fig. S7B1), in contrast to what occurred for 14-3-3ζ. Second, even when

overexpressed in neuronal cultures, 14-3-3η does not alter the apparent colocalization between B1 and B2 and the three proteins remained co-expressed in the same subcellular domains (Fig. S7B2). Finally, overexpressed 14-3-3η does not modify the FRET efficiency between B1 and B2 (Fig. S7B3). The latter result does not only indicate that 14-3-3η cannot dissociate the heterodimer, but also that changes in FRET efficiency are independent of the transfection status (double *vs* triple transfection) of the cells. In conclusion, these results demonstrate that GABAB de-dimerization is specific of 14-3-3ζ isoform, not involving another isoform of the same protein family.

5. GABAB subunits are coexpressed with 14-3-3ζ in dorsal horn neurons

Immunolabeling for B2 subunit was seen in the neuropil and cell bodies, being more intense in the superficial laminae (Fig. S8A, a). Since the GABAB receptor is an obligate heterodimer [11 , 12], it is assumed that B2 subunits are present together with B1 subunits. Indeed, labeling for B1a or B1b subunits was also seen in the spinal dorsal horn (data not shown). Immunostaining for 14-3-3ζ was found to be widely distributed throughout the spinal cord. Moreover, it overlaps with B2 labeling (Fig. S8A, b).

At higher magnification, intense labeling for B2 was observed in the cytoplasm of dorsal horn cell bodies, that also express 14-3-3ζ (Fig. S8A, d and e). Co-distribution was also observed in dorsal horn neurons for 14-3-3ζ and B1b, which is considered to be the predominant post-synaptic splice variant of the B1 subunit [13 , 14, 15] (Fig. S8A, g and h).

Interestingly, we also demonstrate that 14-3-3ζ was not present in nerve terminals of the dorsal horn (Fig. S9). Indeed, only little colocalization could be seen between 14-3-3ζ and a marker of the presynaptic compartment (synaptophysin, Fig. S9a-c). More particularly, 14-3-3ζ was not found in inhibitory (GAD65, Fig. S9d-f) nor excitatory (VGLUT1 and 2, Fig. S9g-i) nerve endings. In addition, 14-3-3ζ was not expressed in peptidergic nociceptive fibers (CGRP, Fig. S9j-l). Therefore, 14-3-3ζ/B1 interaction is likely to occur mainly in the postsynaptic compartment of dorsal horn neurons, but not in their presynaptic terminals. Most importantly, our data indicate that 14-3-3ζ/B1 interaction does not modify the presynaptic GABAB inhibition of glutamate release by primary afferents. Our results demonstrate that postsynaptic GABAB greatly contribute to the central inhibition of pain transmission, in addition to presynaptic receptors located on nociceptive nerve endings in the spinal cord [16]. These data are in agreement with the literature that indicates the roles of postsynaptic GABAB in the control of neuronal excitability [13, 17-19].

6. 14-3-3ζ does not alter the GABAB control of locomotor activity

The effects of surgery and siRNA injections on spontaneous locomotor activity are shown in Fig. S11. The SNL procedure decreases the total locomotor activity as expected from previous studies [20]. However, after repetitive injection of anti-14-3-3ζ siRNA, locomotor activity was rescued.

If 14-3-3ζ would have some role in altering the GABAB control of locomotor network, one should expect an increased inhibition of locomotor network activity after injection of anti-14-3-3ζ siRNA, resulting in a decrease of locomotor behavior. In contrast, the injection of anti-14-3-3ζ siRNA in neuropathic animals does not inhibit spinal motoneurons activity, nor induced sedation. Quite the contrary, locomotor activity is even partially restored after injection of anti-14-3-3ζ siRNA as compared to sham animals.

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell cultures and transfection of constructs and siRNA

Spinal cells were obtained from rats at 18 days of embryonic development. The embryos were delivered by caesarean section from deeply anaesthetized rats and killed by decapitation. Pieces of lumbar region of the spinal cord were exposed to a 1X trypsin solution (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) for 25min at 37°C. These pieces were then mechanically dissociated by forcing them through fine-tipped pipettes several times. Cells were plated on glass coverslips at a density of 150,000/100µL or 800,000/100µL. The glass coverslips were previously coated overnight at 37°C with a 0.1mg/mL polylysine solution (Sigma, Saint Louis, MO) and for 2hr with a 0.05mg/mL laminine solution (Sigma). The cultures were kept in Serum-free Neurobasal TM medium (Sigma), supplemented with B27 and Glutamax (Sigma). Half of the medium was changed twice a week.

N-ter histidine-14-3-3η, N-ter Flag-14-3-3ζ [21], N-ter c-*myc* or hemagglutinin (HA) epitope-tagged B1b and B2 [22], C-ter GFP-tagged $GABAB1_{ASA}$ [23], and C1 Botulinum Toxin [1, 2] constructs were previously described. B1b and B2 cDNA were further modified at their N-terminus by the addition of GFP after amino acid 61, or t-dimer DsRed introduced after amino acid 42, respectively. Other constructs were generated by the addition of GFP after amino acid 856 and 955 of B1b and B2 C-terminus, respectively. 14-3-3ζ cDNA was modified by the addition of mCherry at the N-terminus.

COS-7 cells were transiently transfected with myc-B1b, B1b-GFP, $B1_{ASA}$-GFP, HA-GABAB2, and/or Flag-14-3-3ζ using FuGene6 reagent (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). After transfection in COS cells, 14-3-3ζ expression had an 84% ± 5.8 increase.

Dissociated rat spinal neurons were transfected with 400ng plasmid DNA/2µL Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). In most cases, transfected cells incorporated all cDNAs together. siRNA was added 24hr after transfection with cDNAs (1200ng siRNA/3µL of Lipofectamine 2000). Growth medium was replaced after 6 hr and cells were harvested 36 hr after siRNA transfection.

For the Botox experiments, neurons were first transfected with GFP-B1 and t-dimer DsRed-B2 and harvested for 12h. Next, the same cultures were transfected with C1 Botulinum Toxin. After another 12h, the cultures were finally transfected with Flag-14-3-3ζ. Neurons were then fixed and 2P-FLIM was performed.

Anti-14-3-3ζ siRNA was a pool of 4 target-specific 20-25 nucleotides siRNAs (sc-29583, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Mismatch siRNA was a non-targeting 20-25 nucleotides designed as a negative control (sc-37007, Santa Cruz Biotechnology).

qRT-PCR

B1, B2, 14-3-3ζ and 14-3-3η mRNA primer sets were tested by qPCR and gel electrophoresis for the absence of primer/dimer artifacts and multiple products. Triplicate qPCR reactions were done for each sample, using transcript-specific primers (600 nM) and cDNA (10ng) in a final volume of 10 µl. The DyNAmo^{TM} SYBR Green qPCR kit (Finnzymes) was used with the following PCR amplification cycles: initial denaturation, 95°C for 15 min; followed by 40 cycles with denaturation, 95°C for 20 sec and annealing-extension, 61°C for 35 sec. A dissociation curve was generated at the end of the 40th cycle to verify that a single product was amplified. The Ct value of each gene was normalized against that of Succinate DeHydrogenase complex subunit A. The relative level of expression was calculated using the comparative ($2^{\Delta\Delta CT}$) method [24].

Immunohistochemistry on cell cultures

Transfected spinal cells were fixed for 20min at 37°C with 4% paraformaldehyde (w/v) in Tris HCl 0.1M buffer containing 4% sucrose (w/v). Endogenous peroxidase was then blocked with a peroxidase block (Envision, Dako SA, Trappes, France) for 5min and cells were permeabilized for 30min at room temperature (RT) using 0.05% Tween 20 (Sigma) (v/v) in Tris HCl 0.1M buffer containing 1% BSA (w/v). The detection of recombinant proteins was carried out sequentially according to previously published protocols [25]. A mouse anti-Flag tag antibody (1/5000; Sigma) was first incubated overnight at 4°C when triple transfection was performed. Cultures were rinsed three times with a Tris HCl 0.1M, NaCl 0.15M and Tween 0.05% buffer (TNT), blocked for 30min with a Tris HCl 0.1M, NaCl 0.15M and blocking reagent 0.05% buffer (TNB), and incubated with goat anti-mouse Horse Raddish Peroxidase

(HRP) for 30min (Envision, Dako SA). After additional rinsing, tyramide FITC (1/50 in its amplification diluent; PerkinElmer Life Sciences) was applied for 10min. Cultures were then incubated in double Stain Block solution and peroxidase block solution for 3min and 5min respectively (Envision kit, Dako SA). Subsequently, rabbit anti-*myc* tag (1/2000; Upstate, Lake Placid, NY) and mouse anti-HA tag (1/1000; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) antibodies were incubated overnight at 4°C. After rinsing, cells were co-treated with HRP-conjugated goat anti-mouse (HA detection) and biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody (1/200; Vector) (myc detection) for 30min. Cells were rinsed and incubated with Cy5-conjugated tyramide (1/50 in its amplification diluent; PerkinElmer Life Sciences) for 10min (HA detection). Myc detection was completed by incubating cells with Alexa 568-conjugated streptavidine (Molecular Probes). Flag detection was omitted when a myc-GABAB1b / HA-GABAB2 double transfection was performed. When needed, the detection of calreticulin, a marker of the endoplasmic reticulum, was performed with a primary rabbit anti-calreticulin antibody (1/5000, ABR, Golden, CO), and a secondary HRP-conjugated pig anti-rabbit antibody (1/100 in TNB; Dako SA), according to the same protocol as for HA detection (see above).

For the detection of syntaxin after Botox transfection, a mouse anti-syntaxin (Sigma; 1/200) was incubated overnight and visualized with an Alexa647-conjugated anti-mouse secondary antibody (1/1000). Nuclei were detected with Bisbenzimide incubation (1/6000 for 1 min).

Cultures were finally mounted on glass coverslips with DakoCytomation Fluorescent Mounting Medium (Dako SA) and viewed on a Leica TCS SP2 confocal microscope (Mannheim, Germany). The FITC fluorophore was excited using a 488nm argon laser, Alexa 568 using a 543nm Green He-Le laser, and Cy5 using a 633nm Red He-Ne laser. Single optical images from double or triple labeling experiments were acquired sequentially.

Colocalization and Correlation of labeling intensity in cell culture

After acquisition, each channel was filtered by a low-pass filter (a Gaussian filter) in order to increase the Signal-to-Noise Ratio (SNR), and threshold to retain only expressed pixels. Contrary to other methods which used overlays of two or three channels, this ensures that the processing is optimal for each channel.

The second step was to analyse the colocalization of protein expression for two channels. This was done by selecting pixels of high intensity in the two images. Pixels having zero intensity in the two images were removed. This reduced considerably the amount of data for the following computations. This step was essentially a spatial analysis which resulted in a percentage of colocalized pixels.

The final step was a correlation computation. This computation was done by using a Pearson product moment correlation coefficient implemented in the R software (http://www.r-project.org/). When the correlation coefficient tended to +1, labeling was considered positively correlated, showing that their intensities varied in parallel. When it was comprised between +0.2 and -0.2, labeling was not correlated or randomly distributed; and when it tended to -1, labeling were negatively correlated and is mutually exclusive.

Immunoprecipitation

For crosslinking, COS-7 cells were washed in PBS 0,01M and lysed (25mM HEPES, 150mM NaCl, 1% CHAPS, and protease inhibitors) with 1 mM Dithiobis[succinimidylpropionate]. For immunoprecipitation of GABAB subunits, cells were solubilized using CHAPS buffer for 1hr on ice. After centrifugation at 13000 rpm for 10 min, the supernatant was immunoprecipitated with 2.5µg of the anti-myc (Roche), anti-HA (Roche), anti-GFP (Sigma), or anti-Raf (BD Bioscience Pharmingen, Franklin Lakes, NJ) antibodies, overnight at 4°C, followed by incubation with 50µL of protein G-Sepharose beads (Amersham Biosciences) or anti-mouse IgG agarose beads (Sigma) for 1hr at 4°C. Samples were then centrifuged (5 min, 5000 rpm) and supernatants containing unbound proteins were collected. After washing, bound proteins were eluted from beads. Proteins were separated by electrophoresis on 10% SDS-PAGE gels. Co-immunoprecipitation was then detected by Western Blotting.

Synthesis of competing peptides

The GABAB1/GABAB2 heterodimerization involves the C-terminus coiled-coil domains of both subunits [26, 27]. More precisely, amino acids S_{887}-L_{921} of GABAB1 are essential for their interaction [22]. The 14-3-3ζ binding site of GABAB1 only partially overlaps GABAB1-GABAB2 interaction site. It involves a region of GABAB1 that includes residues E_{905}-P_{928} and which may probably be extended until amino acid K_{960} [10, 28]. Based on these data, we designed and synthesized short selective peptides that are likely to compete with GABAB1 for binding to 14-3-3ζ. To improve their cellular uptake, the competing peptides were modified by adding positively charged amino acids such as lysine and arginine (Wender et al., 2000), or by coupling to the cell penetrating peptide pVEC, derived from the cell adhesion molecule vascular endothelial cadherin [7]. All constructs used in this study are presented in Fig. S3.

t-Boc peptide synthesis of pVEC

Cys-(Npys)-pVEC was synthesized in a stepwise manner on a 433A peptide synthesizer (Applied Biosystems, USA), using t-Boc strategy of solid-phase peptide synthesis. *ter*-Butyloxycarbonyl (*t*-Boc) amino acids (Neosystem, Strasbourg, France) were coupled to a *p*-

methylbenzylhydrylamine (MBHA) resin (Neosystem, Strasbourg, France) to obtain C-terminally amidated peptide, using DCC/HOBt (dicyclohexylcarbodiimide /hydroxybenzotriazole) activation. After the completion of the sequence, the peptide was finally cleaved from the resin with liquid HF at 0°C for 1 hour in the presence of *p*-cresol.

Fmoc peptide synthesis of peptides and fluorescein labelling

Peptides derived from GABAB1 sequence, modified or not with addition of lysine (K) or arginine (R) in the N-terminus of their sequences, were synthesized on a Syro parallel synthesizer (MultiSynTech GmbH, Germany) using Fmoc strategy. Fmoc-amino acids were coupled to rink-amide MBHA resin (MultiSynTech GmbH, Germany), using TBTU activation. Fmoc protection group was removed by 20% piperidine in DMF (v/v). The labelling with the carboxyfluorescein was adapted from Fischer et al. (2003). Peptide-resin with N-terminal free amino group were incubated with 2 to 5 times excess of the 4(5)-carboxyfluorescein (Molecular Probes, Holland) and DIC/HOBt activation, for 16 hr at room temperature (RT) in dark, in a 1:1 mixture of DMF/DMSO. Peptides were finally cleaved from the resin with TFA at room temperature for 3hr, under shaking.

Purification, and peptide conjugation to pVEC

All peptides, including pVEC, were purified on a Gynkotek HPLC system with a Supelco Discovery C18 semi-preparative column (25cm×10mm). The molecular mass were obtained by prOTOF 2000 MALDI-TOF mass spectrometer (PerkinElmerSCIEX, USA) and agreed with expected values (data not shown). The cell penetrating constructs were obtained by forming an unsymmetrical disulfide bridge between Cys-containing cargoes and Cys(Npys)-pVEC [29]. The purity and the molecular masses at each step were determined as described above.

For all the peptide sequences presented in Fig. S3, we set peptides with or without carboxyfluorescein (Fluo). pVEC was used as a positive control, and Dextran, a bacterial polysaccharide (M.W. = 42000 g/mol) as a negative control for cell membrane penetration.

Cellular internalization assays of fluoresceinyl-peptides

Cellular internalization assays were described in Holm et al. [8]. HKR solution (5mM HEPES, 137mM NaCl, 2.68mM KCl, 2.05mM $MgCl_2$, 1.8mM $CaCl_2$ and 1g/L glucose) was used to wash cells, and to dilute peptides. All fluoresceinyl-peptides (Fluo-peptides) described in Fig. S3, were tested.

Confocal microscopy

Briefly, eight days-old cultures, platted at 150,000/100µL, were washed and incubated, for one or two hours with different concentrations of Fluo-peptides (0.1; 1 or 5µM) at 37°C or 4°C. Cells were then washed again, fixed or not for 20min at 37°C with 4% paraformaldehyde (w/v) in phosphate buffer (PB) containing 4% sucrose (w/v).

Cultures were finally mounted on glass coverslips with DakoCytomation Fluorescent Mounting Medium (Dako SA, Trappes, France) and viewed on a Leica TCS SP2 inverted confocal microscope (Leica, Mannheim, Germany). Fluoresceinyl fluorophore was excited using a 488nm argon laser.

Quantification of fluoresceinyl-peptides uptake by fluorometry

Eight days-old cultures, platted at 800,000/100µL, were washed, treated for 1hr with 1µM of Fluo-peptides at 37°C or 4°C, and washed again twice. Cells were detached by 0.25% trypsin (10min at 37°C), centrifuged (3,000 x g, 5min, 4°C) and lysed with CHAPS buffer for at least 1hr at 4°C. After centrifugation (10,000g, 1min, 4°C), the fluorescence intensity of the supernatant was measured at 485nm on a plate-reader, for treated cells, untreated cells (to remove the background) and for exposure solutions (initial peptide solutions diluted in HKR). The cellular protein content was determined for each cell lysates by the method of Lowry [30]), using a protein assay kit (Sigma) with bovine serum albumin (BSA) as standard. Results were expressed as mean (picomoles of peptide per mg of total cellular proteins) ± SEM from three independent experiments. Measurements were determined in duplicate.

Fluoresceinyl-peptides uptake after endocytosis inhibition

Eight days-old cultures, platted at 150,000/100µL, were washed, treated for 1hr with 1µM of Fluo-peptides at 37°C or 4°C, and washed again twice. Cells were incubated with 150 nM Wortmaninn (Sigma) at 37°C for 15 minutes. Detection of nuclei was permitted by incubating fixed cells with biz-benzimide (1/6000, Sigma). Cultures were finally mounted on glass coverslips with DakoCytomation Fluorescent Mounting Medium (Dako SA, Trappes, France) and viewed on a Leica TCS SP2 inverted confocal microscope (Leica, Mannheim, Germany). Fluoresceinyl fluorophore was excited using a 488nm argon laser; and bizbenzimide using a 700nm two photons laser. Single optical images from double labelling experiments were acquired sequentially.

Cytotoxicity of peptides and conjugates

Eight-days old cultures, plated at 80,000/100µL, were washed and treated for 1 or 2 hr with 5 µM peptides at 37°C. Lactate De-Hydrogenase (LDH) activity was measured in culture

supernatant by a single measurement at one time point with the Cytotoxicity Detection Kit (Roche Applied Biosystems). The maximum LDH release was assessed with 2% Triton X-100 and used to normalize data.

Spectral and lifetime correlated acquisitions

Due to the mono-exponential decay of GFP and their spectra compatibility, the GFP-DsRed couple is very well suited for quantitative FRET (Fluorescence or Förster Resonance Energy Transfer) determination with FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Measurements) [31 , 32]. Moreover, the t-dimer DsRed is a tandem of monomeric red fluorescent protein that matures rapidly, does not form aggregates, and has minimal emission when excited at 900nm, a wavelength optimal for GFP and minimizing the excitation of t-dimer DsRed [33].

The interaction between GFP-tagged protein and t-dimer DsRed- or mCherry-tagged protein was studied using two-photon-Fluorescence Lifetime Imaging Measurement (2P-FLIM) with the SPCM and SPC Image softwares (Becker & Hickl).

For GFP excitation, we used a two-photon pulsed excitation (890 nm), given by the Coherent Mira 900-F laser 5W (Coherent inc. Laser Group, Santa Clara, CA). All acquisitions were undertaken with a 100x, 1.4NA, Leica oil objective lens on a Leica TCS SP2 inverted confocal microscope. The laser repetition frequency was 76MHz which gave a 12ns temporal window for lifetime measurements. Photon detection was performed in cells using the SPRC160, a homemade system based on a 16 channel multi-anode photomultiplier head (PML16, Becker&Hickl) and a concave holographic grating allowing spectral dispersion on the detector. The Becker & Hickl TCSPC 730 card (Becker & Hickl, Berlin, Germany) determined the time between fluorophore excitation and photon emission, as well as routing information associated to spectral range. This card was driven by the SPCM software which allowed fluorescence decay curve measurements using a single-spot mode; and fluorescence decay curve fits, allowing lifetime determination were obtained using the SPC Image software (both software from Becker & Hickl). The choice between mono-exponential decay and bi-exponential decay fitting was done using the reduced $\chi 2$ parameter. Lifetime values were extracted from three spectral channels, from 494 to 542nm, and averaged. To ensure reliability of our measurements, we checked the lifetime stability upon this spectral range. As a second control, the first channels were used to ensure no autofluorescence in measured cells, which otherwise could result in artefactual FRET positive response.

Patch Clamp

Experimental set-up

For voltage-clamp recordings, 8 to 10 days-aged cultured spinal neurons on their coverslip were submerged in normal Krebs solution containing 130.5 mM NaCl, 2.4 mM KCl, 2.4 mM $CaCl_2$, 19.5 mM $NaHCO_3$, 1.3 mM $MgSO_4$, 1.2 mM KH_2PO_4, 1.25 mM HEPES, 10.0 mM glucose, pH 7.4, equilibrated with 95% O_2 and 5% CO_2, at room temperature (20-23°C). The coverslip was placed in a chamber and visualized by means of infrared DIC video-microscopy using an upright microscope BX51WI (Olympus France, Rungis, France) equipped with a 40x water immersion lens (LUMPlanFI/IR), and a CCD camera C2400-03 (Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan). t-dimer DsRed-14-3-3ζ transfected cultures were observed using a mercury lamp with the appropriate filter. The culture was continuously superfused with Kreb solution at 1.6 mL mn^{-1}. Series resistance was negligible. Patch pipettes (9-11 MΩ) were filled with 120 mM potassium gluconate, 20 mM KCl, 0.1 mM $CaCl_2$, 1.3 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 10 mM HEPES, 0.1 mM GTP, 0.2 mM cAMP, 0.1 mM leupeptin, 3 mM Na_2-ATP and 77 mM D-mannitol, pH 7.3. Cs^+ (500 µM) was added to a modified perfusion medium containing 124.0 mM NaCl, 3.6 mM KCl, 2.4 mM $CaCl_2$, 1.3 mM $MgCl_2$, 26.0 mM $NaHCO_3$, 1.25 mM HEPES, 10.0 mM glucose.

Data analysis

Voltage measurements were corrected for liquid junction potential. Baclofen-induced currents were obtained using membrane potential ramps and a subtraction procedure. *I–V* relationships were obtained during ramps from -40 to -140 mV over 1 sec. Currents were averaged from four successive responses. Baclofen-induced currents were isolated by subtracting currents in control saline from currents in the presence of the GABAB agonist, and, because of the individual variability, was expressed in percentage of control ($I_{\text{Baclofen}} = (I_{I\text{-}V,\text{Baclofen}} - I_{I\text{-}V,\text{acsf}}) / I_{I\text{-}V,\text{acsf}} *100$). For determination of inward rectification, membrane current was measured at two membrane potentials equidistant (V_m ±25 mV, dotted lines in Fig. 6A2) from the measured reversal potential (E_{rev}). A total baclofen response was also taken as the difference in Baclofen currents measured at -40 and -130 mV: ($I_{\text{Baclofen-40}}$) – ($I_{\text{Baclofen-130}}$). Mean values are given ±SEM. Statistical analysis was performed on the raw data.

Animal models and behavioural tests

Wistar rats was used for *in situ* hybridization (n = 15), immunohistochemistry with light (n = 30), and electron (n = 9) microscopy, Western Blot experiments (n = 12), qRT-PCR measurements of 14-3-3ζ mRNA (n = 15) and 14-3-3η mRNA (n = 6), GTP binding studies (n = 15), behavioural experiments (n = 40), and locomotor testing (n = 15). To evoke

persistent neuropathic pain in rats, the L5 and L6 spinal nerves were isolated and tightly ligated with 6-0 silk thread just distal to the dorsal rot ganglia. The muscle and skin were sutured and the wound treated with topical antibiotics. Rats unable to withdraw the right hindlimb postoperatively, indicating damage to the L4 spinal nerve, were not considered. In sham-operated animals, the spinal nerve was exposed but the L5 and L6 spinal nerves were not ligated.

Mechanical response thresholds were monitored in SNL, sham-operated, and naive (non-operated) animals at one day before surgery, and at days 7 and 14 (Western Blot, *in situ* hybridization and electron microscopy), or at days 12 or 14 (vehicle injection, Baclofen injection), and 15 (24 h after the last siRNA injection or intrathecal injections of peptide conjugates). Rats were placed in the testing cage one hour before the test for habituation. The withdrawal threshold of the leg on the operated side was determined in response to mechanical stimuli applied to the plantar surface of the foot. The limb withdrawal threshold was measured by an electronic device (Bioseb, France) that was derived from Von Frey filaments [34, 35].

***In situ* hybridization**

SNL, sham-operated, and naive animals (n = 5 in each group) were deeply anesthetized, decapitated. The lumbar dorsal root ganglia and spinal cord were rapidly dissected out, frozen on dry ice, cut at 14µm thickness on a cryostat (Microm, Heidelberg, Germany) and thaw-mounted onto Super-Frost Gold slides (CML, Nemours, France).

Three 50-mer oligonucleotide probes complementary to 14-3-3ζ mRNA (Eurogentech, Seraing, Belgium) were chosen in regions presenting few homologies with sequences of related mRNAs. They were designed as follows from the published gene sequence [36]:

5'GCAGCGGTGGCGGCGAGGCTGAGACTCTGTCCCTGATCTGGCTGCTCACA3';

5'CTGGCCCTTCTGAAGCCACAATGGACCAAAAGTACTAACTATGCCAAACA3';

5'CAGCCTCACAAGTGCTCCAAGCCTTACAGTACCCACACAGACTACACTCA3'.

Sections were then processed for *in situ* hybridization using ^{35}S-dATP (Amersham)-labeled oligoprobes as described elsewhere [37, 38, 39]. After hybridization and rinsing, sections were covered with Kodak Biomax MR films (Kodak, Rochester, NY) for 3 weeks. The autoradiographic films were then developed and processed for quantitative analysis. The intensity of *in situ* hybridization signal was measured by densitometry on films with Image J software (Courtesy of Wayne Rasband, NIH, USA) as described previously [38]. Results were expressed as the percentage of the corresponding spinal cord area in sham animals ± SEM. Images were taken from the autoradiographic films in order to give an overview of the labeling throughout the entire spinal cord section. Other sections were dipped into K5 Ilford

nuclear emulsion (Ilford, Mobberly, Cheshire, UK) and exposed for 5 weeks before being developed, mounted in glycerol and analysed in a Axiophot 2 microscope (Zeiss, Jena, Germany) equipped with a dark-field condenser. Images were collected with a CoolSnap CF digital camera (Roper Scientific, Evry, France). Controls sections were hybridized with an excess (100-fold) of non-labeled oligoprobes.

Sections form dorsal root ganglia and spinal cord were counter-stained with Cresyl-violet and grain counting was performed according to previously published protocols [40] (n = 18 cells in each conditions).

Immunohistochemistry on tissue sections

Naive rats, sham rats, and i-Fect injected, or anti-14-3-3ζ siRNA injected neuropathic rats were perfused with 4% paraformaldehyde. For electron microscopy, glutaraldehyde (0.1 %) was added to the fixative solution. The lumbar spinal cord was rapidly dissected out, and post-fixed for 2hr in 4% paraformaldehyde. Tissue samples were then processed for light or electron microscopy.

For light microscopy, frozen sections were cut at 14µm thickness on a cryostat (Microm) and thaw-mounted onto Super-Frost Gold slides (CM), and processed for double-fluorescent labeling experiments. Sections were incubated overnight at 4°C with guinea pig anti-GABAB2, directed against the C-terminal amino acids of the receptor subunit (1/500, Chemicon, Temecula, CA), or goat anti-GABAB1b (1/500, gift from Dr. A. Calver) [41] and rabbit anti-14-3-3ζ (1/1000; Santa Cruz Biotechnology). Subsequently, GABAB2 and GABAB1b were visualized with a tyramide-based method [42] using Cy5-conjugated tyramide (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA) and 14-3-3ζ was detected with an Alexa488 donkey anti-rabbit secondary antibody (Molecular Probes Inc., Eugene, OR).

Other double labeling experiments were carried out on tissue sections. B1/B2 were co-detected with a double, sequential tyramide protocol. Guinea-pig anti-B2 antibody was first detected with biotinylated anti-guinea-pig secondary antibody (Vector, Burlingame, CA, 1/200), peroxidase-conjugated streptavidin (Perkin-Elmer, 1/200) and subsequent Cy5-conjugated tyramide (Perkin-Elmer). Remaining peroxidase was inhibited with hydrogen peroxide (1% in PBS for 10 min). Rabbit anti-B1 antibody was then visualized with a peroxidase-conjugated swine anti-rabbit antibody (Dako, 1/100) and FITC-conjugated tyramide (Perkin-Elmer).

For the co-detection of 14-3-3ζ and VGLUTs, rabbit anti-14-3-3ζ and guinea-pig anti-VGLUTs were detected with Alexa488 goat anti-rabbit secondary antibody (Molecular Probes, 1/500) and biotinylated anti-guinea-pig secondary antibody followed by Alexa568-conjugated streptavidin (Molecular Probes, 1/500), respectively.

For the double detection of rabbit anti-14-3-3ζ and mouse anti-GAD65, -synaptophysin, or -CGRP, Alexa488 goat anti-rabbit secondary antibody was co-incubated with Alexa568 goat anti-mouse secondary antibody (Molecular Probes, 1/500).
Sections were viewed with confocal microscope Leica TCS SP2 (Mannheim, Germany). Images were collected with a CoolSnap CF digital camera (Roper Scientific, Evry, France). Quantification of B1/B2 double labeling in sham, and neuropathic rats injected with i-Fect or anti-14-3-3ζ siRNA, was assessed using the Metamorph software (Roper Scientific) as previously described [2, 43].

For electron microscopy, several hydrophobic or hydrophilic embedding media have been tested. The best results were obtained with Lowicryl® HM20 resin (EMS, Hatfield, PA). Vibratome sections were cut at 200µm thickness and samples of deep spinal cord laminae (V-VI) were embedded with the progressive lowering of temperature method, using the Reichert AFS system (Leica, Wien, Austria) according to the instruction manual. Ultrathin sections from Lowicryl blocks were collected on butvar coated single-slotted nickel grids (EMS) and submitted to postembedding immunogold multiple labeling [44]. GABAB receptor subunits and 14-3-3ζ protein were detected by using the same primary antibodies as for light microscopy and visualized with the appropriate colloidal gold-conjugated detection systems (BBI, Cardiff, UK; EMS). GABAB1b, GABAB2 and 14-3-3ζ were visualized with 5, 10 and 15nm colloidal gold particles, respectively. Gold particles were rapidly fixed for 1min in 1% glutaraldehyde diluted in water. After rinsing, grids were finally stained with 2% uranyl acetate in water for 12min and examined with a TECNAI electron microscope (FEI, Eindhoven, Netherlands) equipped with a MegaView II CCD camera (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany).
To better assess changes in the co-distribution of GABAB subunits and 14-3-3ζ, we measured the distance "d" between gold particles (d<45nm). The distance between gold particle pairs were measured on digitalized micrographs (magnification X80000) with Image J software (around 100 measurements in each condition). Results were expressed as the mean distance (nm) between pairs ± SEM.

Control experiments

Antibody specificity was assessed by pre-adsorption experiments and by omitting the primary antibodies in immunohistochemistry experiments for both light and electron microscopy. No signal was observed in these conditions (Fig. S8A, c, f and i).

The specificity of the *in situ* hybridization experiment was confirmed by incubating the sections with an excess of non-labeled probes (100 fold) in the hybridization buffer. This results in a complete abolition of the labeling (Fig. S8B).

GTPγS binding studies

GTP binding assays were carried out as previously described [45] with some modifications. Briefly, tissue sections were air-dried for 15 min and then incubated in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl2, 0.2 mM EGTA, 100 mM NaCl and 3 mU/mL adenosine deaminase (pH 7.4) for 20 min at room temperature. Afterwards, a second incubation was carried out with the same buffer supplemented with 2 mM GDP and 1 mM DTT for 20 min.

Finally, sections were incubated in [35S]GTPγS (0.04 nM) for 2 h at 30 °C. Slides were rinsed twice in cold Tris buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4) for 5 min, dipped in deionized water and dried. Non-specific binding was determined in the presence of 10 µM GTPγS. The assay was performed on slides without (basal binding) or with Baclofen (1 µM). The Baclofen-stimulated binding was measured by adding 1 µM of agonist. Tissue sections were washed twice in a buffer 50 mM Tris-HCl dried and exposed to a Kodak Biomax MR film with a set of 14C standards for 4 days. Data were expressed as percentage of agonist-stimulated binding over basal activity (100%).

***In vivo* intrathecal injections and mechanical allodynia**

The catheter (PE-10; Phymep, France) was inserted into the subarachnoid space. The tip of the intrathecally implanted catheter was pushed forward to the L4-L5 region. The external portion of the catheter was placed under the skin up to the neck [46]. Baclofen, RNAs (anti-14-3-3ζ siRNA or mismatch RNA), or peptides (non fluorescent pVEC-B1 (922-930) or pVEC alone) were injected using a Hamilton syringe connected to the catheter. Reagents were delivered in a 10µL solution immediately followed by a 15µL physiological saline to flush the catheter. RNAs were injected daily from day 12 to day 14 according to a published protocol [47] and Neuromics instructions (Neuromics, Northfield, MN).

The procedure schedules are presented in Fig. S10. Rats were tested for mechanical allodynia before surgery (day -1). The threshold to mechanical stimulation was monitored again in sham-operated and SNL animals 12 (RNA treatment) or 14 (peptide conjugate treatment) days after surgery (day 12 or 14, reference value set to 0%). In the following, mechanical threshold was measured 1h after each injection. The measurements were normalized to the reference value and expressed as percentage of changes in the mechanical threshold.

i. Vehicle (10 µL i-Fect reagent or saline solution) was injected alone
ii. Baclofen (1µg in 10µL; Sigma) was injected on day 12 or 14.

iii. Then, either RNAs (2 µg in 10 µL i-Fect reagent) was injected daily for three days between day 12 and day 14, or peptide conjugates (10 µL of a 5 µM peptide solution), were injected once on day 15. Mechanical threshold was measured after 24h (day 15), or 1h (day 15), respectively.

iv. Finally, Baclofen injection was performed 1hr later, on the same day (day 15).

Open-field locomotor activity

Spontaneous horizontal locomotion, vertical activity (or rearing), and stereotyped movements were measured 15 days after the surgery in sham rats, and in neuropathic rats after i-Fect or anti-14-3-3ζ siRNA injection, using a photoelectric actimeter (Actitrack; Panlab, Barcelona, Spain), according to validated protocols [48, 49]. The apparatus consisted of a transparent cage that was connected to a photoelectric cell. Light beams detected movement, and the total locomotor activity of each rat was recorded over two sessions of 10 min each day. All testing in the actimeter was done in an isolated room between 8:00 A.M. and 1:00 P.M. Spontaneous locomotor activity was recorded during four consecutive days (two times for 10 min each). Between-session habituation was analyzed by comparing behavior in the actimeter on day 3 versus that on day 4. The first session of 10 min was considered the daily habituation. Only the spontaneous horizontal locomotor activity recorded during the second session of 10 min was used for data analysis.

ABREVIATIONS LIST

ACSF	Artificial cerebral spinal fluid
ANOVA	Analyse of variance
B1 / B2	GABAB1 / GABAB2 subunits
B1 (919-927) / B1 (922-930)	Competing peptides corresponding to amino acids 919-927 or 927-930 of the GABAB1 protein
BSA	Bovin serum albumine
CGRP	Calcitonin gene related peptide
Coloc	Colocalization
Contra / Ipsi	Contralateral / Ipsilateral to the spinal nerve ligation
C-ter / N-ter	C-terminus / N-terminus (for the coupled fluorophore position on the sequence of proteins of interest like B1, B2 or 14-3-3)
DH / VH	Dorsal horn / Ventral horn
DRG	Dorsal root ganglia
DsRed	Discosoma *sp* red fluorescent protein
EFNS	European federation of neurological societies
2P-FLIM	(Two-photon)-Fluorescence lifetime imaging measurement
FRET	Fluorescent or Förster resonance energy transfer
GABA (B)	γ-amino-butyric acid (B type receptor)
GAD65	GABA decarboxylase enzyme
GFP	Green fluorescent protein
GPCR	G protein-coupled receptor
GTPase	Guanydil tri-phosphate hydrolase
HA	Hemagglutinin
IP	Co-immunoprecipitation
IR	Immunoreactivity
ISH	*In situ* hybridization
Kir	Inwardly rectifying potassium
L5-L6	Lumbar 5^{th} and 6^{th} branches of the spinal nerve
L / IP / S	Total lysate protein band / Co-immunoprecipitated protein band / Supernatant protein band
LDH	Lactate dehydrogenase
mmRNA	Mismatch RNA
NS	Non significant
NT cells	Non transfected cells
PB / PBS	Phosphate buffer / Phophate buffer saline
pVEC	Peptide derived from vascular endothelial cadherin
qRT-PCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction
Raf	Raf protein kinase
RT	Room temperature
siRNA	Small interference RNA
SEM	Standard error of the mean
SNL	Spinal nerve ligation
Synapto	Synaptophysin
VGLUT	Vesicular glutamate transporter

SUPPLEMENTAL REFERENCES

1. Lang, J.*, et al.* Transient expression of botulinum neurotoxin C1 light chain differentially inhibits calcium and glucose induced insulin secretion in clonal beta-cells. *FEBS Lett* **419**, 13-17 (1997).
2. Laffray, S.*, et al.* Dissociation and trafficking of rat $GABA_B$ receptor heterodimer upon capsaicin treatment. *Eur J Neurosci* **25**, 1402-1416 (2007).
3. Hariton-Gazal, E., Rosenbluh, J., Graessmann, A., Gilon, C. & Loyter, A. Direct translocation of histone molecules across cell membranes. *J Cell Sci* **116**, 4577-4586 (2003).
4. Richard, J.P.*, et al.* Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem* **278**, 585-590 (2003).
5. Mukherjee, S., Ghosh, R.N. & Maxfield, F.R. Endocytosis. *Physiol Rev* **77**, 759-803 (1997).
6. Elmquist, A., Hansen, M. & Langel, U. Structure-activity relationship study of the cell-penetrating peptide pVEC. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 721-729 (2006).
7. Elmquist, A., Lindgren, M., Bartfai, T. & Langel, U. VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions. *Exp Cell Res* **269**, 237-244 (2001).
8. Holm, T.*, et al.* Studying the uptake of cell-penetrating peptides. *Nature Protocols* **1**, 1001-1005 (2006).
9. Engle, M.P., Gassman, M., Sykes, K.T., Bettler, B. & Hammond, D.L. Spinal nerve ligation does not alter the expression or function of GABA(B) receptors in spinal cord and dorsal root ganglia of the rat. *Neuroscience* **138**, 1277-1287 (2006).
10. Couve, A.*, et al.* Association of GABA(B) receptors and members of the 14-3-3 family of signaling proteins. *Mol Cell Neurosci* **17**, 317-328 (2001).
11. White, J.H.*, et al.* Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* **396**, 679-682 (1998).
12. Schuler, V.*, et al.* Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B(1)). *Neuron* **31**, 47-58. (2001).
13. Towers, S.*, et al.* GABAB receptor protein and mRNA distribution in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Eur J Neurosci* **12**, 3201-3210 (2000).
14. Bowery, N.G.*, et al.* International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma- Aminobutyric Acid(B) Receptors: Structure and Function. *Pharmacol Rev* **54**, 247-264. (2002).
15. Vigot, R.*, et al.* Differential compartmentalization and distinct functions of GABAB receptor variants. *Neuron* **50**, 589-601 (2006).
16. Bowery, N.G. GABAB receptor: a site of therapeutic benefit. *Curr Opin Pharmacol* **6**, 37-43 (2006).
17. Voisin, D.L. & Nagy, F. Sustained L-type calcium currents in dissociated deep dorsal horn neurons of the rat: characteristics and modulation. *Neuroscience* **102**, 461-472 (2001).
18. Kangrga, I., Jiang, M.C. & Randic, M. Actions of (-)-baclofen on rat dorsal horn neurons. *Brain Res* **562**, 265-275 (1991).
19. Derjean, D.*, et al.* Dynamic balance of metabotropic inputs causes dorsal horn neurons to switch functional states. *Nat Neurosci* **6**, 274-281. (2003).
20. Kontinen, V.K., Kauppila, T., Paananen, S., Pertovaara, A. & Kalso, E. Behavioural measures of depression and anxiety in rats with spinal nerve ligation-induced neuropathy. *Pain* **80**, 341-346 (1999).
21. Truong, A.B., Masters, S.C., Yang, H. & Fu, H. Role of the 14-3-3 C-terminal loop in ligand interaction. *Proteins* **49**, 321-325 (2002).
22. Calver, A.R.*, et al.* The C-terminal domains of the GABA(b) receptor subunits mediate intracellular trafficking but are not required for receptor signaling. *J Neurosci* **21**, 1203-1210 (2001).
23. Brock, C., Boudier, L., Maurel, D., Blahos, J. & Pin, J.P. Assembly-dependent Surface Targeting of the Heterodimeric GABAB Receptor Is Controlled by COPI but Not 14-3-3. *Mol Biol Cell* **16**, 5572-5578 (2005).

24. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408 (2001).
25. Landry, M., Bouali-Benazzouz, R., El Mestikawy, S., Ravassard, P. & Nagy, F. Expression of vesicular glutamate transporters in rat lumbar spinal cord, with a note on dorsal root ganglia. *J Comp Neurol* **468**, 380-394 (2004).
26. Kammerer, R.A.*, et al.* Heterodimerization of a functional GABAB receptor is mediated by parallel coiled-coil alpha-helices. *Biochemistry* **38**, 13263-13269 (1999).
27. Kuner, R.*, et al.* Role of heteromer formation in GABAB receptor function. *Science* **283**, 74-77 (1999).
28. El Far, O. & Betz, H. G-protein-coupled receptors for neurotransmitter amino acids: C-terminal tails, crowded signalosomes. *Biochem J* **365**, 329-336 (2002).
29. Hallbrink, M.*, et al.* Cargo delivery kinetics of cell-penetrating peptides. *Biochim Biophys Acta* **1515**, 101-109 (2001).
30. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275 (1951).
31. Tramier, M.*, et al.* Picosecond-hetero-FRET microscopy to probe protein-protein interactions in live cells. *Biophys J* **83**, 3570-3577 (2002).
32. Stubbs, C.D., Botchway, S.W., Slater, S.J. & Parker, A.W. The use of time-resolved fluorescence imaging in the study of protein kinase C localisation in cells. *BMC Cell Biol* **6**, 22 (2005).
33. Campbell, R.E.*, et al.* A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7877-7882 (2002).
34. Kalmar, B.*, et al.* The effect of treatment with BRX-220, a co-inducer of heat shock proteins, on sensory fibers of the rat following peripheral nerve injury. *Exp Neurol* **184**, 636-647 (2003).
35. Lever, I., Cunningham, J., Grist, J., Yip, P.K. & Malcangio, M. Release of BDNF and GABA in the dorsal horn of neuropathic rats. *Eur J Neurosci* **18**, 1169-1174 (2003).
36. Watanabe, M.*, et al.* Molecular cloning of rat cDNAs for the zeta and theta subtypes of 14-3-3 protein and differential distributions of their mRNAs in the brain. *Brain Res Mol Brain Res* **25**, 113-121 (1994).
37. Dagerlind, A., Friberg, K., Bean, A.J. & Hokfelt, T. Sensitive mRNA detection using unfixed tissue: combined radioactive and non-radioactive in situ hybridization histochemistry. *Histochemistry* **98**, 39-49 (1992).
38. Landry, M., Aman, K. & Hokfelt, T. Galanin-R1 receptor in anterior and mid-hypothalamus: distribution and regulation. *J Comp Neurol* **399**, 321-340 (1998).
39. Dobremez, E.*, et al.* Distribution and regulation of L-type calcium channels in deep dorsal horn neurons after sciatic nerve injury in rats. *Eur J Neurosci* **21**, 3321-3333 (2005).
40. Landry, M., Holmberg, K., Zhang, X. & Hokfelt, T. Effect of axotomy on expression of NPY, galanin, and NPY Y1 and Y2 receptors in dorsal root ganglia and the superior cervical ganglion studied with double-labeling in situ hybridization and immunohistochemistry. *Exp Neurol* **162**, 361-384 (2000).
41. Charles, K.J.*, et al.* Comparative immunohistochemical localisation of GABA(B1a), GABA(B1b) and GABA(B2) subunits in rat brain, spinal cord and dorsal root ganglion. *Neuroscience* **106**, 447-467 (2001).
42. Landry, M., Vila-Porcile, E. & Calas, A. Immunogold detection of co-localized neuropeptides: methodological aspects. *J Histochem Cytochem* **52**, 617-627. (2004).
43. Saavedra, L., Mohamed, A., Ma, V., Kar, S. & de Chaves, E.P. Internalization of beta-amyloid peptide by primary neurons in the absence of apolipoprotein E. *J Biol Chem* **282**, 35722-35732 (2007).
44. Landry, M., Vila-Porcile, E., Hokfelt, T. & Calas, A. Differential routing of coexisting neuropeptides in vasopressin neurons. *Eur J Neurosci* **17**, 579-589 (2003).

45. Maher, C.E., Eisenach, J.C., Pan, H.L., Xiao, R. & Childers, S.R. Chronic intrathecal morphine administration produces homologous mu receptor/G-protein desensitization specifically in spinal cord. *Brain Res* **895**, 1-8 (2001).
46. Jasmin, L. & Ohara, P.T. Long-term intrathecal catheterization in the rat. *J Neurosci Methods* **110**, 81-89 (2001).
47. Luo, M.C.*, et al.* An efficient intrathecal delivery of small interfering RNA to the spinal cord and peripheral neurons. *Mol Pain* **1**, 29 (2005).
48. Dulawa, S.C., Grandy, D.K., Low, M.J., Paulus, M.P. & Geyer, M.A. Dopamine D4 receptor-knock-out mice exhibit reduced exploration of novel stimuli. *J Neurosci* **19**, 9550-9556 (1999).
49. Belujon, P., Bezard, E., Taupignon, A., Bioulac, B. & Benazzouz, A. Noradrenergic modulation of subthalamic nucleus activity: behavioral and electrophysiological evidence in intact and 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Neurosci* **27**, 9595-9606 (2007).

SUPPLEMENTAL FIGURES

Figure S1 *B1/14-3-3ζ interactions and GABAB de-dimerization occur mainly at the plasma membrane*

A1. COS-7 cells were transfected with recombinant Flag-14-3-3ζ and either myc-B1b (upper left panel, myc-B1b/Flag-14-3-3ζ), or HA-B2 (upper right panel, HA-B2/Flag-14-3-3ζ), or both (lower panels, myc-B1b/HA-B2/Flag-14-3-3ζ).

L lanes: total lysate; IP lanes: co-immunoprecipitation

A2. Flag-14-3-3ζ labeling intensity in immunoblots of double (reference value set to 100%, myc-B1b/Flag-14-3-3ζ) and triple transfected cells (myc-B1b/HA-B2/Flag-14-3-3ζ) after immunoprecipitation with an anti-myc antibody (IP:myc). n = 3 cultures, *: $p<0.05$.

B. Confocal micrographs of neurons that were double (a) and triple (b) transfected with B1b-GFP, and t-dimer DsRed-14-3-3ζ alone (a), or in combination with HA-B2 (b). In double transfected cells, B1b-GFP (green) is mainly distributed in subcellular domains containing endoplasmic reticulum as shown by calreticulin staining (blue) (double arrowheads in a). The co-localization with t-dimer DsRed-14-3-3ζ (red) remains low (arrow in a). In contrast, in triple transfected cells, B1b-GFP (green) is not retained in the endoplasmic reticulum (arrowhead in b), but targeted to the plasma membrane where it colocalizes with t-dimer DsRed-14-3-3ζ (red) (double arrows in b). Bar: 20 µm.

C. FRET analysis has been carried out in region of interests located either in the cytosol or in a domain encompassing the plasma membrane. Overexpression of Flag-14-3-3ζ decreases the FRET efficiency between GFP-B1b et t-dimer DsRed-B2 at the plasma membrane (right) but not in the cytosol (left), showing a dissociating effect more prominent at the plasma membrane (n = 41 cells).

D1. Characterization of primary cell cultures after transfection for GFP-B1 (a, green), t-dimer DsRed B2 (b, red), and type C Botulinum toxin. To check the expression of Botulinum toxin, its target syntaxin has been detected by immunohistochemistry (d, magenta). Nuclei are stained with bisbenzimide (c, blue). Cells that co-express B1b and B2 (double arrows) do not contain syntaxin that is present in adjacent cells (arrowhead), thus confirming that Botulinum toxin is also expressed in those transfected cells, whereby disrupting syntaxin.

Bar: 10 µm

D2. FRET analysis in membrane region after Botulinum toxin expression to avoid newly synthesized heterodimers to be inserted into the membrane. In these conditions, the decrease in FRET efficiency upon 14-3-3ζ overexpression indicates that pre-formed, already inserted heterodimers are subject to de-dimerization (n = 12 cells in each condition).

Figure S2 *Anti-14-3-3ζ siRNA efficiently inhibits 14-3-3ζ expression.*

A. Dose-dependent inhibition of 14-3-3ζ expression as measured with qRT-PCR in cultured neurons.

B. Immunolabeling for 14-3-3ζ is visualized in the dorsal horn of naive rats after intrathecal injection of mismatch RNA (a, mmRNA; 2 µg in 10µL i-Fect reagent) or anti-14-3-3ζ siRNA (b, anti-14-3-3ζ siRNA; 2 µg in 10µL i-Fect reagent).

Bar: 50 µm

C. Detection of intrathecally injected fluorescent siRNA in the spinal cord (a, SC) and lumbar dorsal root ganglia (b, DRG). Staining is seen in the dorsal horn (open star) but not in the dorsal root ganglia (filled star).

Bar: 50 µm

Figure S3 *Amino acid sequences and molecular weight of the peptides designed to compete with GABAB1 for the binding to 14-3-3ζ.*

We first compared the cell penetration of competing peptides that have been modified by adding positively-charged amino acids (RRKR) at the N-ter, or by conjugating cell penetrating peptides (pVEC) with disulfide bond.

Figure S4 *Uptake of peptide conjugates in cultured neurons is a non-energy dependent, non cytotoxic mechanism*

A. Cellular internalisation of Fluo-peptides in cultured neurons. B1 (919-927) (a-d) and B1 (922-930) (e-h) sequences, either native (a, e), coupled to RRKR residues (b, f), or to pVEC (c, g) were incubated at 1µM for 1hr at 37°C. Enhanced signal was observed in the soma (arrowheads) and processes (arrows) with RRKR or pVEC modifications (b, c, f, g *vs* a, e). The positive control pVEC only (d), but not the negative control Dextran (h), was greatly internalized. Bar: 10µm.

B. Quantitative uptake of native, RRKR-coupled or pVEC-coupled B1 (919-927) or B1 (922-930) sequences and of pVEC only and Dextran only. Cellular uptake measured at 37°C (black bars), at 4°C (grey bars). Results expressed as picomoles of peptide per mg of total cellular proteins.

∗: $p<0.05$ as indicated; ∗∗∗: $p<0.001$, "pVEC" *vs* all other conditions; a and b: $p<0.001$, "pVEC-B1 (919-927) " and "pVEC-B1 (922-930)" at 37°C or at 4°C *vs* "Native" and "RRKR" sequences.

C. Fluorescent peptide (pVEC-B1 (922-930)) is taken up into neuronal soma (see DAPI-labeled nucleus in b and d) after incubation with Wortmaninn, an inhibitor of endocytosis. Bar: 20 µm.

D. No cytotoxicity is measured in cultured cells with Lactate dehydrogenase assay after incubation of either conjugates (pVEC-B1 (919-927) and pVEC-B1 (922-930)), pVEC alone (pVEC), or prior to incubation (cells only). In contrast, incubation with Triton X-100 results in a complete cell loss (Triton).

E. Disruption of B1b/14-3-3ζ interaction with pVEC-B1 (922-930) prevents the interaction of 14-3-3ζ with B1b (upper panel) but not with Raf (lower panel).

Figure S5 *GABAB receptor-mediated activation of Kir current*

Membrane currents induced by application of Baclofen were analyzed using a voltage ramp.

A. Voltage ramp-evoked currents in control ACSF (1), 25 µM Baclofen, and Baclofen (2) + CGP 55845 (50 µM) (3).

B. Voltage ramp-evoked currents in control ACSF (1), 25 µM Baclofen, and Baclofen (2) + Cs^+ (500 µM) (3).

C. In 14-3-3ζ transfected cultured spinal neurons, qRT-PCR shows that expression levels of endogenous B1 and B2 does not change significantly as compared with non transfected cells (NT cells) (n = 4 cultures).

Figure S6 *Lack of changes in 14-3-3ζ expression in the dorsal root ganglia.*

A. Quantification of 14-3-3ζ mRNA levels in the ipsilateral lumbar (L4 and L5) dorsal root ganglia of three groups of rats (n=4 in each group): Sham, neuropathic, and neuropathic with 3 intrathecal injections of anti-14-3-3ζ siRNA. No significant change was noticed after spinal nerve ligation despite a slight decrease of 14-3-3ζ expression. Similarly, no modification was induced by intrathecal injections of anti-14-3-3ζ siRNA.

B. *In situ* hybridization to 14-3-3ζ mRNA in contralateral (a) and ipsilateral (b) L5 dorsal root ganglia. Sensory neurons exhibit a similar labelling intensity.

C. Quantification of the *in situ* hybridization signal by grain counting in sections of contralateral (black) and ipsilateral (grey) lumbar dorsal root ganglia. No changes in the labelling intensity was found (n = 18 cells in each group).

Figure S7 *Expression levels of endogenous B1, B2, and 14-3-3η in neuropathic rats.*

A. No change was detected with qRT-PCR in the expression of B1 (A1., n=11 rats) and B2 (A2., n=10 rats) at 7 days after spinal nerve ligation.

B. No increase was found in the expression of 14-3-3η, another B1-binding isoform of the 14-3-3 family (n=5 rats). On the contrary, a slight but significant decrease in 14-3-3η expression was shown at 7 days after spinal nerve ligation.

D. When overexpressed in cultured neurons, 14-3-3η did not affect the FRET efficiency between GFP-B1 and t-dimer DsRed B2 (n = 8 cells).

Figure S8 *GABAB subunits and 14-3-3ζ protein are co-expressed in spinal neurons.*

A. Double immunohistochemical labeling for GABAB subunits (red; a, d and g) and 14-3-3ζ (green; b, d and f) in spinal cord sections of naive rats. B2 subunit (a) and 14-3-3ζ proteins (b) are co-expressed in the deep and superficial (arrows) laminae of the spinal cord. However, staining appears weaker for 14-3-3ζ in lamina I whereas it remains intense for B2 (double arrowheads in a and b). At higher magnification, B2 (d) and B1b (g) subunits colocalize with 14-3-3ζ (e and h) in cell bodie of lamina V deep dorsal horn neurons (arrows).

No labelling was observed in control experiments as shown for B1 (c), B2 (f) and 14-3-3ζ (i).

Bar: 50 µm in b (same in a), and c (same in f and i); 25 µm in e and h (same in d and g).

B. In situ hybridization control experiments show no labelling in the dorsal horn of the spinal cord (DH, a), nor in the dorsal root ganglia (DRG, b).

Figure S9 *Relative distribution of 14-3-3ζ and markers of presynaptic terminals*

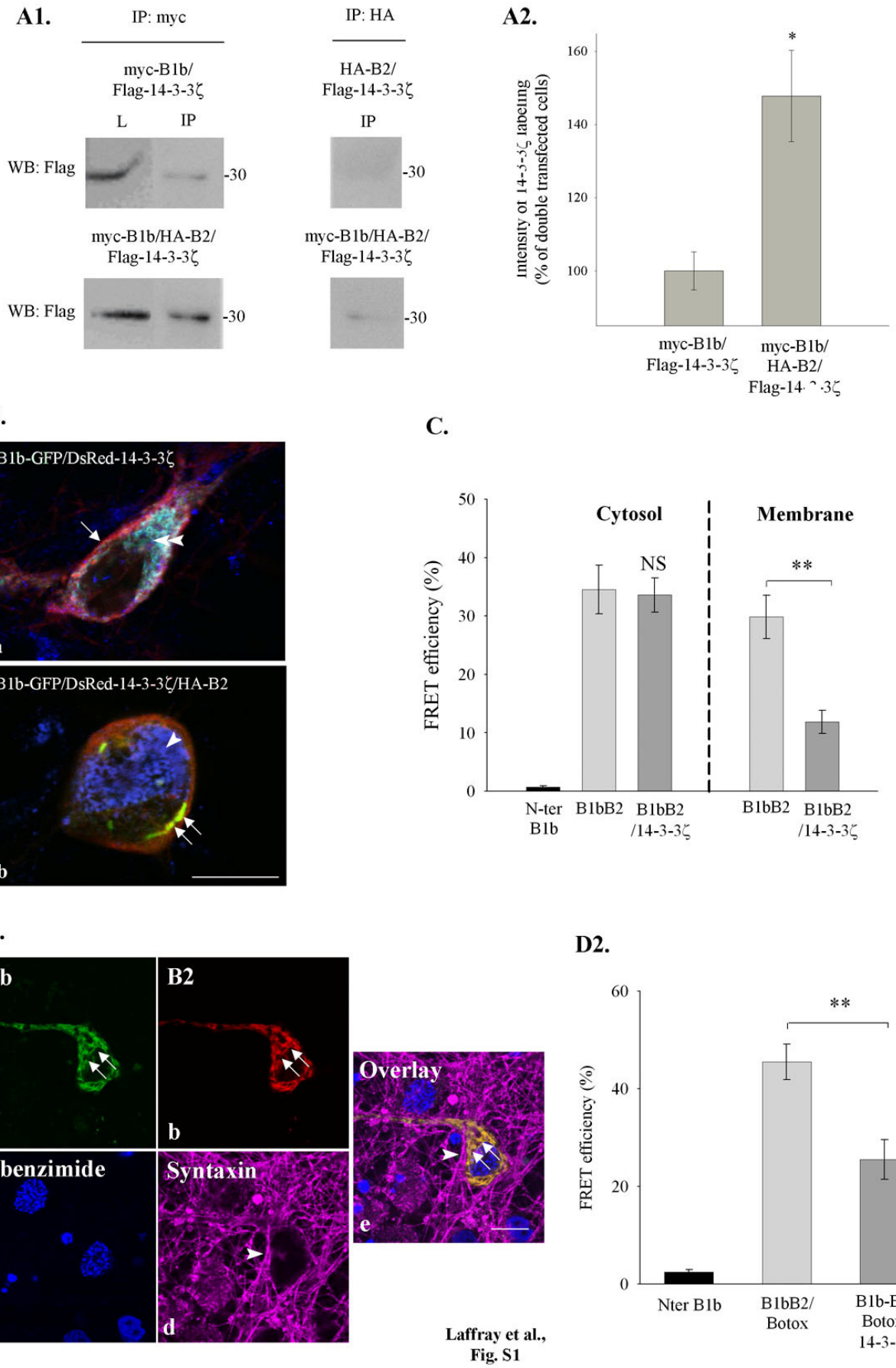
Double immunohistochemical labelling has been carried out in the superficial laminae of the dorsal spinal cord. 14-3-3ζ has been co-detected with synaptophysin, a classical presynaptic protein (a to c), the vesicular glutamate transporters 1 and 2 (VGLUT) (d to f), the GABA synthesis enzyme GAD65 (g to i), and the marker of peptidergic nociceptive afferents CGRP (j to l). In all case, 14-3-3ζ (arrows in a, d, g and j) shows only very little colocalization with any of these markers (arrowheads in b, e, h and k).

Bar: 20 µm.

Figure S10 *Schedules for the experiments of pain behaviour after in vivo intrathecal injection of RNA (**A**) and peptide conjugates (**B**) and for the analysis of spontaneous locomotor activity (**C**).*

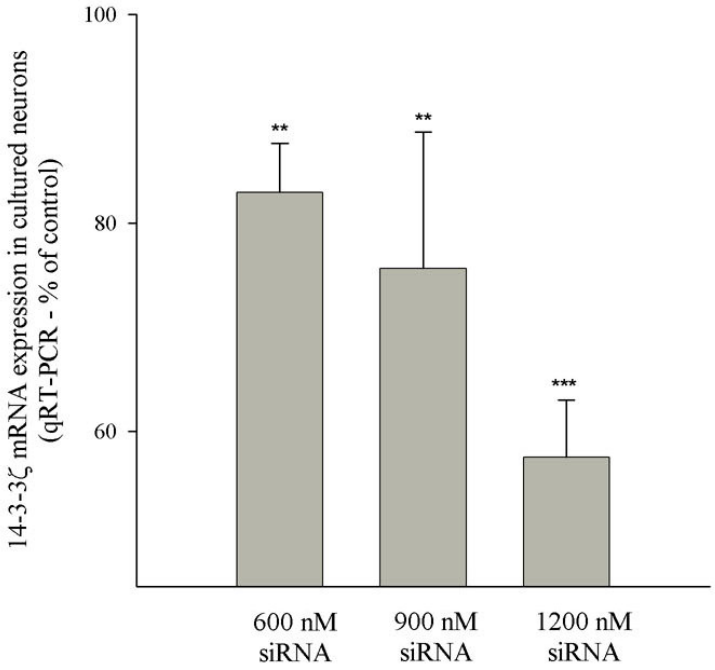
Figure S11 *Open Field locomotor activity*

The spontaneous locomotor activity has been tested using a photoelectric actimeter at 12 days after surgery in three groups of rats (n = 5 in each group): sham, neuropathic with repetitive iFect injection, neuropathic with repetitive injections of anti-14-3-3ζ siRNA. Spinal ligation induces a decrease of beam crossings. In contrast, the injection of anti-14-3-3ζ siRNA restored an activity similar to that of sham animals.

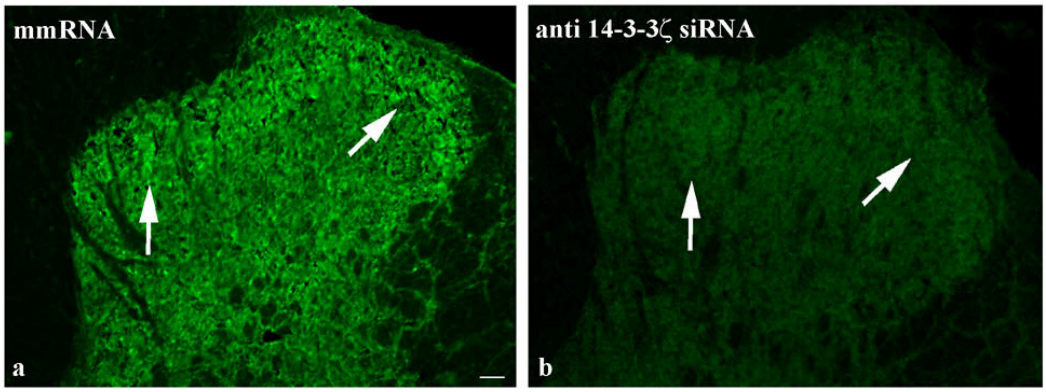


Laffray et al., Fig. S1

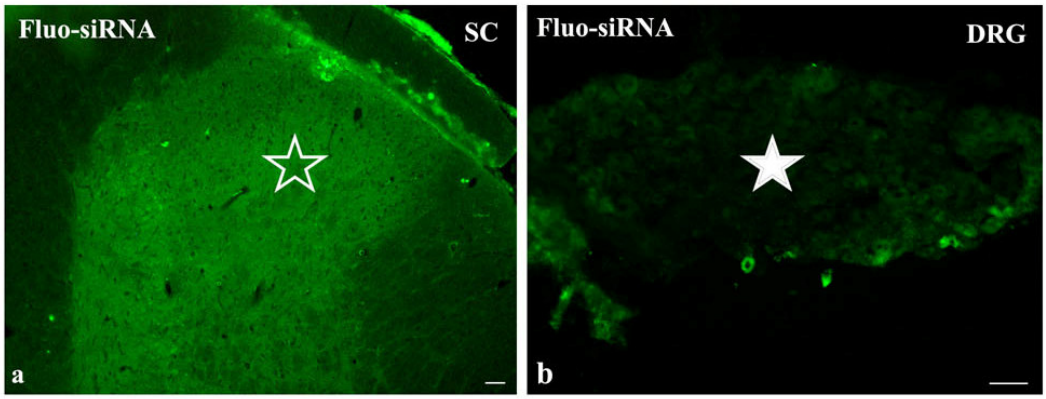
A.



B.



C.

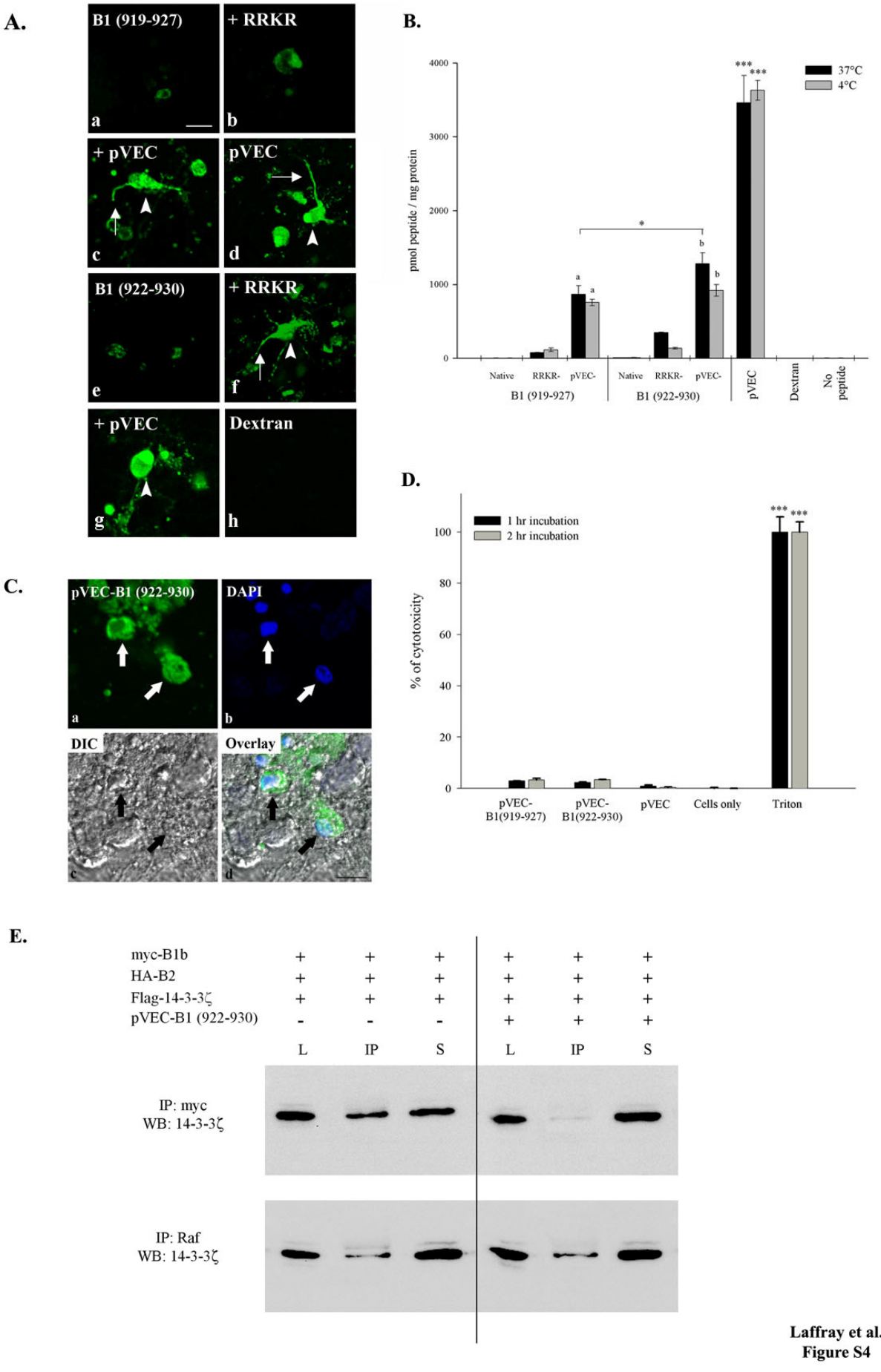


Laffray et al.
Figure S2

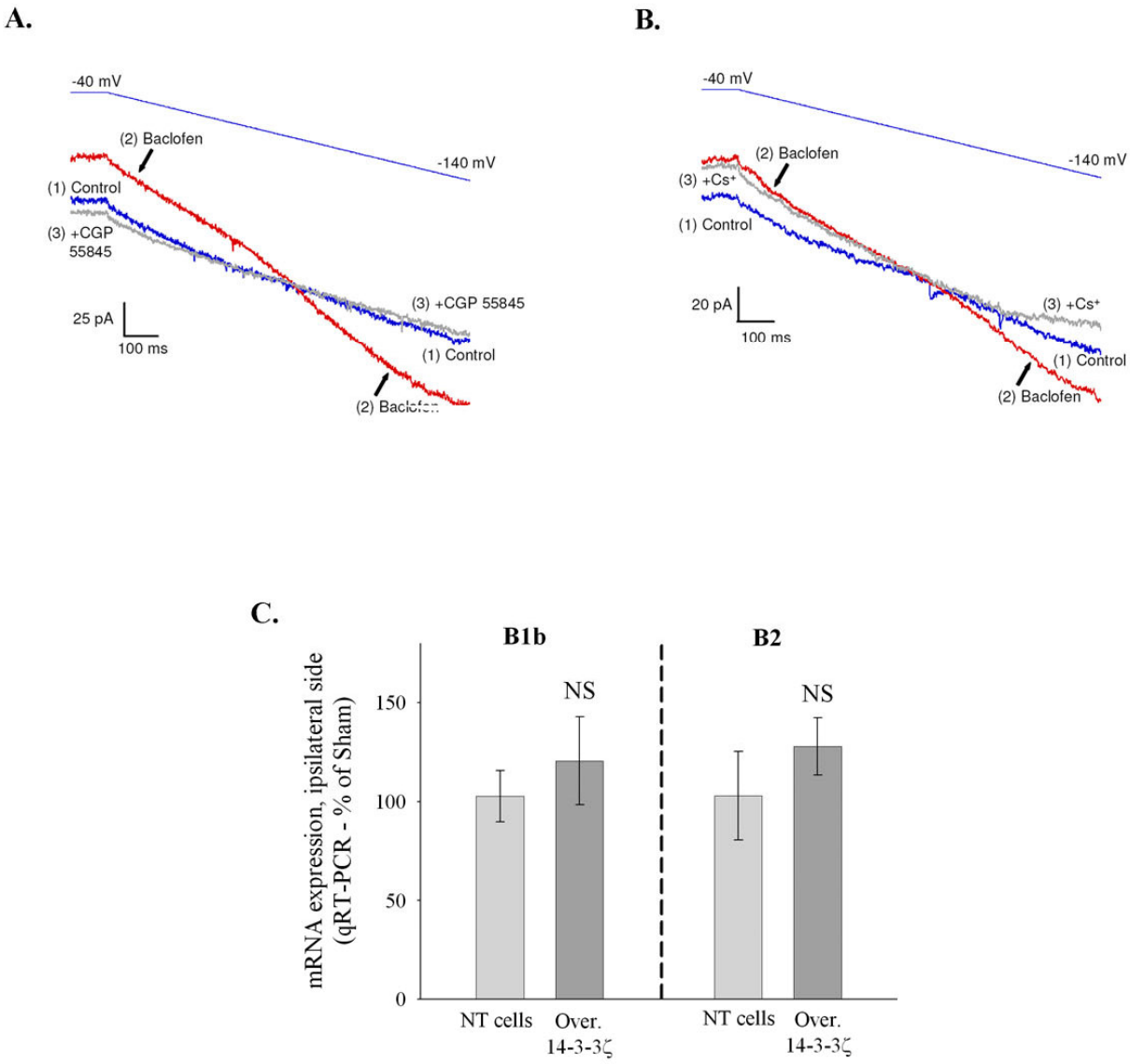
Full name	Sequence	M.W. (g/mol)
pVEC	(Fluo)-LLIILRRRIRKQAHAHSK -amide	2569
B1 (919-927)	(Fluo)-QQLRSRRHP-amide	1535
Arg-Arg-Lys-Arg-B1 (919-927)	(Fluo)-RRKRQQLRSRRHP-amide	2131
B1 (922-930)	(Fluo)-RSRRHPPTP-amide	1461
Arg-Arg-Lys-Arg-B1 (922-930)	(Fluo)-RRKRRSRRHPPTP-amide	2057
pVEC-B1 (919-927)	(Fluo)-G-Cys-G-QQLRSRRHP-amide | S-S | Cys-LLIILRRRIRKQAHAHSK -amide	4060
pVEC-B1 (922-930)	(Fluo)-G-Cys-G-RSRRHPPTP-amide | S-S | Cys-LLIILRRRIRKQAHAHSK -amide	3986

Amino acid sequences and molecular weight of synthetic competing peptides

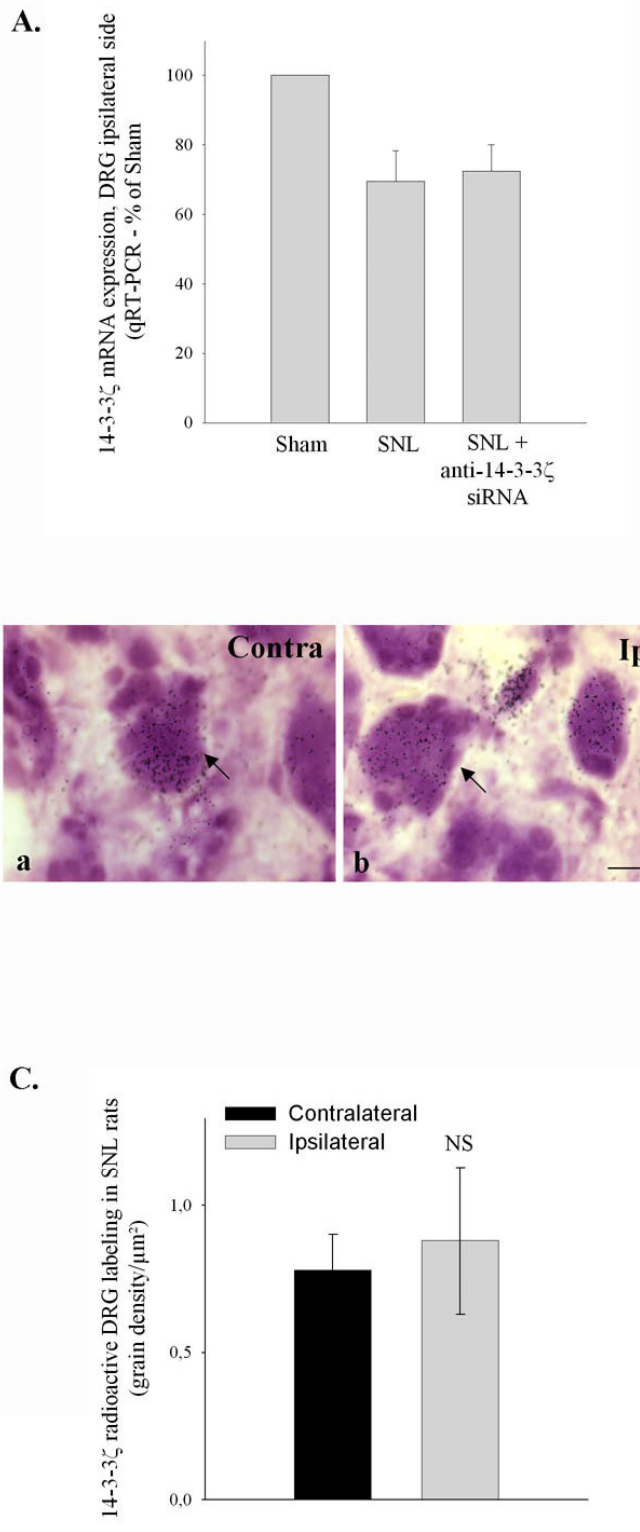
Laffray et al.
Figure S3



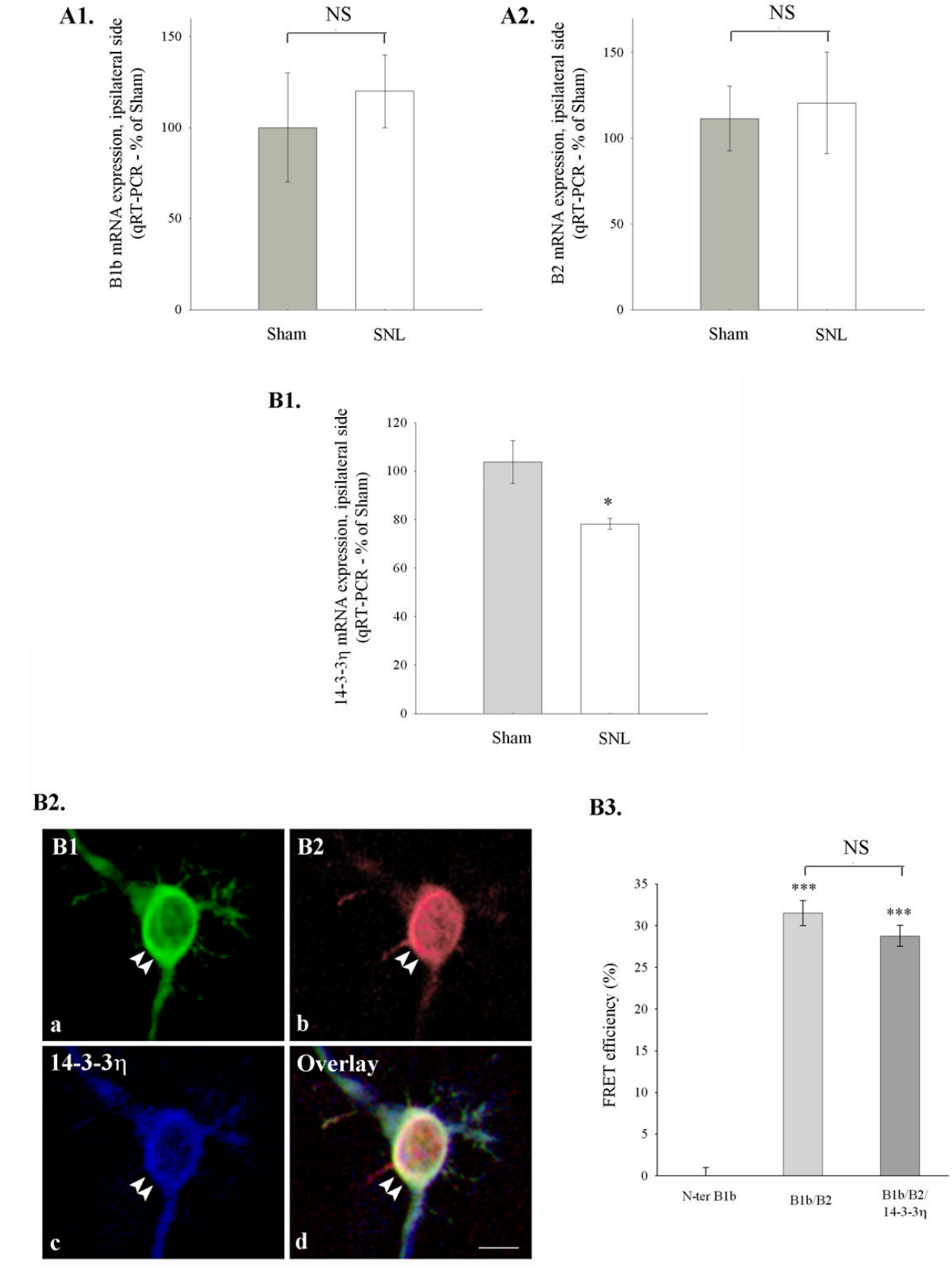
Laffray et al.
Figure S4



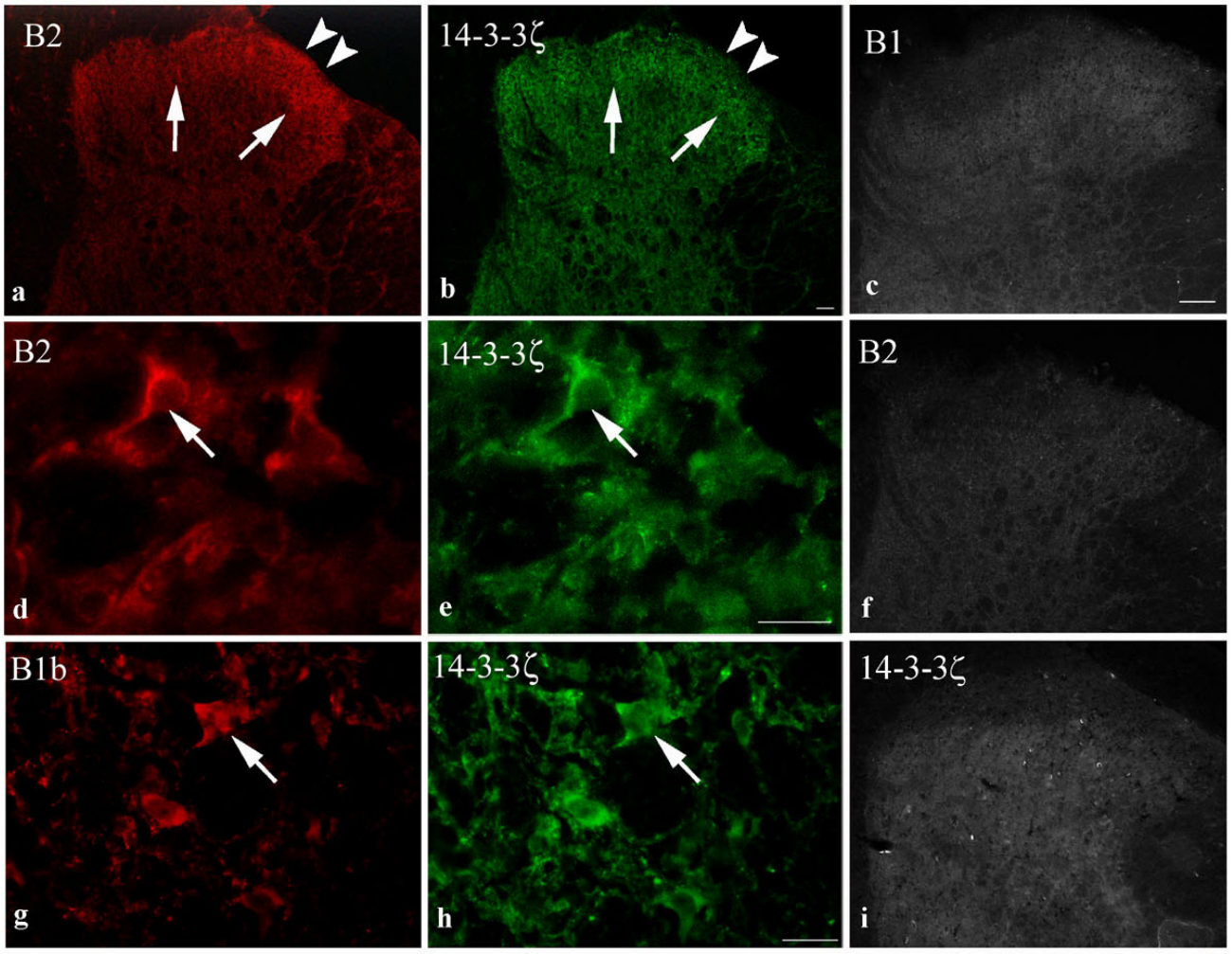
Laffray et al.,
Fig. S5

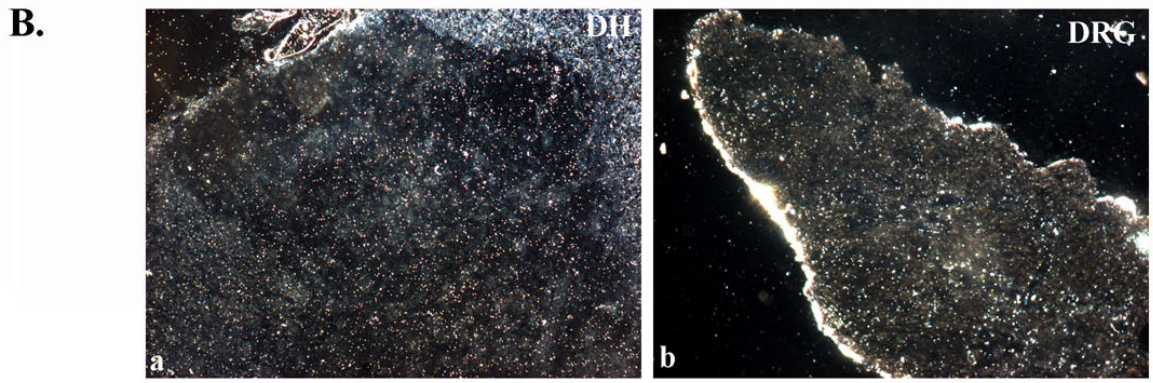


Laffray et al.,
Fig. S6

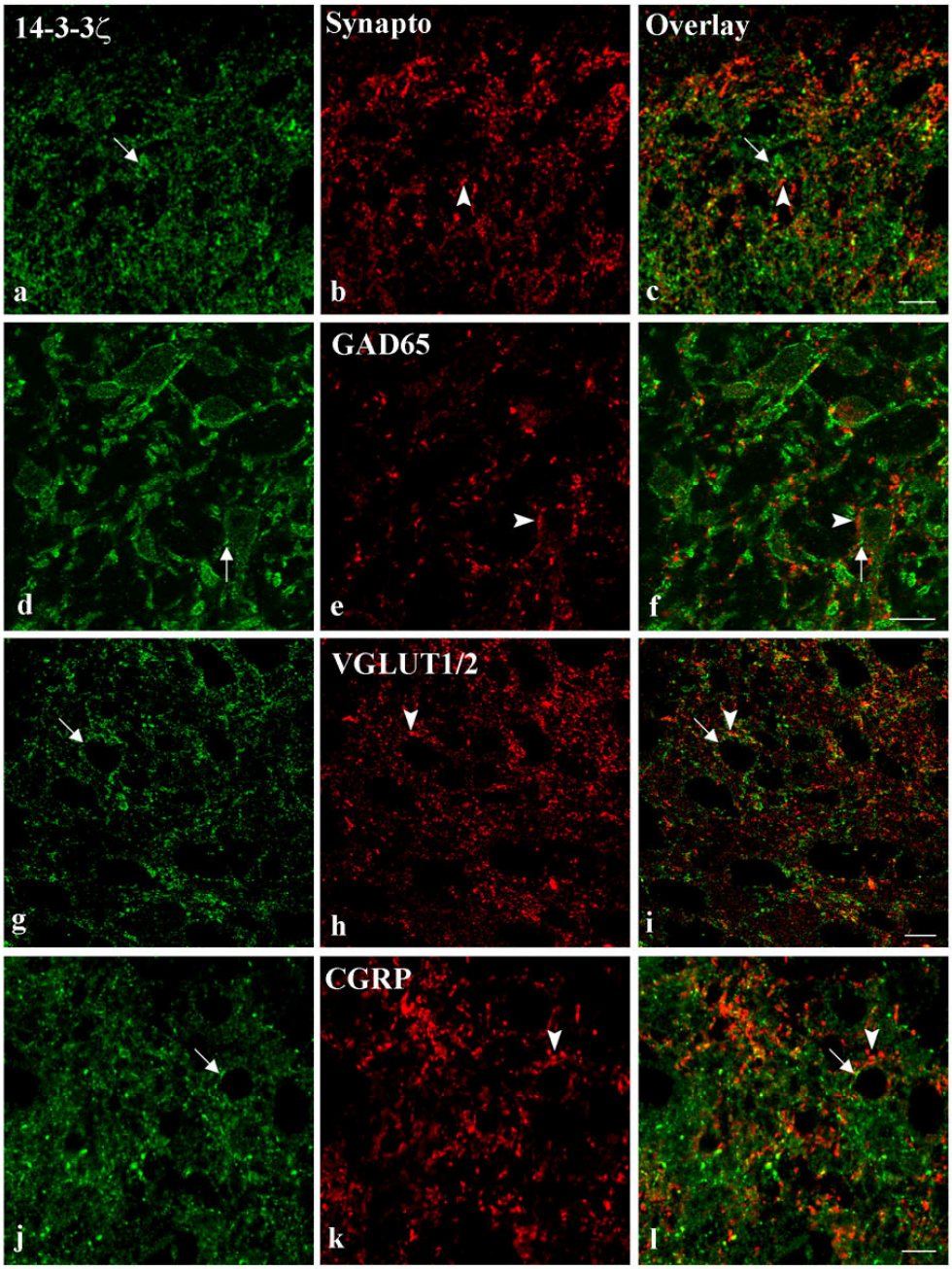


Laffray et al.,
Fig. S7



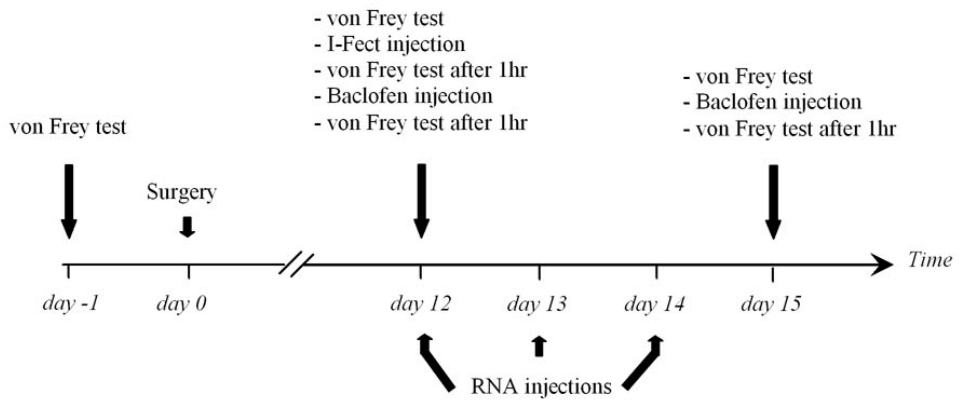


Laffray et al.,
Fig. S8

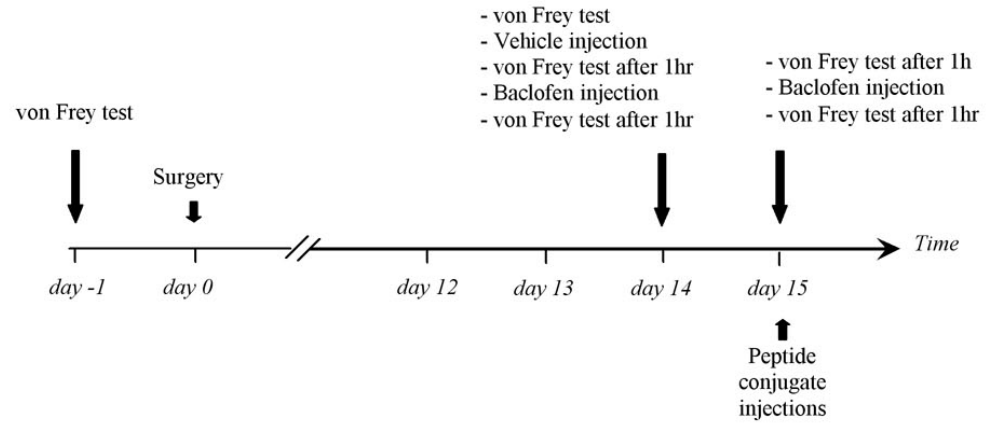


Laffray et al.,
Fig. S9

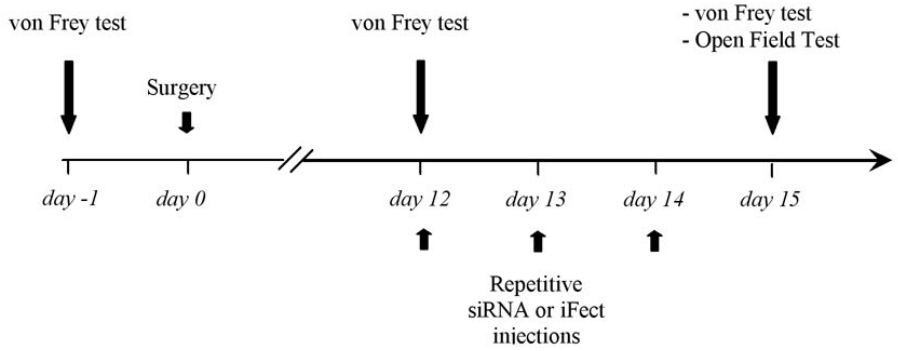
A. Intrathecal injections of anti-14-3-3ζ siRNA and mismatch RNA



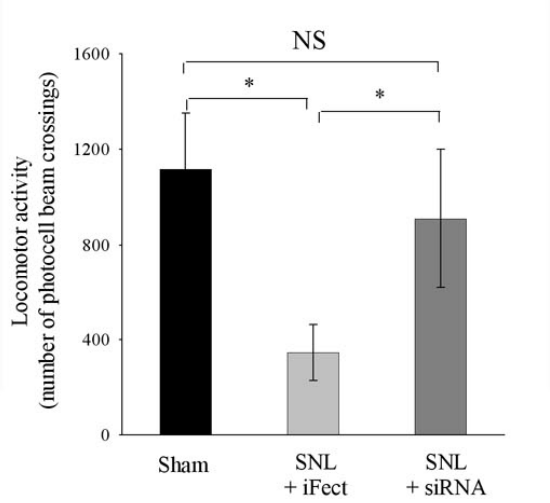
B. Intrathecal injections of pVEC-B1 (922-930) and pVEC alone



C. Open Field analysis after intrathecal injections



L affray et al.
Fig. S10



L affray et al.
Fig. S11

Ce projet a visé à restaurer l'inhibition GABAergique en conditions de douleurs neuropathiques, à l'aide de peptides de compétition susceptibles de lier la protéine 14-3-3ζ et ainsi de l'empêcher de dissocier l'hétérodimère $GABA_B$.

Dans cette étude, nous avons montré que (1) les peptides testés pénètrent dans le soma et les prolongements des cellules neuronales par une voie indépendante de l'endocytose, avec une nette préférence pour ceux couplés au CPP (pVEC), (2) ils ne présentent pas de toxicité cellulaire *in vitro,* (3) ils présentent l'avantage de cibler spécifiquement l'interaction B1b/14-3-3ζ tout en laissant la protéine 14-3-3ζ disponible pour ses nombreux autres partenaires protéiques tels que Raf, (4) ils restaurent de façon partielle l'état hétérodimérique du récepteur $GABA_B$ *in vitro,* (5) des injections intrathécales de ces peptides réversent partiellement l'allodynie mécanique chez des rats neuropathiques.

En conclusion, nous pouvons imaginer utiliser ce type d'approche pour concevoir des molécules bioactives stables, peu dégradées en contexte cellulaire, pour un effet à long terme sur un système donné, et même une façon de les administrer par voie systémique pour un confort d'utilisation. Cependant, il reste à les tester en injections chroniques afin de voir leurs effets à plus long terme. De plus, il faudrait aussi tester la durée d'efficacité de ces peptides.

Nous discuterons des avantages d'une « down-régulation fonctionnelle » et des « cell-penetrating peptides » (CPP) en tant qu'agents thérapeutiques potentiels dans la discussion générale de ce manuscrit.

PUBLICATION II

PRESENTATION

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au rôle de la fibuline-2, une protéine de la matrice extracellulaire, sur l'activation du récepteur $GABA_B$ en conditions de douleurs neuropathiques. Cette protéine se lie spécifiquement aux domaines « Sushis » présents uniquement en N-terminal de la sous-unité B1a et non B1b (Blein et al. 2004) **(Figure 1).**

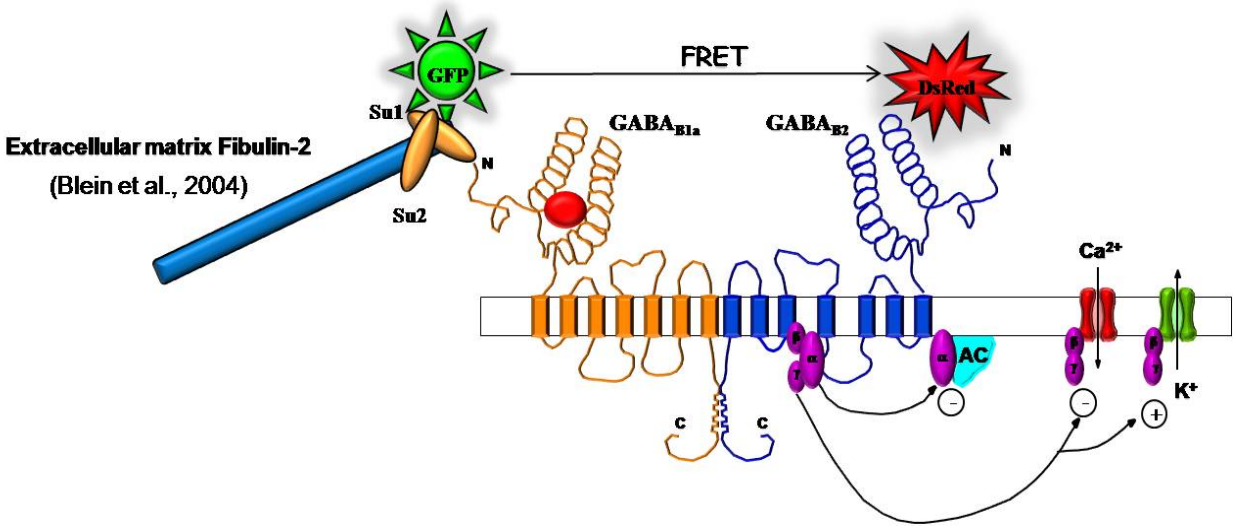


Figure 1: Structure du récepteur métabotropique $GABA_B$ et de ses cibles intracellulaires. L'activation du récepteur hétérodimérique est quantifiée par des mesures d'interaction de fluorescence (FRET) entre les sous-unités $GABA_{B1a}$ et $GABA_{B2}$ couplées respectivement en N-ter à deux fluorophores différents, la GFP et la DsRed. La fibuline-2 se lie aux domaines « Sushis » en N-terminal de B1a.

Il est bien admis que le récepteur $GABA_B$ existe sous deux états conformationnels, une configuration dite ouverte ou au repos, et une configuration dite fermée ou active. Cette dernière se produit lorsque le ligand se fixe sur la sous-unité B1 entraînant un changement de conformation du récepteur (Pin et al. 2004) **(Figure 2).** Dans cette étude, nous avons mesuré l'état d'activation du récepteur $GABA_B$ par des variations d'efficacité de FRET. En effet, lorsque les cultures dissociées de neurones transfectées avec B1a-GFP et B2-DsRed sont traitées par le baclofène, le changemement de conformation du récepteur qui s'ensuit va entraîner un rapprochement entre les deux sous-unités et cela va par conséquent se traduire par une augmentation de l'efficacité de FRET **(Figure 2).**

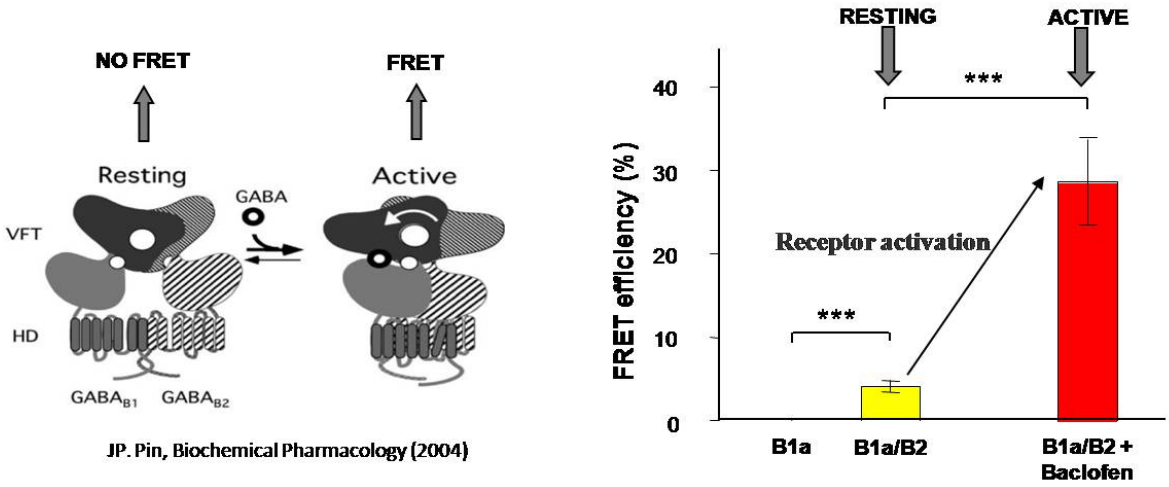


Figure 2: L'activation du récepteur est mesurée par des variations d'efficacité de FRET entre $GABA_{B1a}$-GFP et $GABA_{B2}$-DsRed, transfectées dans des cultures dissociées de neurones. En présence de baclofène (agoniste du récepteur), l'efficacité de FRET augmente entre les deux sous-unités traduisant un changement de conformation et une activation du récepteur $GABA_B$.

Par cette technique de FRET, nous avons montré dans un premier temps que la fibuline-2 altère l'activation du récepteur induite par son agoniste (baclofène). Pour cela, nous avons utilisé deux stratégies, la première utilisant des siRNA anti-fibuline-2 pour diminuer l'expression de la protéine, et l'autre consistant à augmenter la concentration de cette dernière en l'appliquant directement de façon exogène dans le milieu de culture. Nous avons ensuite mesuré l'efficacité de FRET entre B1a-GFP et B2-DsRed en fonction de doses croissantes de baclofène.

De plus, nous avons confirmé les conséquences de la fibuline-2 sur la signalisation du récepteur $GABA_B$ en réalisant des expériences de GTPgammaS en collaboration avec l'équipe de Rafael Rodriguez-Puertas (Bilbao, Université du Pays Basque, Espagne).

Par ailleurs, nous avons montré que la fibuline-2 ne régulait pas l'état dimérique du récepteur comme préalablement montré avec la protéine 14-3-3ζ qui dissociait l'hétérodimère B1b/B2 post-synaptique (Laffray et al. 2007). Nous avons testé cette hypothèse en réalisant une co-immunoprécipitation de B1a et B2 en présence ou en absence de la fibuline-2.

Notre hypothèse était donc que la fibuline-2 pouvait modifier la pharmacologie plutôt que d'altérer l'état dimérique du récepteur. Nous avons pour cela étudié l'efficacité d'antagonistes compétitifs à réverser l'effet du baclofène dans des conditions contrôles ou en absence de fibuline-2, par des expériences de FRET.

Ainsi, nous démontrons que la surexpression de la fibuline-2 diminue l'activation du récepteur $GABA_B$ de façon dose-dépendante, et la perte de la fibuline-2 augmente l'activation et la signalisation de celui-ci. Au contraire, nous montrons que l'efficacité des antagonistes compétitifs est moindre en présence de siRNA anti-fibuline-2. L'interprétation que nous proposons (cf publication II et commentaires de l'article) repose sur l'hypothèse que la fibuline-2 diminue l'affinité des agonistes qui sont en compétition avec les antagonistes pour la liaison au récepteur.

De plus, nous avons montré les conséquences fonctionnelles de la fibuline-2 sur la transmission synaptique par des études de patch clamp. Cette protéine de la matrice extracellulaire régule en effet l'inhibition $GABA_B$ présynaptique.

Finalement, nous avons montré l'impact physiologique de ce mécanisme sur la sensibilisation douloureuse dans la corne dorsale de la moelle épinière. Nous avons d'abord étudié les variations d'expressions ainsi que la distribution de la fibuline-2 dans notre modèle de douleur neuropathique (SNL). Enfin, nous avons testé l'efficacité des siRNA anti-fibuline-2 *in vivo*, en réalisant des injections intrathécales. Nous avons évalué l'effet antinociceptif du baclofène suite à ces injections, grâce à des tests comportementaux de Von Frey.

Nous montrons ainsi qu'une protéine de la matrice extracellulaire endogène inhibe l'activité d'un RCPG dans un contexte physiopathologique de douleur neuropathique, démontrant un nouveau mécanisme de désinhibition du récepteur.

Spinal inhibition of GABAB activation by the extracellular matrix protein Fibulin-2 in neuropathic rats.

Marie-Amélie Papon[1,2], Yves Le Feuvre[1,2], Gabriel Barreda Gómez[3], Alexandre Favereaux[1,2], Fanny Farrugia[1,2], Claire Léger[1,2], Rafael Rodriguez-Puertas [3], Frédéric Nagy[1,2], Marc Landry[1,2]

[1] INSERM U862, Institut François Magendie, Bordeaux, France;

[2] University of Bordeaux, Bordeaux, France;

[3] Department of Pharmacology, Universidad del Pais Vasco, Leioa, Spain

Corresponding author: Pr. Marc Landry, email : marc.landry@u-bordeaux2.fr; Phone/Fax : +33 5 57 57 40 50/51

Key words: Fibulin-2, disinhibition, GABAB receptor, neuropathic pain, spinal cord.

ABSTRACT

In the central nervous system, the inhibitory GABAB receptor is the archetype of heterodimeric G protein-coupled receptors (GPCRs). The physiological regulation of GPCR by partner proteins remains largely unknown. We propose a novel mechanism to inhibit GABAB activity through the specific binding of Fibulin-2, an extracellular matrix protein, to the B1a subunit.

We show here that Fibulin-2 hampers GABAB activation, presumably through decreasing its agonist affinity. This interaction weakens the GABAB-mediated inhibition of neurotransmitter release in cell culture. In the dorsal spinal cord of neuropathic rats, Fibulin-2 is overexpressed and its colocalization with B1a increased. Fibulin-2 may thus interact with presynaptic GABAB receptors on nociceptive afferents. By applying anti-Fibulin-2 siRNA *in vivo*, we greatly enhanced the antinociceptive effect of intrathecal Baclofen in neuropathic rats, thus demonstrating that Fibulin-2 counters the action of GABAB agonists *in vivo*.

Taken together, our data provide the example of endogenous regulation of GABAB receptor by extracellular matrix proteins and demonstrate its functional impact on pathophysiological processes, especially pain sensitization.

G protein-coupled receptors (GPCRs) modulate a wide range of physiological processes and new drug candidates are continually being developed for selective GPCRs [1, 2]. Functional GABAB receptors are expressed as obligate heterodimers of the two subunits GABAB1 (B1) and GABAB2 (B2) [3, 4] and GABAB-mediated inhibition is an essential control of neuronal activity throughout the central nervous system. GABAB receptor subunits bind several partner proteins [5] that regulate the receptor activation in physiopathological conditions such as chronic pain (Laffray et al., submitted). Among these binding partners, extracellular matrix (ECM) proteins have been shown to regulate postsynaptic GABAB-mediated inhibition [6]. However, the physiological role of GABAB-interacting extracellular matrix proteins is not known.

In the central nervous system, aggregates of ECM molecules appear as so-called perineuronal nets that surrounds soma and dendrites. These nets are heterogenous in structure and composition, incorporating proteins derived from both neuronal and glial cells. The expression of ECM proteins is developmentally and spatially regulated in the central nervous system. Some of these molecules are up-regulated following adult nerve injury [7] and ECM proteins have been implicated in synaptic differentiation and plasticity. The emerging mechanisms comprise clustering of receptors and changes in their composition and function [8]. To date, only very rare studies have considered interactions between ECM proteins and GPCRs [6, 9]; and the mechanisms by which ECM proteins regulate GPCR activation remains unknown.

In this context, the present study focused on the role of Fibulin-2, an extracellular binding partner of the B1a variant of GABAB1 subunit [10]. We demonstrate that Fibulin-2 up-regulation hampers GABAB activation and signalling by agonists. In contrast, we show that the loss Fibulin-2 facilitates agonist-induced stimulation of the GABAB receptor but decreases the efficiency of antagonists. Therefore, we suggest that Fibulin-2 may decrease the affinity of the agonists, whereby facilitating the action of antagonists. In addition, Fibulin-2 may partially contribute to pharmacological differences between GABAB subtypes. As a functional consequence of this mechanism, we demonstrate in a primary cell culture model that Fibulin-2 regulates the GABAB-mediated inhibition of neurotransmitter release.

We further show the physiological impact of this mechanism on pain sensitization in the dorsal horn of the spinal cord. We studied Fibulin-2 up-regulation and distribution in the dorsal spinal cord of a neuropathic rats. In chronic pain conditions, we improved the efficiency of GABAB-mediated inhibition by knocking-down the protein expression with *in vivo* application of anti-Fibulin-2 siRNA.

Finally, our demonstration that endogenous extracellular matrix proteins inhibit GPCR activity in a pain context highlights a novel mechanism of disinhibiton, and provides the groundwork for further studies of pathophysiological regulations.

RESULTS

Fibulin-2 regulates GABAB activation *in vitro*

Incubation of primary neuronal cultures with exogenous Fibulin-2 inhibited Baclofen-induced energy transfer in a dose-dependent manner (Fig. 1). At 25nM, Fibulin-2 decreases the maximal effect (efficacy) of Baclofen to induce FRET interactions between B1a and B2 (32.2% ± 5.46 in control *vs* 20% ± 5.9 in Fibulin-2-treated cultures; $p < 0.01$). At higher doses (50nM), Fibulin-2 totally suppressed FRET interactions. In contrast, siRNA-mediated inhibition of Fibulin-2 expression resulted in an increase of Baclofen maximal effect (efficacy) as measured with FRET (36.9% ± 6.3, $p < 0.05$ *vs* control). Interestingly, siRNA treatment also increased the efficacy of low doses (1nM) of Baclofen (13.5 % ± 3.02 in control *vs* 23.4 % ± 5 in siRNA treated cultures; $p < 0.05$).

Next, we tested for the efficacy of cell-secreted Fibulin-2 to alter GABAB conformation. Fibulin-2 was co-transfected with B1a and B2 subunits, and FRET interactions were measured as above (Fig. 2A). Fibulin-2 overexpression decreased Baclofen-stimulated FRET interactions (28.6% ± 5.11 in B1a/B2 *vs* 5.9% ± 0.4 in B1a/B2+Fibulin-2 transfected cultures; $p < 0.001$). Moreover, after Fibulin-2 overexpression, Baclofen-induced FRET interactions remained in the same range as constitutive FRET interactions, without Baclofen, indicating a total suppression of Baclofen effects. Fibulin-2-induced inhibition of FRET interactions was countered by anti-Fibulin-2 siRNA application, in a dose-dependent manner (20 or 40pmol siRNA).

Since Fibulin-2 is normally secreted in the extracellular matrix by various cell types, we investigated the possible role of endogenous Fibulin-2 in restraining GABAB conformational changes (Fig. 2B). For this purpose, we incubated neuronal cultures with anti-Fibulin-2 siRNA. When Fibulin-2 expression was blocked, FRET interactions were increased in both unstimulated and Baclofen-activated GABAB receptor. In contrast, mismatch RNA had no effects on energy transfer between GABAB subunits.

Then, we tested whether Fibulin-2 was also able to inhibit the effects of GABA, the endogenous GABAB ligand (Fig. 2C). As for Baclofen, we found that Fibulin-2 overexpression decreased GABA-stimulated FRET interactions (28.5% ± 4.4 in B1a/B2 *vs* 16.3% ± 2.7 in Fibulin-2 transfected cultures; $p < 0.01$). Moreover, anti-Fibulin-2 siRNA

potentiates the effects of GABA (42% ± 4.9 in B1a/B2+siRNA *vs* B1a/B2; $p < 0.05$). presumably by suppressing inhibition of receptor activation by endogenous Fibulin-2.

Finally, we checked the specificity of Fibulin-2 action on B1a/B2 heterodimer subtype. Fibulin-2 had no effect on Baclofen-stimulated FRET interactions between B2 subunit and B1b, the other transcript variant of B1 subunit (Fig. 2D; 51.2% ± 4.3 in B1b/B2 *vs* 53% ± 3.9 in B1b/B2+Fibulin-2 transfected cultures, $p>0.05$). This was expected since B1b does not contain the extracellular Sushi domains that bind Fibulin-2.

GTP binding assays were performed on membrane extracts from neuronal cell cultures (Fig. 3A). In normal conditions, Baclofen facilitated G-protein coupling dose-dependently, with a maximum effect of 155 ± 23 fmol/mg of protein. Fibulin-2 application decreased G-protein activation, at least for Baclofen concentrations under 10^{-4}M. In anti-Fibulin-2 siRNA treated cultures, G-protein coupling efficacy was increase and reached a maximum effect of 278 ± 31 fmol/mg of protein.

Taken together, these data show that Fibulin-2 hampers conformational changes of the GABAB receptor, both constitutively and upon agonist application. These changes in the GABAB conformation correlate with Fibulin-2-induced loss in G-protein coupling. Moreover, we showed with siRNA-based strategy that endogenous Fibulin-2 exerts a tonic inhibitory effect on GABAB activation as revealed by FRET analysis and GTP binding assay.

Mechanism of Fibulin-2 action

With regards to the mechanisms accounting for Fibulin-2-induced impairment of GABAB activation, we considered possible loss of the heterodimeric state of the GABAB receptor as previously demonstrated for the B1b/B2 post-synaptic subtype [11]. Indeed, heterodimer dissociation would lead to similar changes in FRET interactions and GTP binding activity. We tested this hypothesis with co-immunoprecipitation of B1a and B2 subunits in the presence or in the absence of Fibulin-2 (Fig. 3B). No differences could be shown in B1a/B2 association in the different conditions tested, whereby ruling out the possibility that Fibulin-2 alters the dimeric state of the GABAB receptor.

Hence, we hypothesized that Fibulin-2 could modify the GABAB pharmacology rather than disrupting the receptor dimer. We explored this possibility by studying with FRET the efficiency of GABAB antagonists to revert Baclofen activation in control conditions, or in the absence of Fibulin-2 (Fig. 4). Both Saclofen (100µM, Fig. 4A) and CGP55845 (0.5µM, Fig. 4B) efficiently countered Baclofen-stimulated GABAB activation. Interestingly, this antagonistic effect was abolished when cultures were treated with anti-Fibulin-2 siRNA.

Higher concentrations of Saclofen (1mM) or CGP (50µM) were able to restore the antagonist efficiency, showing that Fibulin-2 alters pharmacological properties, i.e. antagonist sensitivity, of the B1a/B2 receptor subtype.

Given these data, we next investigated whether Fibulin-2 could be responsible for controversial pharmacological differences [12] between the two GABAB subtypes. We tested for the effect of antagonists on the B1b/B2 subtype that cannot bind Fibulin-2 due to the lack of Sushi domains (Fig. 5). Indeed, in normal conditions, 100µM of Saclofen has antagonistic effect on B1a/B2 (Fig. 4A) but not on B1b/B2 (Fig. 5), underlying a pharmacological difference between the two receptor subtypes with regard to the effects of antagonists. Hence, we reasoned that B1b/B2 FRET interactions should vary similarly to B1a/B2 in the absence of Fibulin-2, that is after anti-Fibulin-2 treatment. However, this was not verified, neither for CGP, nor for Saclofen. At 0,5µM doses, CGP decreased FRET interactions for B1b/B2 (Fig. 5) but was inefficient on siRNA-treated B1a/B2 (Fig. 4B). As for Saclofen, FRET interactions were abolished at 1mM doses for siRNA-treated B1a/B2 (Fig. 4B) but the antagonist did not affect the B1b/B2 receptor activation (Fig. 5). Therefore, we cannot conclude that Fibulin-2 was actually responsible for the pharmacological difference in antagonist sensitivity between the two subtypes.

Functional effects of Fibulin-2 on inhibitory transmission

Then, we asked the question of whether Fibulin-2 modifies B1a/B2-mediated inhibition. Since the B1a subunit is mainly found in presynaptic compartments [13], we focused on presynaptic GABAB inhibition on spinal neuron cultures (Fig. 6). To investigate the role of Fibuline-2 in the control of synaptic transmission, we next analysed the effects of Baclofen (10µM) and Saclofen (100µM) on the amplitude and frequency distributions of miniature glutamatergic EPSCs recorded in the presence of TTX (10µM). In preparations transfected with mismatch siRNA (fig 6A1), comparison of the mEPSC amplitude distribution (fig 6A2) revealed no significant change between control and Baclofen conditions (kolmogorov-Smirnov test, KS). Moreover, the kinetics of averaged mEPSCs was not affected by Baclofen application (see inset in A2). Overall, in 6 recorded neurons, the average mEPSC amplitude remained unaltered by Baclofen application (fig 6A3, paired t-test) By contrast, the frequency distribution was significantly shifted towards the right (fig 6A4), indicating a decrease in mEPSC frequency (KS test, $p<0.001$, n=6). Further Saclofen addition (100µM) induced complete (n=4, fig 6A4) or partial (n=1) recovery of mEPSCs frequency in 5 out of 6 recorded cells. Overall (fig 6A5), Baclofen induced a significant decrease in mEPSCs frequency to 58.8% +/-10.32 of control ($p<0.05$, paired t-test). In the presence of Saclofen, or

Saclofen and CGP, the average mEPSC frequency returned to its control value (resp 98%+/-13 and 103%+/-19). These results demonstrate a clear presynaptic inhibition of glutamatergic synaptic transmission in culture spinal neurons. Similar results were obtained in control preparations as well as preparations exposed to transfecting agent alone (n=6 and n=4 respectively, data not shown)

In preparations transfected with Fibulin-2 siRNA (fig 6B1), Baclofen had no effect on the amplitude distribution (fig 6B2, KS test), and the kinetics of averaged mEPSCs remained unchanged (inset in B2). No statistical effect of Baclofen on average mEPSCs amplitude could be observed (fig 6B3, paired t-test, n=6). Baclofen induced a clear shift in the frequency distribution curve (fig 6B4, p<0,001), indicating a clear presynaptic inhibition of mEPSCs. However, in contrast with control preparations transfected with mismatch siRNA, further Saclofen application (100µM) failed to antagonize Baclofen effects (in fig 6B2, KS test), whereas application of CGP55845A (50µM) induced a total recovery in mEPSCs frequency. Overall (fig 6B5), Baclofen application induced a decrease in mEPSCs frequency to 44.4+-11.4% of control values in 6 out of 6 cells (paired t-test, p<0.05). In 5 out of these 6 neurons, further application of Saclofen did not alter mEPSC frequency (54+-0.18% of control, paired-t-test, p<0.05), whereas CGP55845A induced a recovery in mEPSCs frequency to control values in all tested cells (137+-45% of control). Interestingly, the decrease in mEPSCs frequency induced by Baclofen was higher in siRNA transfected neurons than in control, although this did not reach statistical significancy.

Finally, in preparations transfected with Fibulin-2 siRNA, the average mEPSC frequency was significantly lower than in preparations transfected with mismatch siRNA (fig 6C), whereas no change was observed in the mean mEPSC amplitude (fig 6D).

Expression of Fibulin-2 in vivo

We next investigated whether changes in Fibulin-2 expression can alter GABAB inhibition *in vivo*. Since GABAB is involved in the modulation of nociceptive transmission [14], we first studied Fibulin-2 expression in rats with spinal nerve ligation (SNL), i.e. rats with neuropathic behavior. Real-time RT-PCR showed a marked increase in Fibulin-2 mRNA levels in the dorsal spinal cord of SNL rats, as compared to Sham animals (Fig.7A; 141.58% ± 7.2 in SNL rats; $p < 0.01$ *vs* sham). Fibulin-2 overexpression was limited to the spinal cord since no increase was noticed in the dorsal root ganglia (Fig. 7B). However, the spinal cell types that secretes Fibulin-2 remain to establish. Overexpression was specific of Fibulin-2 since the expression of the related Fibulin-1 showed no changes (Fig. 7C).

We checked Fibulin-2 upregulation at the protein level with immunohistochemistry. Immunostaining was hardly detectable in control animals dorsal horn (Fig. 7Da). Intensity was much higher in SNL rats (Fig. 7Db) where discrete staining was seen in the extracellular space. Changes in immunostaining intensity have been quantified and showed a 60 % increase in SNL rats as compared to Sham animals (Fig. 7Dc; 160,7 % ± 23,7 of the Sham intensity; $p< 0.01$).

We further detailed the distribution of Fibulin-2 respectively to the B1a subunit (Fig. 8), and to CGRP, a marker of peptidergic nociceptive inputs (Fig. 9) with light and electron microscopy double labeling experiments.

In Sham animals, colocalization appeared scarce, mainly due to the low expression level of Fibulin-2 (Fig. 8Aa-c). Quantitative analysis confirmed that the rate of B1a colocalization with Fibulin-2 remained very limited (Fig 8B; 10,6 % ± 2,2). In SNL rats, Fibulin-2 was seen as discrete, intense staining, intermingled with B1a labeling (Fig. 8Ad-f). Positive signal was found in surrounding cell bodies and in processes. Strict overlap was much more abundant than in Sham animals (Fig 8B; 45,8 % ± 6,2 of B1a labeled area colocalized with Fibulin-2 in SNL rats). However, B1a singly labeled structures were also frequent, suggesting that B1a/Fibulin-2 interaction does occur only for a subpopulation of B1a/B2 receptors. Electron microscopy further demonstrated that B1a and Fibulin-2 colocalized on neuronal plasma membrane (Fig. 8C). Gold particle association was found only at extra-synaptic sites. Again, both B1a and Fibulin-2 labeling were also found independently, as single labeling, both intracellularly and at the membrane.

Regarding Fibulin-2/CGRP double labeling, both signals were seen most often in close vicinity with light microscopy (Fig. 9A). It is actually expected that Fibulin-2 and CGRP are located in different subcellular compartments, respectively the extracellular matrix and intracellular secretory granules. Electron microscopy confirmed that Fibulin-2 is localized at the plasma membrane, around sensory nerve endings filled with CGRP-containing secretory granules (Fig. 9B).

Functional role of Fibulin-2 on neuropathic pain sensitization

Finally, to assess the behavioral role of Fibulin-2 on GABAB inhibition in chronic pain conditions, we tested the effect of anti- Fibulin-2 siRNA intrathecal injection (Fig 10A). We studied the effects of Baclofen, and of GABAB antagonists on mechanical allodynia after siRNA or mismatch RNA injection in SNL rats. After drug injections, the withdrawal threshold was assessed with the von Frey test.

Surgery resulted in a decrease in paw withdrawal threshold of around 60% (Fig 10A). The injection of vehicle (iFect) after surgery did not further change the mechanical threshold of neuropathic rats (data not shown). The injection of Baclofen at day 12 induced an increase in mechanical threshold indicating GABAB-mediated antinociceptive effects (Fig.10A; 43% ± 1.9 in SNL *vs* 68.3% ± 1.4 in SNL + Baclo ; $p< 0.001$). SiRNA injection slightly increased the paw withdrawal threshold (data not shown). In contrast, the mean threshold for SNL animals after Baclofen application was significantly increased upon siRNA treatment (Fig.10A; 68.3% ± 1.4 in SNL + Baclo *vs* 84.6% ± 4.9 in SNL siRNA + Baclo, $p< 0.01$). Changes in paw withdrawal threshold were not observed in animals injected with mmRNA (Fig 10A; 68.3% ± 1.4 in SNL + Baclo *vs* 69.3% ± 3.1 in SNL mmRNA + Baclo, $p> 0.05$) which appeared similar to that observed in neuropathic rats before treatment.

The co-injection of Baclofen and Saclofen, in SNL rats, reversed the effects of Baclofen alone (Fig.10B; 128.12% ± 2.62 in Baclofen before injection *vs*, 108.79% ± 7.3 in Saclofen before injection; $p< 0.01$). Paw withdrawal threshold was similar to that measured in SNL rats without injection, indicating the persistence of mechanical allodynia. In contrast, after siRNA application, Saclofen was unable to counter Baclofen effects. The increase of paw withdrawal threshold remained unchanged (Fig.10B; 155.7% ± 9.4 in Baclofen siRNA *vs*, 137.56% ± 6 in Saclofen siRNA, $p > 0.05$). However, CGP was still efficient, confirming that the increase of paw withdrawal threshold depended on GABAB activation (data not shown). The injection of mmRNA did not change the effects of Baclofen alone, or Balcofen plus Saclofen (or CGP) injection (Fig.10B; 128.5% ± 5.75 in Baclofen mmRNA *vs*, 103.2% ± 6.7 in Saclofen mmRNA; $p< 0.05$).

DISCUSSION

In the present study, we demonstrated that: (1) Fibulin-2 decreases the agonist-induced activation of GABAB receptor; (2) Fibulin-2 modified the receptor sensitivity to antagonists; (3) Fibulin-2 regulated the GABAB-mediated inhibition of neurotransmitter release; (4) Fibulin-2 was up-regulated in rat models of neuropathic pain; (5) intrathecal knock-down of Fibulin-2 expression partially reversed mechanical allodynia in neuropathic rats.

Regulation of receptor activation by extracellular matrix proteins

Fibulin-2 limits GABAB activation as demonstrated with FRET analysis and GTP binding assay. High concentration or overexpression of Fibulin-2 is likely to increase the number of

GABAB receptors interacting with the matrix protein. In contrast to the action of other GABAB partner proteins, such as 14-3-3 (Laffray et al., submitted), Fibulin-2 is unlikely to regulate the dimeric state of the receptor according to the co-immunoprecipitation experiments. Therefore, we favored the hypothesis that Fibulin-2 regulates the receptor conformation. In line with this hypothesis, the higher FRET efficacy at low Baclofen doses upon siRNA indicated that less constraint apply to the GABAB receptor subunits in the absence of Fibulin-2, thus increasing the probability of conformational changes. Importantly, endogenous Fibulin-2 enforces a tonic inhibition of GABAB activation, as shown by the increased FRET in the presence of siRNA.

Other examples of interactions with extracellular matrix proteins have been shown to regulate receptor activation. Tenascin R interacts with the B1b subunit and blocks post-synaptic-mediated GABAB inhibition on pyramidal neurons of the hippocampus via the HNK-1 carbohydrate [6]. The NMDA glutamate receptor interacts with the matrix protein Reelin that regulates NMDA synaptic retention and surface distribution [15]. The activity of AMPA receptors and their function in short-term synaptic plasticity also depends on the interaction between receptors and extracellular matrix proteins [16].

It may be proposed that Fibulin-2 acts through two different modes of action, i.e. direct masking of ligand binding sites or modifying the receptor conformation. However, Fibulin-2 hampers the action of agonists (GABA and Baclofen), but facilitates that of antagonists (Saclofen and CGP). This apparent contradiction suggests that Fibulin-2 does not prevent the action of ligands by interfering directly with their binding sites. The matrix protein may rather alter the receptor conformation, thus resulting in changes for agonist affinity. Facilitating agonist-induced activation through siRNA strategy would then hamper the action of antagonists. Conversely, when Fibulin-2 is removed, the high affinity for GABAB agonists implies that higher concentrations of competitive antagonists are required to reverse Baclofen effects.

Another possible mechanism relies on Fibulin-2 dimerization [17]. As a dimer, Fibulin-2 could then bridge two GABAB heterodimers with each other. The formation of such higher order GABAB oligomers [18] could account for limitations of structural changes and GABAB activation.

The B1a/B2 heterodimer is mainly distributed in the presynaptic compartment [13]. In agreement, we showed that Fibulin-2 controlled presynaptic inhibition mediated by the GABAB receptor. Therefore, we conclude that Fibulin-2 is specific for presynaptic receptor subtypes, thus regulating the efficiency of agonists. Interestingly, our study showed that

B1a/B2 and B1b/B2 displayed differential sensitivity for the antagonists. Yet, Fibulin-2 binding to B1a is not sufficient to explain these pharmacological differences. It is thus necessary to consider other mechanisms that could be involved. Other binding partners of the B1 variants may well play a role in these pharmacological properties in that they bind specifically the B1a subunit, and not the B1b, or conversely. Alternatively, one can also propose that the Sushi domains themselves influence the efficiency of ligands. Indeed, a regulatory role of the Sushi domains has been shown for glucagon and VIP receptors where the N-terminal extracellular domain of receptor contains highly conserved amino acid residues which are essential for its intrinsic binding activity [19, 20].

Consequences of Fibulin-2/GABAB interaction in pain sensitization

Nerve injury leading to pain sensitization have already been shown to induce up-regulation of extracellular matrix proteins in adult rats. More precisely, peripheral lesions increase the expression of Fibronectin in the dorsal spinal cord, ipsilateral to the lesion [21, 22]. Such injury-induced overexpression of matrix proteins is involved in pain sensitization by driving an increase of P2X4 receptor expression on microglia [22-24].

In our study, the knock-down of Fibulin-2 enhances the efficacy of Baclofen to alleviate mechanical allodynia in neuropathic rats. The loss of Saclofen effects, upon siRNA application, to counter Baclofen-induced analgesia *in vivo* indicates that Saclofen effects only depend on the B1a/B2 heterodimer, the sole subtype to be sensitive to Fibulin-2 action. This is consistent with our *in vitro* data showing (i) that Saclofen losts its efficiency on B1a/B2 heterodimer upon siRNA application; and (ii) that Saclofen was not efficient to prevent the activation of B1b/B2 subtype, even at high concentrations, contrary to CGP.

As described above, Fibulin-2/GABAB association is likely to be mostly pre-synaptic. In the spinal dorsal horn, we also showed that Fibulin-2 is expressed in superficial laminae, in the vicinity of CGRP-containing nerve endings. The colocalization between these markers indicates that Fibulin-2 can exert its regulatory effect on primary nociceptive afferents. Fibulin-2 up-regulation could thus limit the GABAB-mediated suppression of neurotransmitter release by sensory primary afferents in the superficial laminae of the dorsal horn. Given its wide distribution throughout the dorsal horn, Fibulin-2 could also impede GABAB presynaptic inhibition on interneurons. Our morphological data showed that only a subset of B1a subunit is associated to Fibulin-2 at the cell surface. Consequently, our study suggests that the extracellular matrix forms specific compartments at the surface of neurons, thus confirming recent works [16]. Extracellular matrix proteins could then trap receptors, and

control their activation in specific membrane domains. They may also restrain and filter the exchange of receptors between these different compartments.

Taken together, our data indicate that Fibulin-2 overexpression induces structural changes in the GABAB receptor that restrain its activation by the endogenous ligand, GABA, thus allowing a fine tuning of the receptor activation in sub-domains of the plasma membrane.

The regulation by the extracellular matrix also limits the efficiency of therapeutic strategies aiming to stimulate directly the GABAB receptor. These data are in line with the actual recommendations for clinical use of Baclofen. In fact, Baclofen administration is not proposed in EFNS guidelines of pharmacological treatment of neuropathic pain and its general effectiveness as an analgesic is limited . Co-application of inhibitors of extracellular matrix proteins, together with Baclofen, would provide a new mean to enhance Baclofen efficiency in clinics, without using high doses that produce unwanted side-effects such as sedation. Together with the recent elucidation of other mechanisms involving reduced GABA release [25] or loss of GABAA inhibition [26, 27], our data support the view that disinhibition dramatically twists the excitability of spinal neurons and leads to pain sensitization . Targeting GABAB associated proteins, and especially extracellular matrix proteins, may be of therapeutic interest by enhancing the action of classical pain killers.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Primary cell cultures

Dissociated rat spinal neurons, cultured in Serum-free Neurobasal TM medium (Gibco), were transfected with 400ng plasmid DNA/2µL Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). In most cases, transfected cells incorporated all cDNAs together. siRNA was added 24hr after transfection with cDNAs (500ng siRNA/3µL of Lipofectamine 2000). Growth medium was replaced after 6 hr and cells were harvested 36 hr after siRNA transfection.

Spinal and cortical cells were obtained from rats (Sprague Dawley) at 18 days of embryonic development. The embryos were delivered by caesarean section from deeply anaesthetized rats and killed by decapitation. Pieces of lumbar region of the spinal cord or cortex were exposed to a 1X trypsin solution (Gibco) for 25 min at 37°C. These pieces were then mechanically dissociated by forcing them through fine-tipped pipettes several times. Cells were plated on glass coverslips at a density of 150,000/100µL. The glass coverslips were previously coated overnight at 37°C with a 0.1mg/mL polylysine solution for cortex and 1mg/mL for spinal cord (Sigma, Saint Louis, MO) and for 2hr with a 0.05mg/mL laminine solution (Sigma). The cultures were kept in Serum-free Neurobasal TM medium (Gibco), supplemented with B27 (Gibco) and Glutamax (Gibco). Half of the medium was changed twice a week.

Plasmids and siRNAs

B1a/B1b, and B2 cDNA were modified at their N-terminus by the addition of GFP, or t-dimer DsRed, respectively. GABAB2-DsRed is subcloned in the pcDNA3.1 mammalian expression vector [11]. GABAB1a was subcloned in the pEGFP-C3 for obtain a GFP at N-terminus. The Rc/CMV vector containing the full-length Fibulin-2 construct was obtained from Dr. Takako Sasaki (Max-Planck-Institut, Martinsried, Germany) and was prepared as described [28-30]. Anti-Fibulin-2 siRNA was a pool of 3 target-specific 20-25 nucleotides siRNAs (sc-43120, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Mismatch siRNA was a non-targeting 20-25 nucleotides designed as a negative control (sc-37007, Santa Cruz Biotechnology).

The efficacy of siRNA to downregulate the expression of Fibulin-2 mRNA was assessed by SYBRGreen-based qRT-PCR both on cell cultures (data not shown) and after intrathecal injections *in-vivo*.

qRT-PCR

Expression analysis of Fibulin-1 and Fibulin-2 mRNA was performed with the DyNAmoTM SYBR Green qPCR kit (Finnzymes, Espoo, Finland). Triplicate runs were performed and

Succinate dehydrogenase Complex, Subunit A (SDHA) was used as a normalizer. The relative level of expression was calculated using the comparative (2ΔΔCT) method.

Spectral and lifetime correlated acquisitions

Neuronal cultures were treated for 1hr or 15min at 37°C with Fibulin-2 protein at 25nM or 50nM. Then, cultures were treated for 30 min at 37°C with Baclofen (10^{-3} M to10^{-9} M, Sigma B5399), or with GABA (10^{-4} M, Sigma A5835); or with competitive antagonists CGP55485 (0,5µM or 50µM, Tocris 55845) or Saclofen (100µM or 1mM, Sigma S166) co-applied with Baclofen. Next, cells were fixed 20 min at 37°C (4% paraformaldehyd, 4% saccharose in phosphate buffer 0,1M, pH 7,4), washed (0,1M PBS, 10 min at RT) and mounted on slides (Fluorescent Mounting Medium Dako Cytomation).

Two-photon-fluorescence lifetime imaging measurement (2P-FLIM)

The interaction between GFP-tagged proteins and t-dimer DsRed-tagged proteins was studied using quantitative FRET (Fluorescence or Förster Resonance Energy Transfer) determination with FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Measurements) using Time Correlated-Single Photon Counting (Becker and Hickl,Berlin, Germany). To assess protein interactions, we calculated a relative FRET efficiency for each acquisition as follow: FRET Efficiency (%) = $(\tau_{Dmean}-\tau_{DA})/\tau_{Dmean}$ x 100 where τ is the time constant of the exponential fit with τDmean being the mean lifetime of the donor fluorophore (GFP) when expressed alone and τDA being the lifetime of the donor fluorophore in the presence of the acceptor (t-dimer DsRed). Results were expressed as a mean FRET efficiency (n=21 cells or more in each condition) ± SEM.

Due to the mono-exponential decay of GFP and their spectra compatibility, the GFP-DsRed couple is very well suited for quantitative FRET (Fluorescence or Förster Resonance Energy Transfer) determination with FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Measurements) [31, 32]. Moreover, the t-dimer DsRed is a tandem of monomeric red fluorescent protein that matures rapidly, does not form aggregates, and has minimal emission when excited at 900nm, a wavelength optimal for GFP and minimizing the excitation of t-dimer DsRed [33].

The interaction between GFP-tagged protein and t-dimer DsRed-tagged protein was studied using two-photon-Fluorescence Lifetime Imaging Measurement (2P-FLIM) with the SPCM and SPC Image softwares (Becker & Hickl).

For GFP excitation, we used a two-photon pulsed excitation (890 nm), given by the Coherent Mira 900-F laser 5W (Coherent inc. Laser Group, Santa Clara, CA). All acquisitions were undertaken with a 100x, 1.4NA, Leica oil objective lens on a Leica TCS SP2 inverted

confocal microscope. The laser repetition frequency was 76MHz which gave a 12ns temporal window for lifetime measurements. Photon detection was performed in cells using the SPRC160, a homemade system based on a 16 channel multi-anode photomultiplier head (PML16, Becker&Hickl) and a concave holographic grating allowing spectral dispersion on the detector. The Becker & Hickl TCSPC 730 card (Becker & Hickl, Berlin, Germany) determined the time between fluorophore excitation and photon emission, as well as routing information associated to spectral range. This card was driven by the SPCM software which allowed fluorescence decay curve measurements using a single-spot mode; and fluorescence decay curve fits, allowing lifetime determination were obtained using the SPC Image software (both software from Becker & Hickl). The choice between mono-exponential decay and bi-exponential decay fitting was done using the reduced $\chi 2$ parameter. Lifetime values were extracted from three spectral channels, from 494 to 542nm, and averaged. To ensure reliability of our measurements, we checked the lifetime stability upon this spectral range. As a second control, the first channels were used to ensure no autofluorescence in measured cells, which otherwise could result in artefactual FRET positive response.

Immunohistochemistry on tissue sections

Rats were perfused with 4% paraformaldehyde. For electron microscopy, glutaraldehyde (0.2%) was added to the fixative solution. The lumbar spinal cord was rapidly dissected out, and post-fixed for 2hr in 4% paraformaldehyde. Tissue samples were then processed for light or electron microscopy.

For light microscopy, transverse spinal cord sections were cut at 30µm thickness on a cryostat (Microm) and processed for double-fluorescent labeling experiments. Sections were incubated overnight at 4°C with a goat anti-Fibulin-2 (1/400, Santa Cruz) and a sheep anti-GABAB1a (1/20 000; gift from Dr. Andrew Calver, GlaxoSmith Kline, Harlow, UK). Subsequently, GABAB1a was visualized with a biotinylated secondary antibody and a tyramide-based method [34] using FITC-conjugated tyramide (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA). Fibulin-2 was detected with a biotinylated secondary antibody and Alexa568-conjugated streptavidin (Molecular Probes Inc., Eugene, OR).

For co-detection of Fibulin-2 and CGRP, sections were incubated overnight at 4°C with goat anti-Fibulin-2 (1/400, Santa Cruz) and rabbit anti-CGRP (1/1000, Peninsula). Subsequently, Fibulin-2 was detected with biotinylated secondary antibody and Alexa568-conjugated streptavidin (Molecular Probes Inc., Eugene, OR). CGRP was visualized with Alexa 488-conjugated anti-rabbit (Molecular Probes Inc., Eugene, OR). Sections were viewed with a confocal microscope (Leica DMR TCS SP2 AOBS, Mannheim, Germany).

For electron microscopy, vibratome sections were cut at 200µm thickness and samples of superficial spinal cord laminae (I-II) were embedded in Lowicryl® HM20 resin (EMS, Hatfield, PA) with the progressive lowering of temperature method, using the Reichert AFS system (Leica, Wien, Austria) according to the instruction manual. Ultrathin sections (70nm) from Lowicryl blocks were collected on butvar coated single-slotted nickel grids (EMS) and submitted to postembedding immunogold multiple labeling. GABAB receptor subunits and Fibulin-2 protein were detected with: anti-GABAB1a (1/100, sheep, Glaxo), and anti-Fibulin-2 (1/500, goat, Santa Cruz) primary antibodies and visualized with the appropriate colloidal gold-conjugated detection systems (BBI, Cardiff, UK; EMS) (GABAB1a = 15nm, Fibulin-2 = 5nm). Grids were rapidly fixed for 1min in 1% glutaraldehyde diluted in water. After rinsing, grids were finally stained with 2% uranyl acetate in water for 12min and examined with a Hitashi H7650 electron microscope (Elexxience, Verrières-le-buisson, France) equipped with an Orius SC1000 camera (GATAN, Evry, France).

CGRP and Fibulin-2 protein were detected with anti-CGRP (1/500, rabbit, Peninsula), and anti-Fibulin-2 (1/500, goat, Santa Cruz) primary antibodies and visualized with the appropriate colloidal gold-conjugated detection systems (BBI, Cardiff, UK; EMS) (CGRP = 5nm and Fibulin-2 = 15nm).

Patch clamp

For voltage-clamp recordings, 8 to 10 days-aged cultured spinal neurons on their coverslip were submerged in normal Krebs solution containing 130.5 mM NaCl, 2.4 mM KCl, 2.4 mM $CaCl_2$, 19.5 mM $NaHCO_3$, 1.3 mM $MgSO_4$, 1.2 mM KH_2PO_4, 1.25 mM HEPES, 10.0 mM glucose, pH 7.4, equilibrated with 95% O_2 and 5% CO_2, at room temperature (20-23°C). The coverslip was placed in a chamber and visualized by means of infrared DIC video-microscopy using an upright microscope BX51WI (Olympus France, Rungis, France) equipped with a 40x water immersion lens (LUMPlanFI/IR), and a CCD camera C2400-03 (Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan). The culture was continuously superfused with Kreb solution at 1.6 $mL.mn^{-1}$. Series resistance was negligible. Patch pipettes (9-11 M Ω) were filled with 120 mM potassium gluconate, 20 mM KCl, 0.1 mM $CaCl_2$, 1.3 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 10 mM HEPES, 0.1 mM GTP, 0.2 mM cAMP, 0.1 mM leupeptin, 3 mM Na_2-ATP and 77 mM D-mannitol, pH 7.3.

Miniature EPSCs were recorded in voltage clamp mode (holding potential -60mV) in the presence of 10^{-6} M Tetrodotoxin (TTX). In such experimental conditions, no action potential could be evoked following injection of positive current into the recorded neuron,

demonstrating a complete blockade of action potential propagation. Signals were amplified using an Axoclamp 2B amplifier and digitized at 10 kHz. Individual events were extracted from raw data using mini-analysis software (http://www.synaptosoft.com/) over a duration of 2 minutes and visually filtered according to their general shape. For all comparisons of cumulative distributions, 2-sample Kolmogorov-Smirnov test was used. Mean values are given ± SEM.

GTPγS binding

Membrane preparation

Primary cell cultures of rat cortex (8 millions of cells/mL) were homogenized using a Teflon glass grinder (10 up-and-down strokes at 1500 rpm) in 5 ml of homogenization buffer (1 mM EGTA, 3 mM MgCl2 and 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) supplemented with 0.25 mM sucrose. The crude homogenate was centrifuged for 5 min at 500 rpm (4ºC) and the supernatant was recentrifuged for 10 min at 18000 rpm (4ºC). The resultant pellet was washed in 4 ml of homogenization buffer and recentrifuged in similar conditions. Aliquots of protein were stored at –80ºC until assay. Protein content was measured according to the method of Bradford (1976) using BSA as standard.

[^{35}S]GTPγS binding assays

Membrane aliquots were thawed and resuspended in a buffer containing 1mM EGTA, 3mM MgCl2, 100 mM NaCl, 3mU/ml adenosine deaminase and 50mM Tris-HCl, at pH 7.4. The incubation was started by addition of the membrane suspension (25mg of membrane proteins) to the previous mixture of 0.5nM [^{35}S]GTPγS, 50 mM GDP and appropriate concentrations of drugs and was performed at 30ºC for 120 min with shaking. Incubations were terminated by adding 3ml of ice-cold resuspension buffer followed by rapid filtration through Whatman GF/C filters presoaked in the same buffer. The filters were rinsed twice with ice-cold resuspension buffer, transferred to vials containing 5ml of OptiPhase HiSafe II cocktail and the radioactivity trapped was determined by liquid scintillation spectrometry (Packard 2200CA). Nonspecific binding was defined as the remaining [^{35}S]GTPγS binding in the presence of 10mM unlabelled GTPγS. Nonspecific binding was subtracted from total bound radioactivity to determine [^{35}S]GTPγS specific binding.

Animal models and behavioral tests

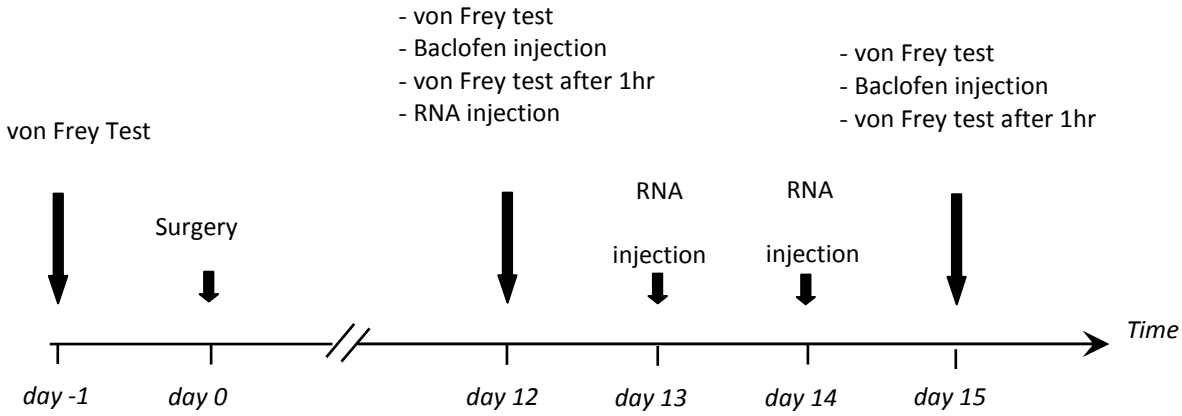
Adult male Wistar rats (250-300g; Charles River France, St Aubin les Elbeuf, France) were used. The experiments followed the ethical guidelines of the International Association for the Study of Pain and were approved by the local ethics committee in Bordeaux (AP 1/04/2005).

Persistent neuropathic pain in rats was evoked by ligation of the right L5-L6 spinal nerve (Spinal Nerve Ligation, SNL) [35]. Mechanical response thresholds were monitored in SNL, and sham-operated (sciatic nerve was exposed but the L5 and L6 sciatic nerves were not ligated) animals at one day before surgery (reference value for each animal), and at day 12 (before and after intrathecal injections of Baclofen) and at day 15 (24h after the last siRNA injection). Rats were placed in the testing cage one hour before the test for habituation. The withdrawal threshold of the leg on the operated side was determined in response to mechanical stimuli applied to the plantar surface of the foot. The limb withdrawal threshold was measured by an electronic device (Bioseb, France) that was derived from Von Frey filaments [36, 37]. Sham-operated rats were used as controls.

***In vivo* intrathecal injections and mechanical allodynia**

For intrathecal injections of Baclofen or RNAs (anti-Fibulin-2 siRNA or mismatch RNA), sham and SNL rats were implanted with a catheter (PE-10; Phymep, France) inserted into the subarachnoid space [38]. The threshold to mechanical stimulation was monitored before and after surgery, and after the various injections. Results were expressed as percentages of changes in the threshold of neuropathic rats.

The experimental schedule is presented below:



Rats were tested for mechanical allodynia before surgery (day-1, reference value set to 100%). The threshold to mechanical stimulation was monitored again in sham-operated and SNL animals 12 days after surgery (day 12), after Baclofen injection (1µg in 10µL; Sigma B5399) on the same day (day 12, Baclofen), on day 15 after injection of anti-Fibulin-2 siRNA or mismatch RNA (day 15, RNA), and finally after Baclofen injection on the same day (day 15, RNA + Baclofen). Anti-Fibulin-2 siRNA (siRNA) and mismatch RNA (mmRNA) were

injected daily from day 12 to day 14 according to a published protocol [39] and Neuromics instructions (Neuromics, Northfield, MN). In some experiments, Saclofen (30µg, Sigma S166) or CGP55845 (10µg, Tocris 5584) were co-applied *in vivo* with Baclofen.

Statistical Analysis:

Student's *t*-tests were used to compare two series of data. Mann-Whitney was used to analyse non parametric sets of data. Wilcoxon test was performed for paired-data in behavioural experiments. $p < 0.05$ was considered significant.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are most grateful to Dr Tatako Sasaki (Max-Planck-Institut, Martinsried, Germany) for providing us with recombinant Fibulin-2. We thank Dr Christel Poujol and Philippe Legros, and Sabrina Lacomme and Dr Etienne Gontier, (Bordeaux Imaging Center, University of Bordeaux), for technical help with confocal and electron microscopy.

REFERENCES

1. Lagerstrom, M.C. and H.B. Schioth, *Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery.* Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(4): p. 339-57.
2. Panetta, R. and M.T. Greenwood, *Physiological relevance of GPCR oligomerization and its impact on drug discovery.* Drug Discov Today, 2008. **13**(23-24): p. 1059-66.
3. Kaupmann, K., et al., *GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes.* Nature, 1998. **396**(6712): p. 683-7.
4. Jones, K.A., et al., *GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2.* Nature, 1998. **396**(6712): p. 674-9.
5. Bettler, B., et al., *Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors.* Physiol Rev, 2004. **84**(3): p. 835-67.
6. Saghatelyan, A.K., et al., *Recognition molecule associated carbohydrate inhibits postsynaptic GABA(B) receptors: a mechanism for homeostatic regulation of GABA release in perisomatic synapses.* Mol Cell Neurosci, 2003. **24**(2): p. 271-82.
7. Jones, L.S., *Integrins: possible functions in the adult CNS.* Trends Neurosci, 1996. **19**(2): p. 68-72.
8. Dityatev, A. and M. Schachner, *The extracellular matrix and synapses.* Cell Tissue Res, 2006. **326**(2): p. 647-54.
9. Yeh, J.C., L.A. Otte, and J.A. Frangos, *Regulation of G protein-coupled receptor activities by the platelet-endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1.* Biochemistry, 2008. **47**(34): p. 9029-39.
10. Blein, S., et al., *Structural analysis of the complement control protein (CCP) modules of GABA(B) receptor 1a: only one of the two CCP modules is compactly folded.* J Biol Chem, 2004. **279**(46): p. 48292-306.
11. Laffray, S., et al., *Dissociation and trafficking of rat GABAB receptor heterodimer upon chronic capsaicin stimulation.* Eur J Neurosci, 2007. **25**(5): p. 1402-16.
12. Bettler, B. and J.Y. Tiao, *Molecular diversity, trafficking and subcellular localization of GABAB receptors.* Pharmacol Ther, 2006. **110**(3): p. 533-43.
13. Vigot, R., et al., *Differential compartmentalization and distinct functions of GABAB receptor variants.* Neuron, 2006. **50**(4): p. 589-601.
14. Bowery, N.G., *GABAB receptor: a site of therapeutic benefit.* Curr Opin Pharmacol, 2006. **6**(1): p. 37-43.
15. Groc, L., et al., *NMDA receptor surface trafficking and synaptic subunit composition are developmentally regulated by the extracellular matrix protein Reelin.* J Neurosci, 2007. **27**(38): p. 10165-75.
16. Frischknecht, R., et al., *Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity.* Nat Neurosci, 2009. **12**(7): p. 897-904.
17. Sasaki, T., et al., *Dimer model for the microfibrillar protein Fibulin-2 and identification of the connecting disulfide bridge.* Embo J, 1997. **16**(11): p. 3035-43.
18. Pin, J.P., et al., *GPCR oligomers: two or more for what? Lessons from mGlu and GABAB receptors.* J Physiol, 2009.
19. Carruthers, C.J., et al., *Synthesis and expression of a gene for the rat glucagon receptor. Replacement of an aspartic acid in the extracellular domain prevents glucagon binding.* J Biol Chem, 1994. **269**(46): p. 29321-8.
20. Couvineau, A., et al., *Highly conserved aspartate 68, tryptophane 73 and glycine 109 in the N-terminal extracellular domain of the human VIP receptor are essential for its ability to bind VIP.* Biochem Biophys Res Commun, 1995. **206**(1): p. 246-52.
21. Nasu-Tada, K., et al., *Possible involvement of increase in spinal fibronectin following peripheral nerve injury in upregulation of microglial P2X4, a key molecule for mechanical allodynia.* Glia, 2006. **53**(7): p. 769-75.
22. Tsuda, M., et al., *Fibronectin/integrin system is involved in P2X(4) receptor upregulation in the spinal cord and neuropathic pain after nerve injury.* Glia, 2008. **56**(5): p. 579-85.
23. Tsuda, M., et al., *P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury.* Nature, 2003. **424**(6950): p. 778-83.
24. Ulmann, L., et al., *Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain.* J Neurosci, 2008. **28**(44): p. 11263-8.

25. Moore, K.A., et al., *Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord.* J Neurosci, 2002. **22**(15): p. 6724-31.
26. Coull, J.A., et al., *BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain.* Nature, 2005. **438**(7070): p. 1017-21.
27. Knabl, J., et al., *Reversal of pathological pain through specific spinal GABAA receptor subtypes.* Nature, 2008. **451**(7176): p. 330-4.
28. Pan, T.C., et al., *Structure and expression of Fibulin-2, a novel extracellular matrix protein with multiple EGF-like repeats and consensus motifs for calcium binding.* J Cell Biol, 1993. **123**(5): p. 1269-77.
29. Sasaki, T., et al., *Binding of mouse and human Fibulin-2 to extracellular matrix ligands.* J Mol Biol, 1995. **254**(5): p. 892-9.
30. Sasaki, T., et al., *Expression of Fibulin-2 by fibroblasts and deposition with fibronectin into a fibrillar matrix.* J Cell Sci, 1996. **109 (Pt 12)**: p. 2895-904.
31. Tramier, M., et al., *Picosecond-hetero-FRET microscopy to probe protein-protein interactions in live cells.* Biophys J, 2002. **83**(6): p. 3570-7.
32. Stubbs, C.D., et al., *The use of time-resolved fluorescence imaging in the study of protein kinase C localisation in cells.* BMC Cell Biol, 2005. **6**(1): p. 22.
33. Campbell, R.E., et al., *A monomeric red fluorescent protein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(12): p. 7877-82.
34. Landry, M., et al., *Expression of vesicular glutamate transporters in rat lumbar spinal cord, with a note on dorsal root ganglia.* J Comp Neurol, 2004. **468**(3): p. 380-94.
35. Kim, S.H. and J.M. Chung, *An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat.* Pain, 1992. **50**(3): p. 355-63.
36. Kalmar, B., et al., *The effect of treatment with BRX-220, a co-inducer of heat shock proteins, on sensory fibers of the rat following peripheral nerve injury.* Exp Neurol, 2003. **184**(2): p. 636-47.
37. Lever, I., et al., *Release of BDNF and GABA in the dorsal horn of neuropathic rats.* Eur J Neurosci, 2003. **18**(5): p. 1169-74.
38. Fossat, P., et al., *L-type calcium channels and NMDA receptors: a determinant duo for short-term nociceptive plasticity.* Eur J Neurosci, 2007. **25**(1): p. 127-35.
39. Luo, M.C., et al., *An efficient intrathecal delivery of small interfering RNA to the spinal cord and peripheral neurons.* Mol Pain, 2005. **1**: p. 29.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: *Fibulin-2 regulates GABAB activation in vitro*

Measurement of FRET efficiency between GFP-GABAB1a and DsRed-GABAB2 with different concentrations of Baclofen (1nM to 1mM) (black circles, control). When Fibulin-2 expression is decreased with anti-Fibulin-2 siRNA (blue triangles), efficacy of Baclofen is increased (maximal effect of blue curve *vs* black curve, *p<0,05). In contrast, when cells are treated with exogenous Fibulin-2 protein at 25nM (green curve), maximal effect of Baclofen is decreased as compared to control curve (maximal effect of green plot *vs* black plot, **p<0,01). With 50nM of Fibulin-2 (red plot), the FRET efficiency between the two subunits is abolished. Fibulin-2 decreases dose-dependently the agonist-induced conformational changes. 20 < n < 30. One Way Anova: **a**:*p<0,05; **b**:NS: p>0,05; **c**: **p<0,01.

Figure 2: *Fibulin-2 regulates GABAB activation in vitro*

(A) FRET efficiency between GFP-GABAB1a and DsRed-GABAB2 ± Baclofen at 10^{-6}M. FRET efficiency is decreased after transfection and overexpression of Fibulin-2 and is restored by anti-Fibulin-2 siRNA application in a dose-dependent manner (20 or 40 pmol siRNA). **p<0,01; ***p<0,001 "B1a.B2+fibu2" vs "B1a/B2+fibu2+siRNA20-40" (n=21 cells). ***p<0,001 *vs* "B1a/B2 + Baclofen" unless indicated.

(B) FRET efficiency between GFP-GABAB1a and DsRed-GABAB2 ± Baclofen at 10^{-6}M. FRET efficiency is increased after anti-Fibulin-2 siRNA application in basal conditions (***p<0,001 "B1a/B2" *vs* "B1a/B2+siRNA"). Moreover, the agonist-induced receptor activation is increased after transfection with an anti-Fibulin-2 siRNA but not after transfection with mmRNA (n=21 cells). *p<0,05; ***p<0,001; NS: p>0,05 *vs* "B1a/B2 + Baclofen" unless indicated.

(C) FRET efficiency between GFP-GABAB1a and DsRed-GABAB2 ± GABA at 10^{-4}M. FRET efficiency is decreased after overexpression of Fibulin-2. Moreover, GABA effect is increased after anti-Fibulin-2 siRNA application but not after mmRNA transfection (25< n <35). *p<0,05; **p<0,01; NS: p>0,05 *vs* "B1a/B2 + Baclofen" unless indicated.

(D) FRET efficiency between GFP-GABAB1b and DsRed-GABAB2 ± Baclofen at 10^{-6}M. Fibulin-2 overexpression has no effect on the agonist-induced conformational changes of GABAB1b/GABAB2 (16 < n < 31). *p<0,05; ***p<0,001; NS: p>0,05 *vs* "B1b/B2 + Baclofen" unless indicated.

Figure 3: *Fibulin-2 regulates GABAB signalisation in vitro without altering the dimeric state of the GABAB receptor.*

(A) Stimulation (% of the basal activity) of the [^{35}S]GTPγS binding observed from 1nM of Baclofen to 100µM. SiRNA anti-Fibulin treated primary cell cultures of the rat cortex show higher maximal effect than control cultures (257% ± 29 *vs* 155% ± 23) but the same EC50. However, Fibulin-2 treated cultures show higher EC50 than control cultures (20 *vs* 0.32 µM). Data are expressed as percentage of stimulation.

(B) HA-GABAB2 subunit co-immunoprecipitates in COS-7 cells with GFP-GABAB1a in the presence or in the absence of Fibulin-2 protein (right *vs* left panel). IP : immunoprecipitation; WB : Western-Blot.

Figure 4: *Fibulin-2 modifies the pharmacology of the GABAB receptor*

FRET efficiency between GFP-GABAB1a and DsRed-GABAB2 ± Baclofen at 10^{-6}M.

(A) Baclofen effect is reversed by Saclofen (low affinity antagonist) at 100µM and 1 mM. Application of anti-Fibulin-2 siRNA (20 or 40pmol) suppresses this reversion when Saclofen is used at 100µM (***p<0,001 "B1a/B2+saclo100µM" *vs* "B1a/B2+saclo100µM+ siRNA40"). However, at high dose (1mM), Saclofen remains efficient even if Fibulin-2 expression is suppressed (NS: p>0,05 "B1a/B2+saclo1mM" *vs* "B1a/B2+saclo1mM+ siRNA40") (n=21 cells). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; NS: p>0,05 *vs* "B1a/B2 + Baclofen" unless indicated.

(B) Baclofen effect is reversed by CGP55845 (high affinity antagonist) at 0,5µM and 50µM. Application of anti-Fibulin-2 siRNA (40pmol) suppresses this reversion when CGP is used at 0,5µM (*p<0,05 "B1a/B2+CGP 0,5µM" *vs* "B1a/B2+CGP 0,5µM+ siRNA40"). However, at high dose (50µM), CGP remains efficient even if Fibulin-2 expression is suppressed (NS: p>0,05 "B1a/B2+CGP50µM" *vs* "B1a/B2+CGP50µM+siRNA40") (n=21 cells). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; NS: p>0,05 *vs* "B1a/B2 + Baclofen" unless indicated.

Figure 5: *Fibulin-2 is not responsible for the pharmacological differences in antagonist sensitivity between the two subtypes of GABAB receptor.*

FRET efficiency between GFP-GABAB1b and DsRed-GABAB2 ± Baclofen at 10^{-6}M. Baclofen effect is not reversed by Saclofen, neither at 100µM nor at 1mM. However, CGP55845 reverses the Baclofen effect both at 50µM and 0,5µM. *p<0,05; **p<0,01; NS: p>0,05 *vs* "B1b/B2 + Baclofen" unless indicated.

Figure 6: *Fibulin-2 controls the sensitivity to saclofen of GABAB-mediated presynaptic inhibition.*

(A-B) *Fibuline-2 regulates efficiency of GABAB antagonists*

(A1) Spontaneaous miniature EPSCs (mEPSCs) recorded from cultured spinal neurons transfected with mismatch siRNA before and after application of Baclofen (10µM), Saclofen (100µM) and CGP (50µM). (**A2)** Amplitude cumulative probability for the experiment shown in A1. Inset trace shows superimposed average of 25 mEPSCs obtained in control and in presence of Baclofen. (**A3)** Inter-event interval cumulative probability for the experiment shown in A1. The distribution is significantly shifted towards the right during Baclofen application. (**A4)** Pooled data (n=6) showing average variation in mEPSC amplitude, expressed as percent of control. (**A5)** Pooled data (n=6) showing average variation in mEPSC frequency, expressed as percent of control.

(B1) mEPSCs recorded from cultured spinal neurons transfected with Fibuline-2 siRNA before and after application of Baclofen (10µM), Saclofen (100µM) and CGP (50µM). (**B2)** Amplitude cumulative probability for the experiment shown in B1. Inset trace shows superimposed average of 25 mEPSCs obtained in control and in presence of Baclofen. (**B3)** Inter-event interval cumulative probability for the experiment shown in B1. The distribution is shifted towards the right during Baclofen and Baclofen+Saclofen application. (**B4)** Pooled data (n=5) showing average variation in mEPSC amplitude, expressed as percent of control. (**B5)** Pooled data (n=5) showing average variation in mEPSC frequency, expressed as percent of control.

(C-D) *Fibuline 2 alters the basal presynaptic GABAB tonus.*

Average mEPSC frequency **(C)** and amplitude **(D)** in cultured spinal neurons transfected with mismatch or Fibulin-2-siRNA. Notice that the average frequency is decreased by Fibulin-2 siRNA transfection while average amplitude remains unaltered.

Figure 7: *Fibulin-2 is upregulated in neuropathic rats and colocalizes with GABAB1a at extrasynaptic sites on the plasma membrane.*

(A) qRT-PCR analysis of mRNA of Fibulin-2 in ipsilateral spinal dorsal horn of non-ligated rats (Sham), neuropathic rats (SNL), SNL rats injected with anti-Fibulin-2 siRNA (SNL siRNA) or with mismatch RNA (SNL mmRNA). Data are expressed as percentage of Sham ± sem. Fibulin-2 expression increased in ipsilateral dorsal horn of neuropathic rats (**p<0,01 "Sham" *vs* "SNL"). *p<0,05; **p<0,01; NS: p>0,05.

(B) qRT-PCR analysis of mRNA of Fibulin-2 in dorsal root ganglia of non-ligated rats (Sham), neuropathic rats (SNL). No changes are seen (NS: p>0,05 "Sham" *vs* "SNL).

(C) qRT-PCR analysis of mRNA of Fibulin-1 in ipsilateral spinal dorsal horn of non-ligated rats (Sham), neuropathic rats (SNL). Data are expressed as percentage of Sham ± sem. No significative changes are observed. (NS: p>0,05 "Sham" *vs* "SNL).

(D) Immunohistochemistry for endogenous Fibulin-2 in the dorsal horn of sham (a), and neuropathic (b) rats (n = 4 in each group). Fibulin-2 expression was very low in Sham animals (arrowheads in a) whereas a clear increase could be seen in SNL group (arrowheads in b). The quantification of signal intensity confirmed the significant difference between Sham and SNL groups (n = 7 sections from 3 animals in Sham and SNL groups). **p<0,01

Figure 8: *Endogenous co-expression of B1a and B2 in Sham and neuropathic rats*
(A). Immunohistochemistry for endogenous B1a and Fibulin-2 in lamina II of the dorsal horn of Sham (a to c), and neuropathic (d to f) rats (n = 4 in each group). In Sham animals, B1a subunit (green, arrows) and Fibulin-2 (red, arrowheads) are distributed throughout the dorsal horn but show very little colocalization. In contrast, in SNL rats, colocalization was more frequent (double arrowheads). However, some single labeling was still found for B1a (arrow) and Fibulin-2. Bar = 15 µm (same for all)

(B). Quantification of colocalization in dorsal horn, expressed as the percentage of B1a labeling colocalized with Fibulin-2 (n=8 sections from 3 animals in Sham group; n=7 sections from 3 animals in SNL group). **p<0,01

(C). Double immunogold labelling for B1a (15nm in diameter) and Fibulin-2 (5nm in diameter) in the ipsilateral dorsal horn of SNL rats. Both partners colocalized at the plasma membrane of spinal neurons (double arrowheads in a and b). Gold particles association was found essentially at extra-synaptic sites (b, the synapse is indicated with large arrows). Single Fibulin-2 labeling was also found at the plasma membrane (a, arrow). A=axonal nerve ending; bar=100 nm.

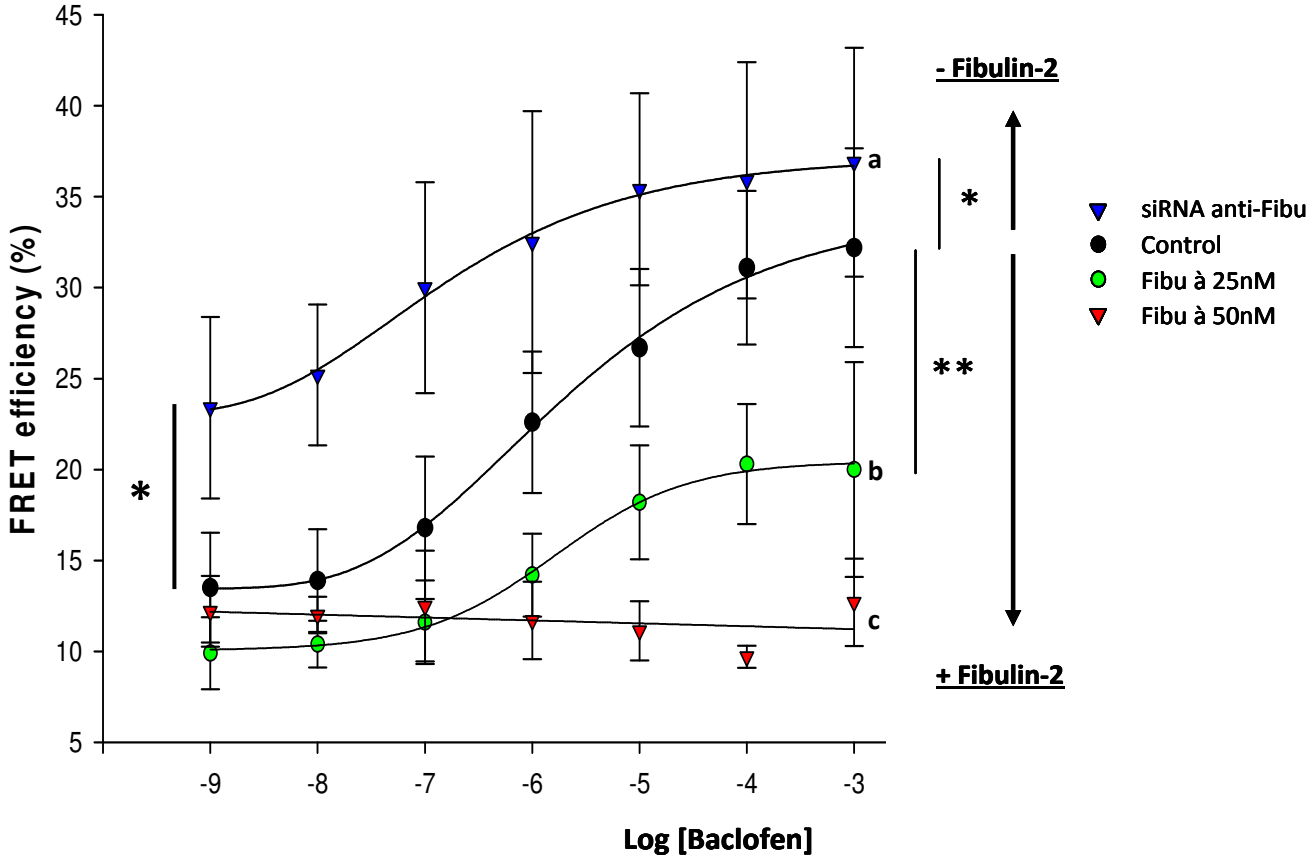
Figure 9: *Endogenous co-expression of Fibulin-2 and CGRP in neuropathic rats*
(A) Immunohistochemistry for endogenous Fibulin-2 and CGRP in lamina II of the dorsal horn of neuropathic (a to c) rats (n=4 in each group). B1a subunit (green) and Fibulin-2 (red) were frequently associated (double arrowhead) although labeling overlap was not strict. Bar=15µm (same for all).

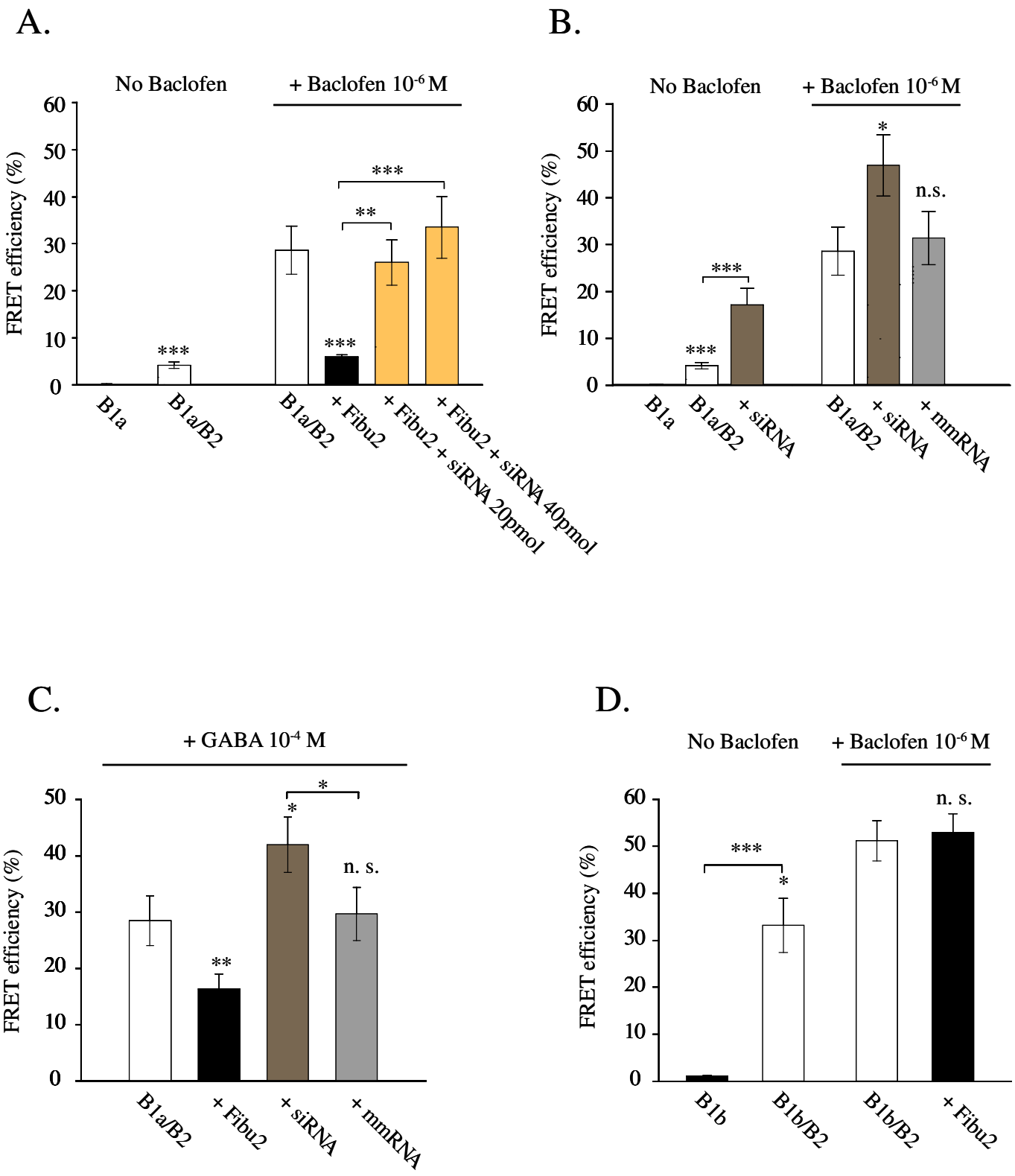
(B). Double immunogold labelling for Fibulin-2 (15nm in diameter) and CGRP (5nm in diameter) in the ipsilateral dorsal horn of SNL rats. CGRP was found in secretory granules (d and e, arrows). Secretory granules-containing processes were surrounded by Fibulin-2 labeling, at the plasma membrane (d and e, arrowheads), mostly at extra-synaptic sites (large arrows in d). Bar=100nm in d; 50nm in e.

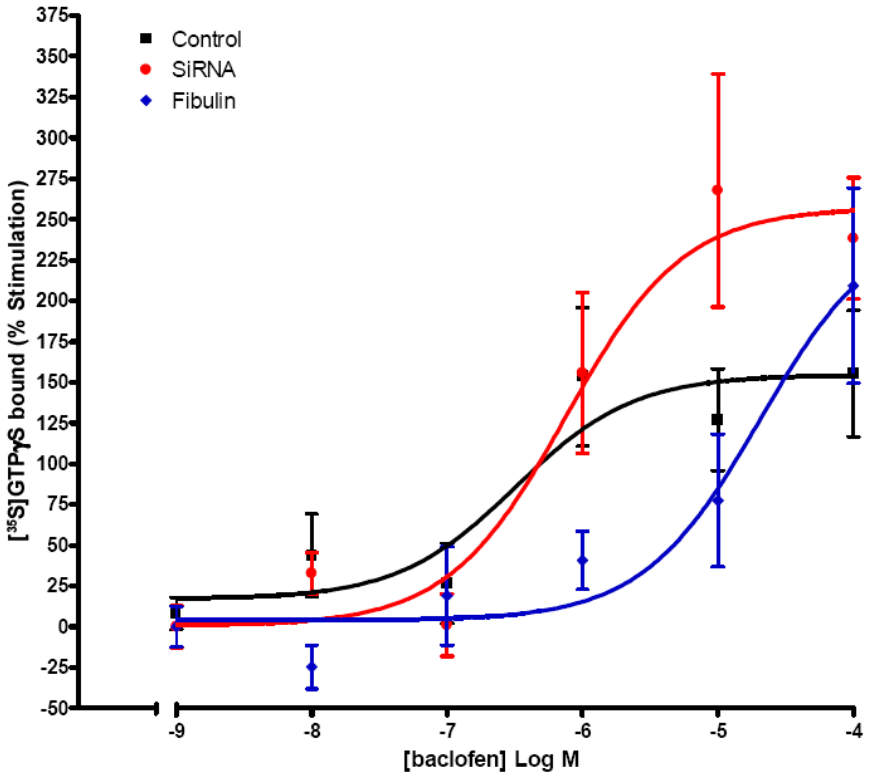
Figure 10: *Intrathecal injection of anti-Fibulin-2 siRNA potentiates the antinociceptive effect of Baclofen in neuropathic rats.*

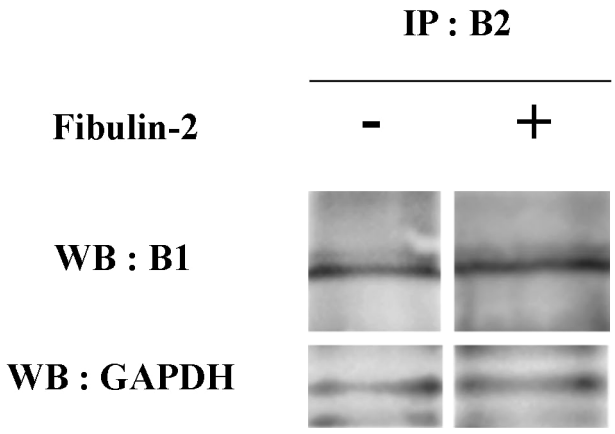
(A) Effects of Baclofen injection in SNL rats before (SNL+Baclo) and after intrathecal injections of anti-Fibulin-2 siRNA (SNL siRNA+Baclo) or mismatch RNA (SNL mmRNA+Baclo). Threshold to mechanical stimulation is measured with Von Frey test. Anti-Fibulin-2 siRNA potentiates the antinociceptive effect of Baclofen in SNL rats (**p<0,01 "SNL+Baclo" vs "SNL siRNA+Baclo"). The threshold before surgery is set to 100%. *p<0,05; **p<0,01; NS: p>0,05.

(B) Effects of Baclofen and Saclofen co-application before (before injection) and after injections of anti-Fibulin-2 siRNA (siRNA-injected) or mismatch RNA (mmRNA-injected). The threshold before injection is set to 100%. Saclofen decreases Baclofen effect before anti-Fibulin-2 siRNA injection (**p<0,01 "Baclofen before injection" *vs* "Saclofen before injection"). Effet of Saclofen injection is abolished after anti-Fibulin-2 siRNA injections (NS: p>0,05 "Baclofen siRNA" vs "Saclofen siRNA") but not after mmRNA injection (*p<0,05 "Baclofen mmRNA" *vs* "Saclofen mmRNA").

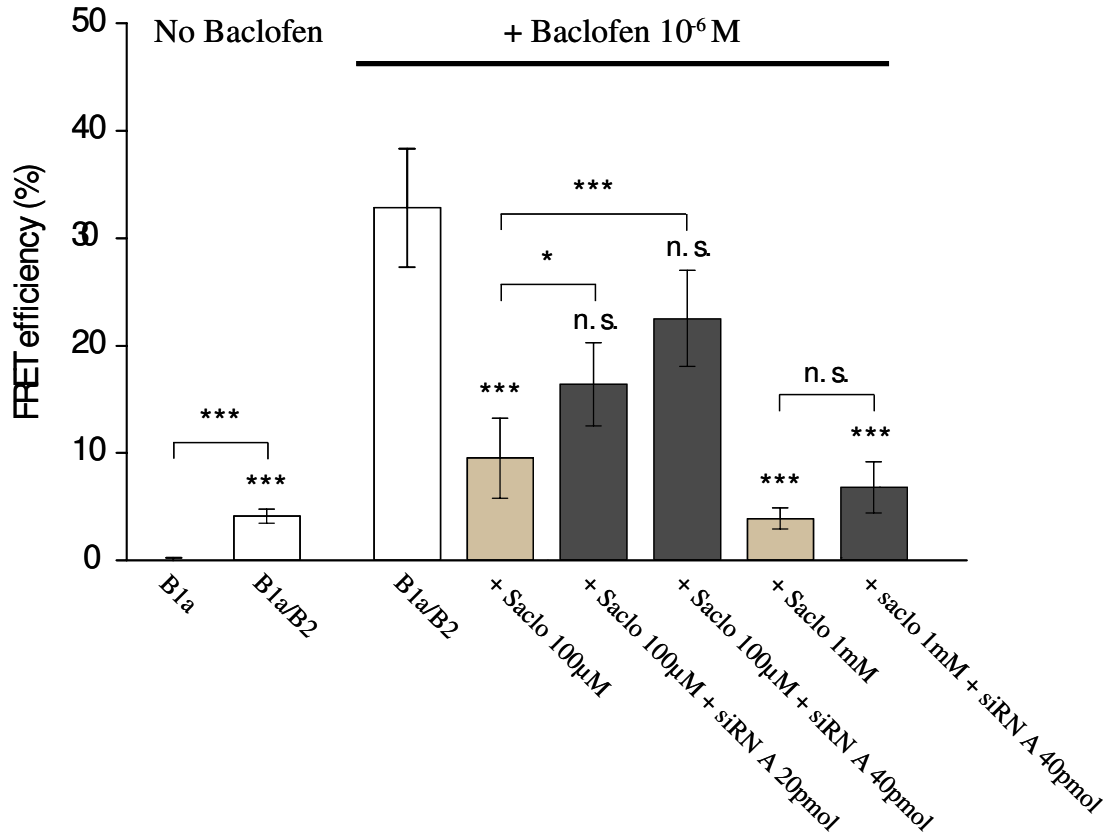

FRET efficiency (%)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
-9
-8
-7
-6
-5
-4
-3
Log [Baclofen]
a
b
c
*
*
**
- Fibulin-2
+ Fibulin-2
siRNA anti-Fibu
Control
Fibu à 25nM
Fibu à 50nM


A.
No Baclofen
+ Baclofen 10-6 M
FRET efficiency (%)
60
50
40
30
20
10
0
***
**
***
***
B1a
B1a/B2
B1a/B2
+ Fibu2
+ Fibu2 + siRNA 20pmol
+ Fibu2 + siRNA 40pmol
B.
No Baclofen
+ Baclofen 10-6 M
FRET efficiency (%)
***
*
n.s.
B1a
B1a/B2
+ siRNA
B1a/B2
+ siRNA
+ mmRNA
C.
+ GABA 10-4 M
FRET efficiency (%)
50
40
30
20
10
0
*
*
**
n. s.
B1a/B2
+ Fibu2
+ siRNA
+ mmRNA
D.
No Baclofen
+ Baclofen 10-6 M
FRET efficiency (%)
60
50
40
30
20
10
0
***
*
n. s.
B1b
B1b/B2
B1b/B2
+ Fibu2

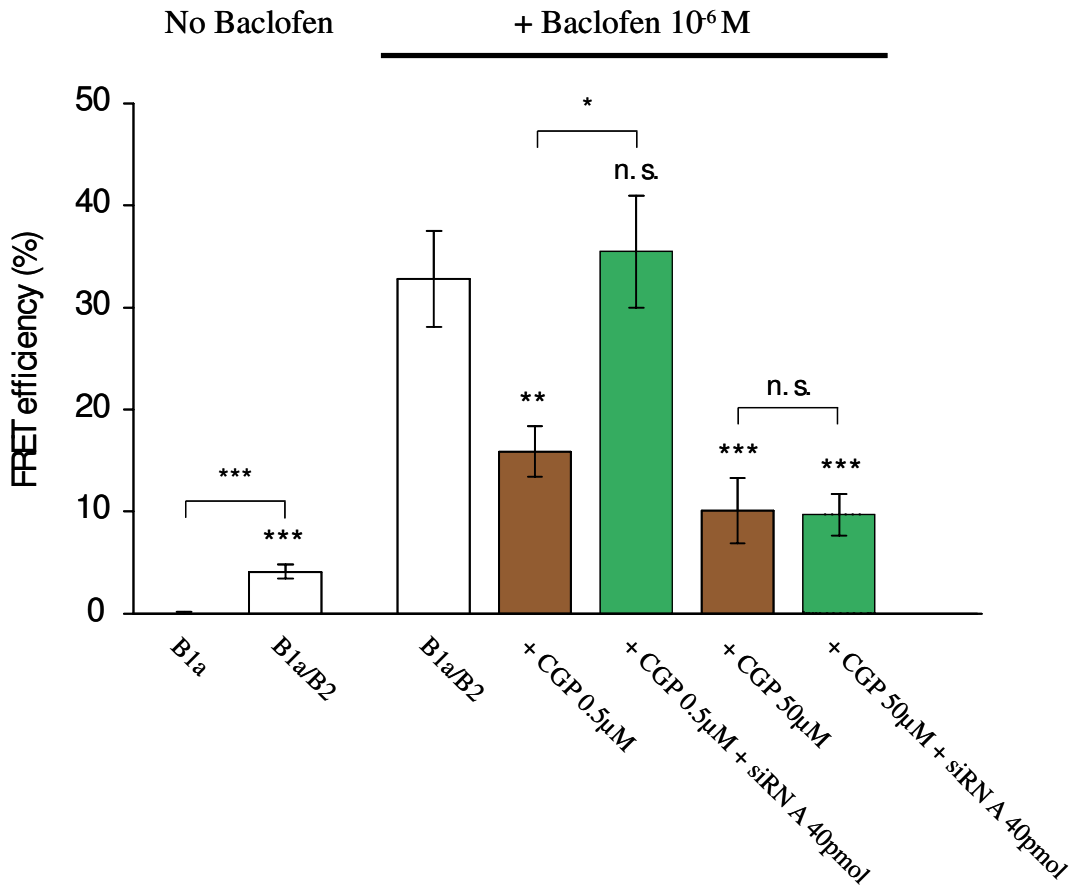

Control
SiRNA
Fibulin
[35S]GTPγS bound (% Stimulation)
375
350
325
300
275
250
225
200
175
150
125
100
75
50
25
0
-25
-50
-9
-8
-7
-6
-5
-4
[baclofen] Log M

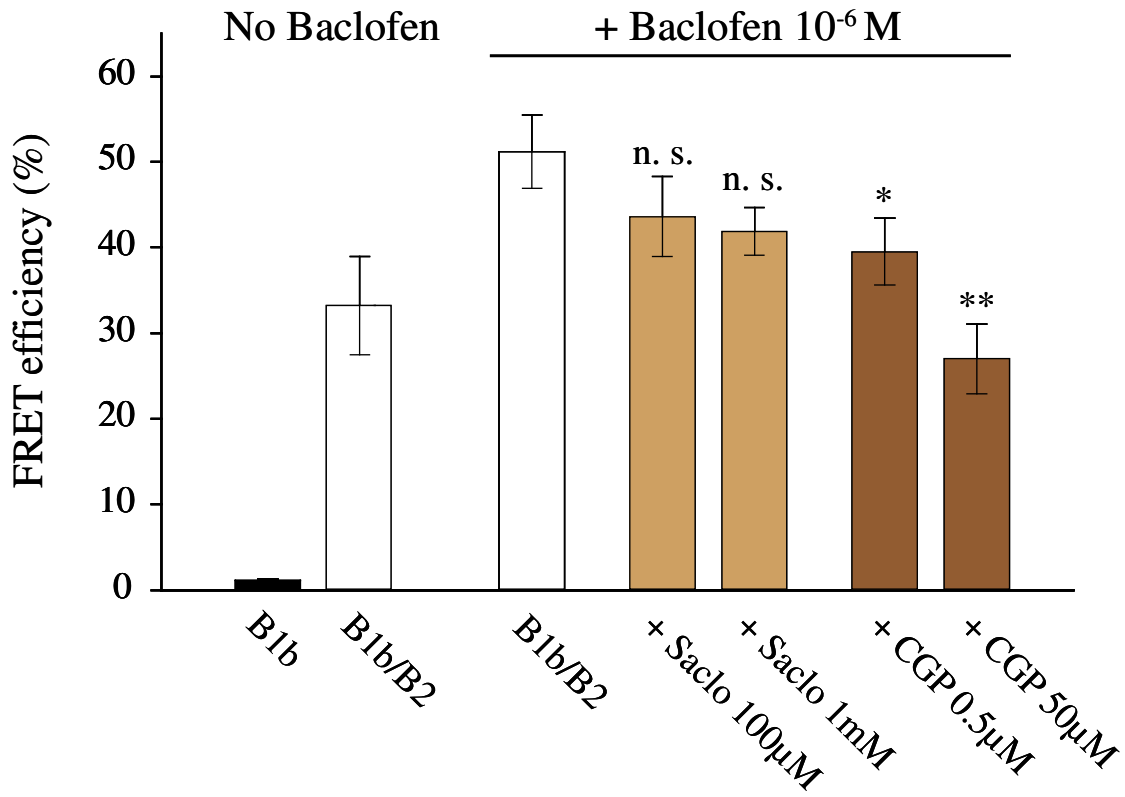

IP : B2
Fibulin-2
-
+
WB : B1
WB : GAPDH

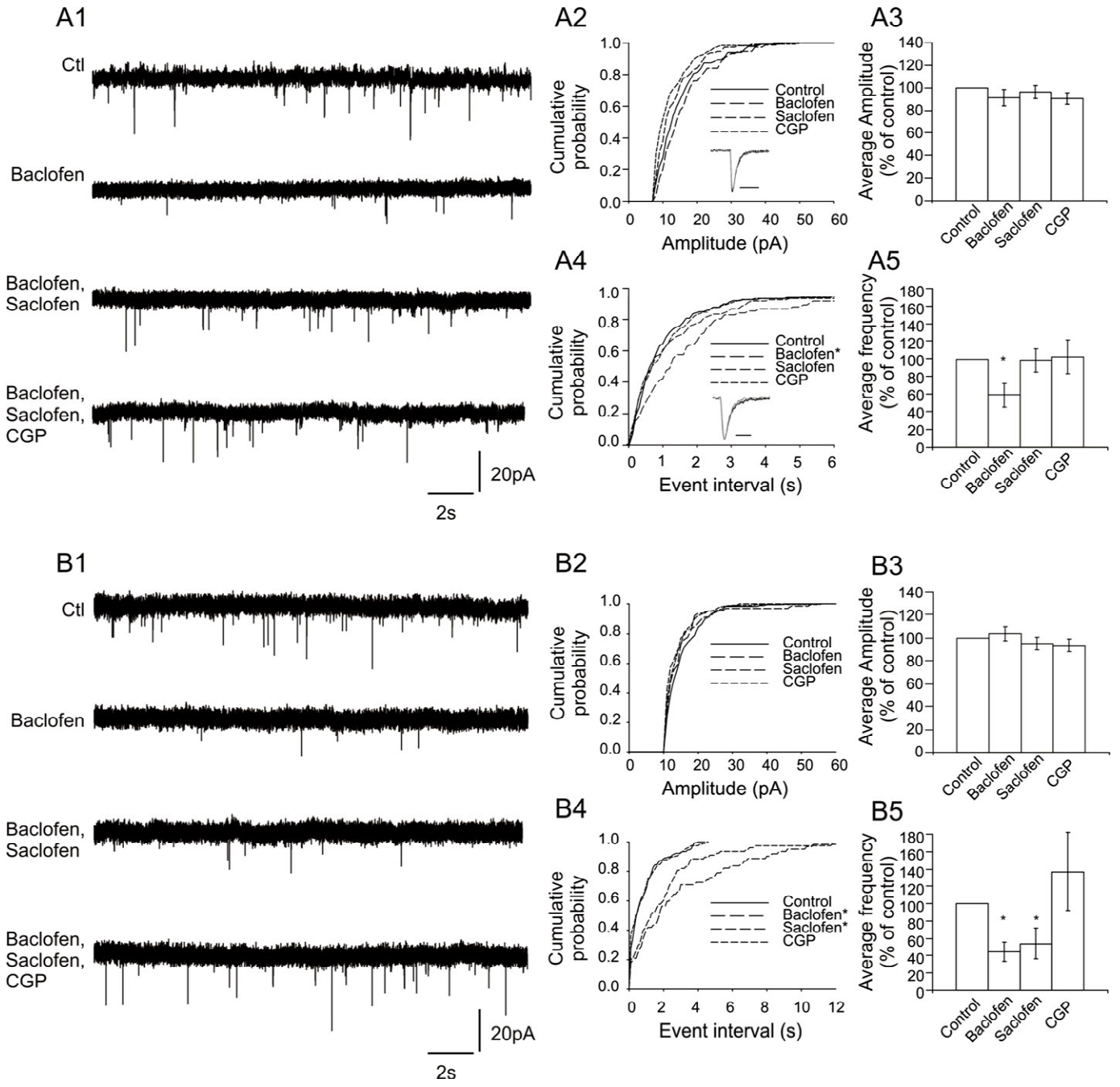
A.

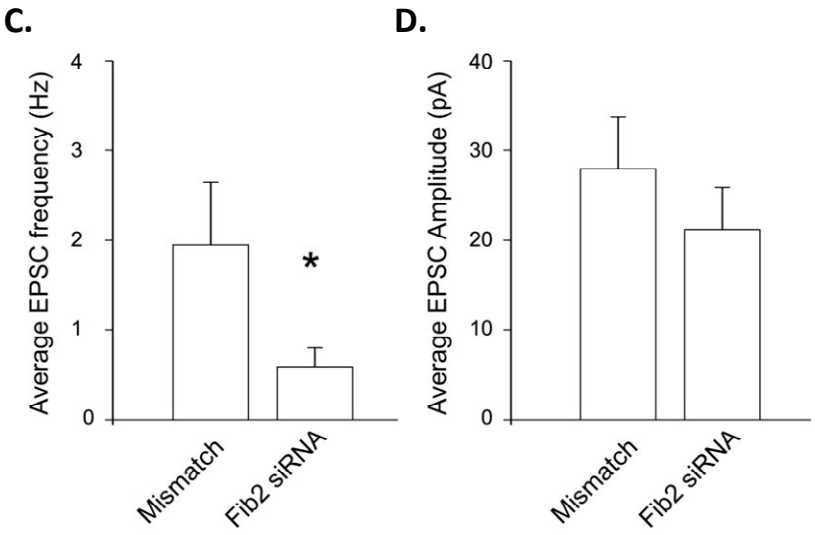

No Baclofen
+ Baclofen 10-6 M
FRET efficiency (%)
50
40
30
20
10
0
***
***
***
*
n. s.
***
n. s.
***
***
n. s.
B1a
B1a/B2
B1a/B2
+ Saclo 100µM
+ Saclo 100µM + siRN A 20pmol
+ Saclo 100µM + siRN A 40pmol
+ Saclo 1mM
+ saclo 1mM + siRN A 40pmol

B.

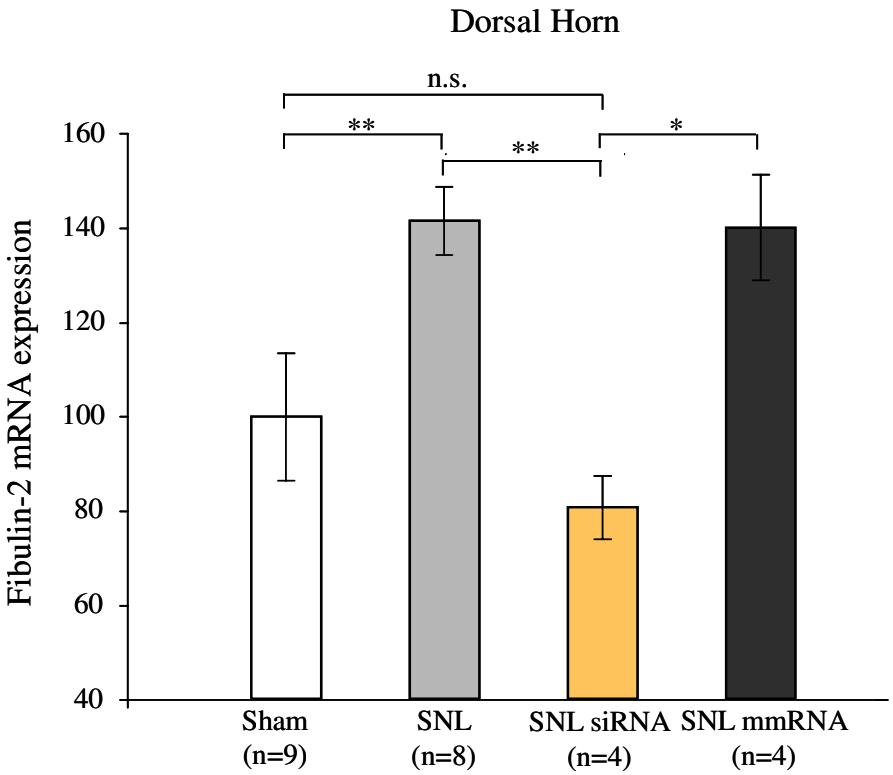

No Baclofen
+ Baclofen 10-6 M
FRET efficiency (%)
50
40
30
20
10
0
***
***
*
n. s.
**
***
n. s.
***
B1a
B1a/B2
B1a/B2
+ CGP 0.5µM
+ CGP 0.5µM + siRN A 40pmol
+ CGP 50µM
+ CGP 50µM + siRN A 40pmol


No Baclofen
+ Baclofen 10-6 M
FRET efficiency (%)
60
50
40
30
20
10
0
n. s.
n. s.
*
**
B1b
B1b/B2
B1b/B2
+ Saclo 100µM
+ Saclo 1mM
+ CGP 0.5µM
+ CGP 50µM

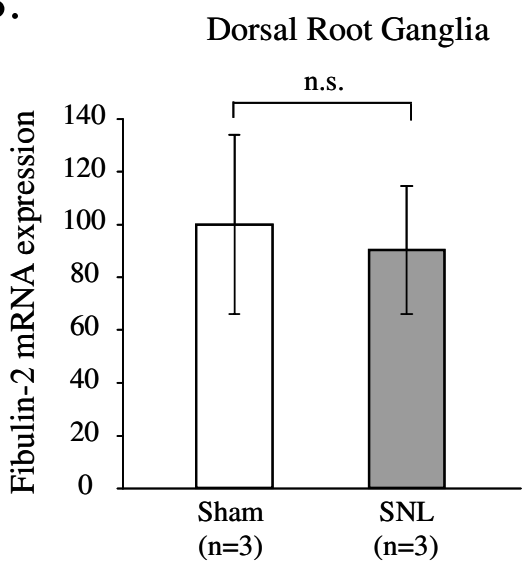

A1
Ctl
Baclofen
Baclofen, Saclofen
Baclofen, Saclofen, CGP
20pA
2s
A2
Cumulative probability
Control
Baclofen
Saclofen
CGP
Amplitude (pA)
A3
Average Amplitude (% of control)
Control
Baclofen
Saclofen
CGP
A4
Cumulative probability
Control
Baclofen*
Saclofen
CGP
Event interval (s)
A5
Average frequency (% of control)
Control
Baclofen
Saclofen
CGP
B1
Ctl
Baclofen
Baclofen, Saclofen
Baclofen, Saclofen, CGP
20pA
2s
B2
Cumulative probability
Control
Baclofen
Saclofen
CGP
Amplitude (pA)
B3
Average Amplitude (% of control)
Control
Baclofen
Saclofen
CGP
B4
Cumulative probability
Control
Baclofen*
Saclofen*
CGP
Event interval (s)
B5
Average frequency (% of control)
Control
Baclofen
Saclofen
CGP


C.
Average EPSC frequency (Hz)
Mismatch
Fib2 siRNA
D.
Average EPSC Amplitude (pA)
Mismatch
Fib2 siRNA

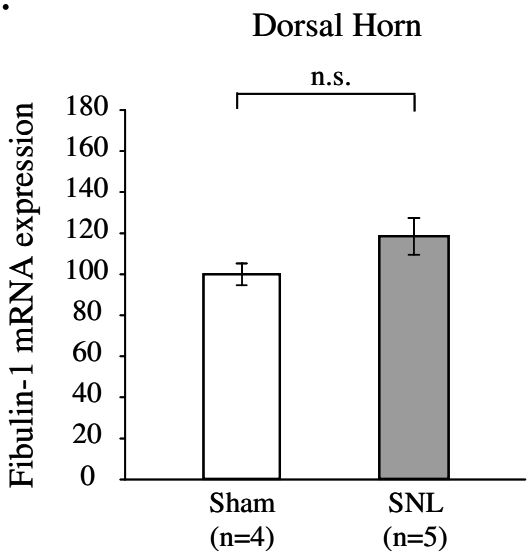
A.


Dorsal Horn
n.s.
**
**
*
Fibulin-2 mRNA expression
160
140
120
100
80
60
40
Sham (n=9)
SNL (n=8)
SNL siRNA (n=4)
SNL mmRNA (n=4)

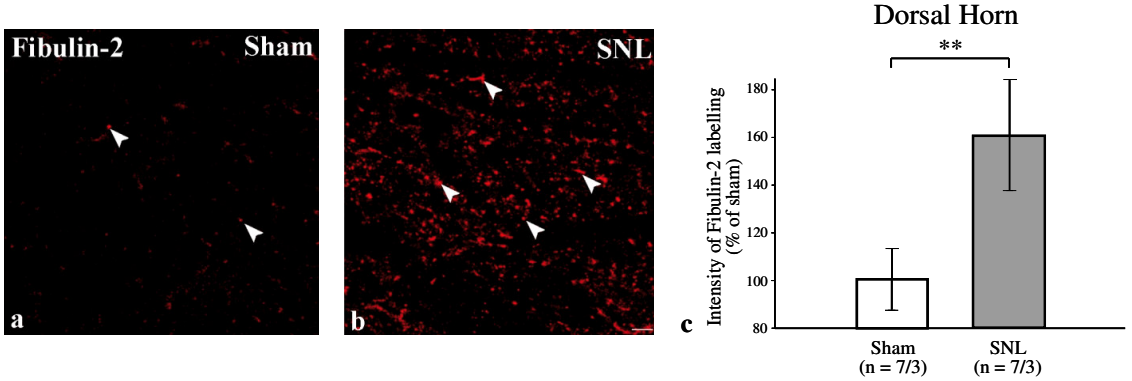
B.


Dorsal Root Ganglia
n.s.
Fibulin-2 mRNA expression
140
120
100
80
60
40
20
0
Sham (n=3)
SNL (n=3)

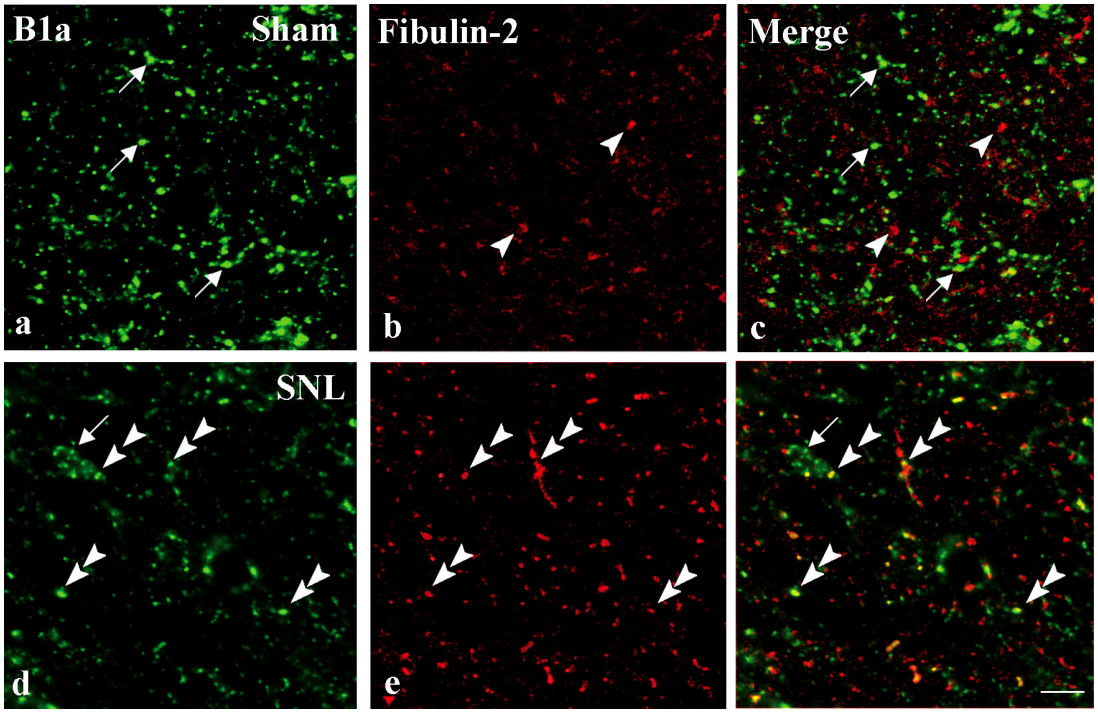
C.


Dorsal Horn
n.s.
Fibulin-1 mRNA expression
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Sham (n=4)
SNL (n=5)

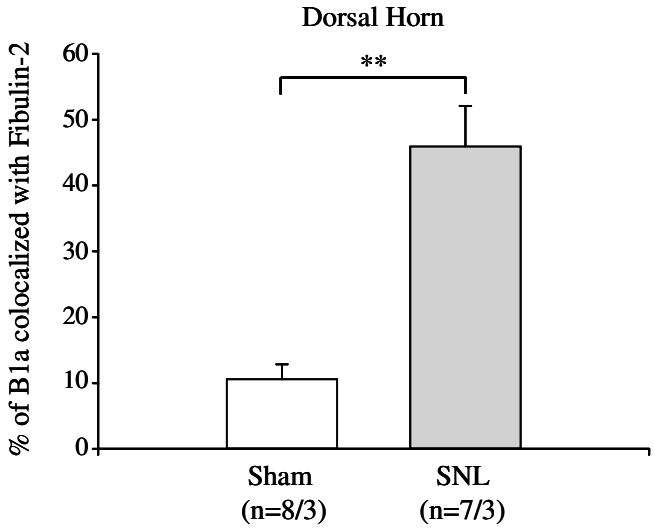
D.


Fibulin-2
Sham
SNL
a
b
c
Dorsal Horn
**
Intensity of Fibulin-2 labelling (% of sham)
180
160
140
120
100
80
Sham (n = 7/3)
SNL (n = 7/3)

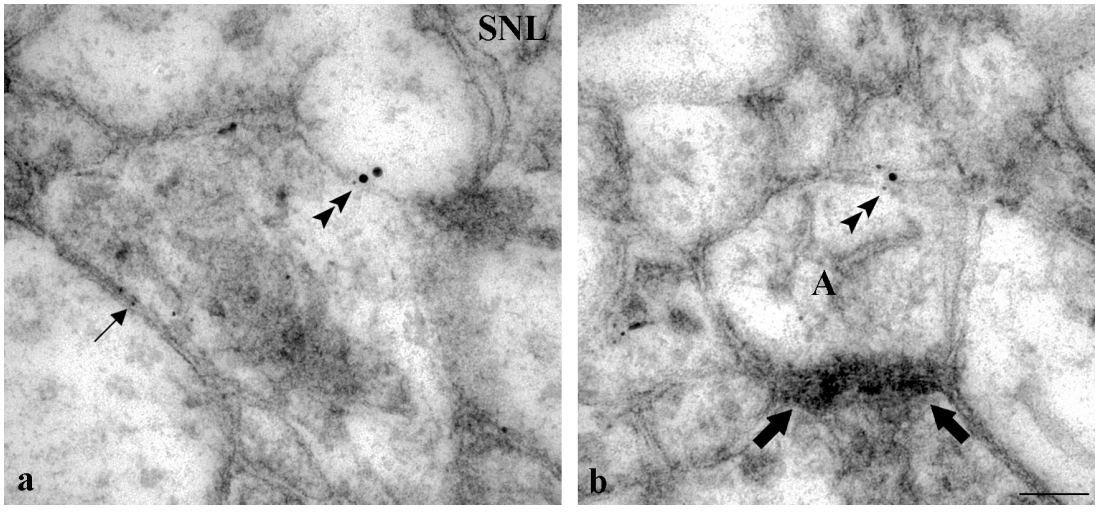
A.


B1a
Sham
Fibulin-2
Merge
a
b
c
SNL
d
e

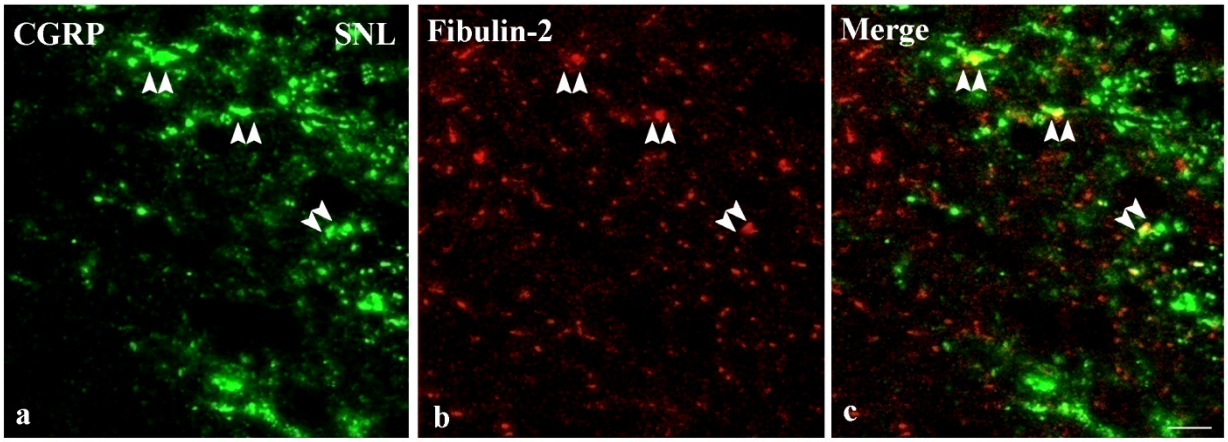
B.


Dorsal Horn
**
% of B1a colocalized with Fibulin-2
60
50
40
30
20
10
0
Sham
(n=8/3)
SNL
(n=7/3)

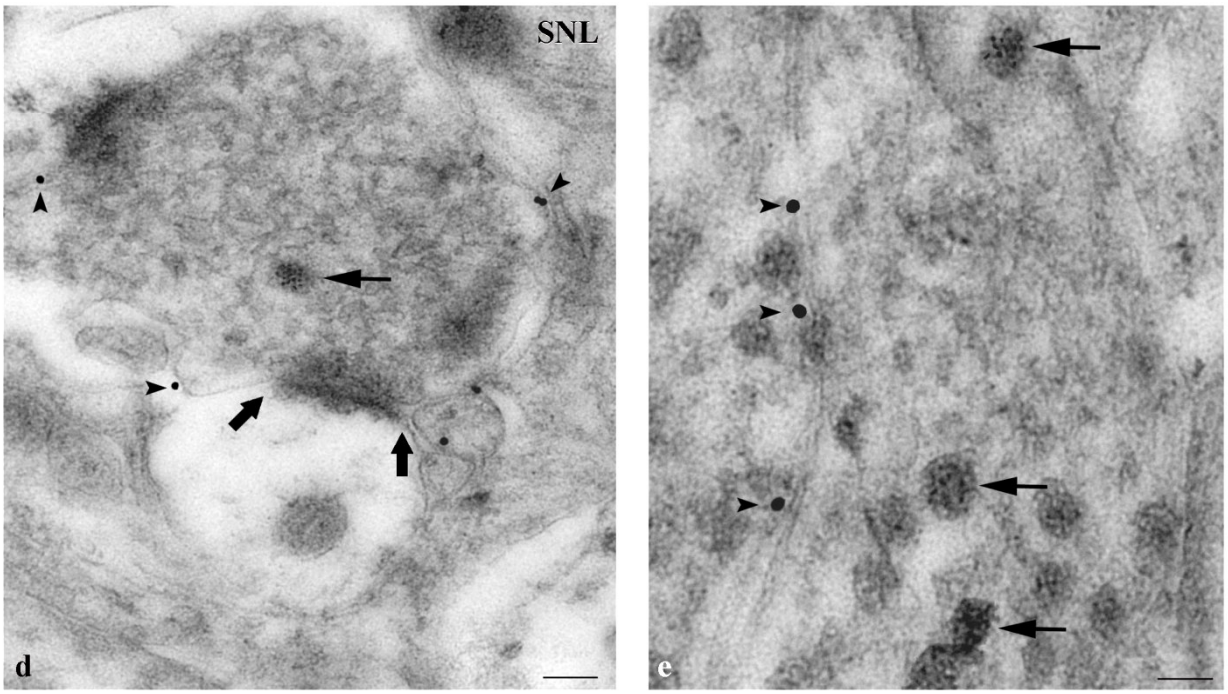
C.


SNL
a
A
b

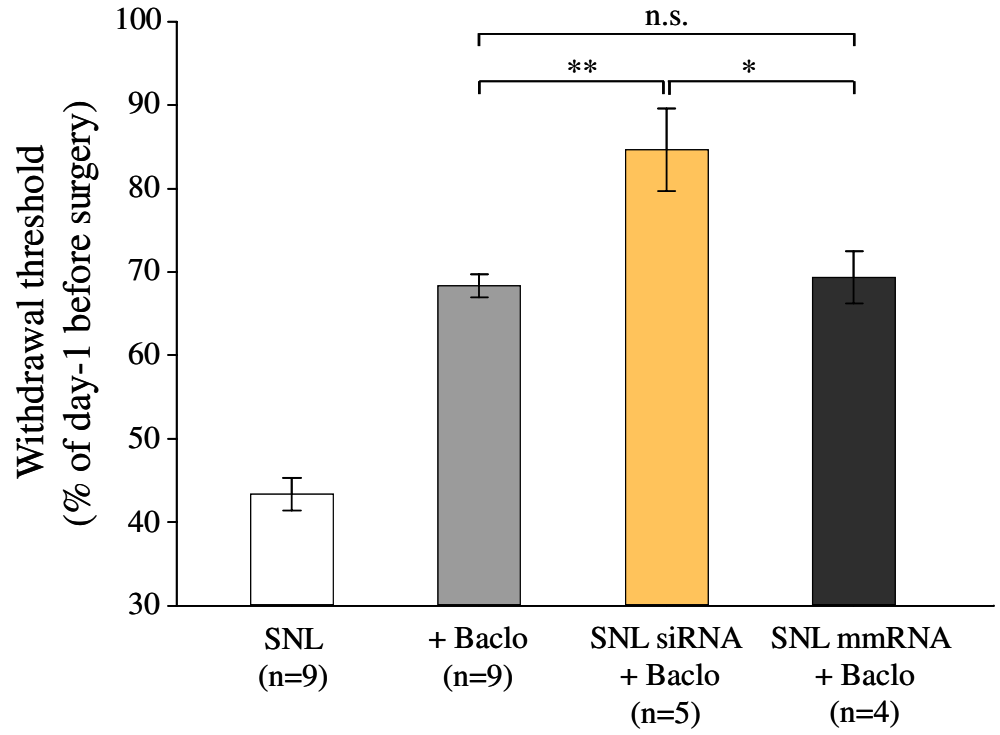
A.



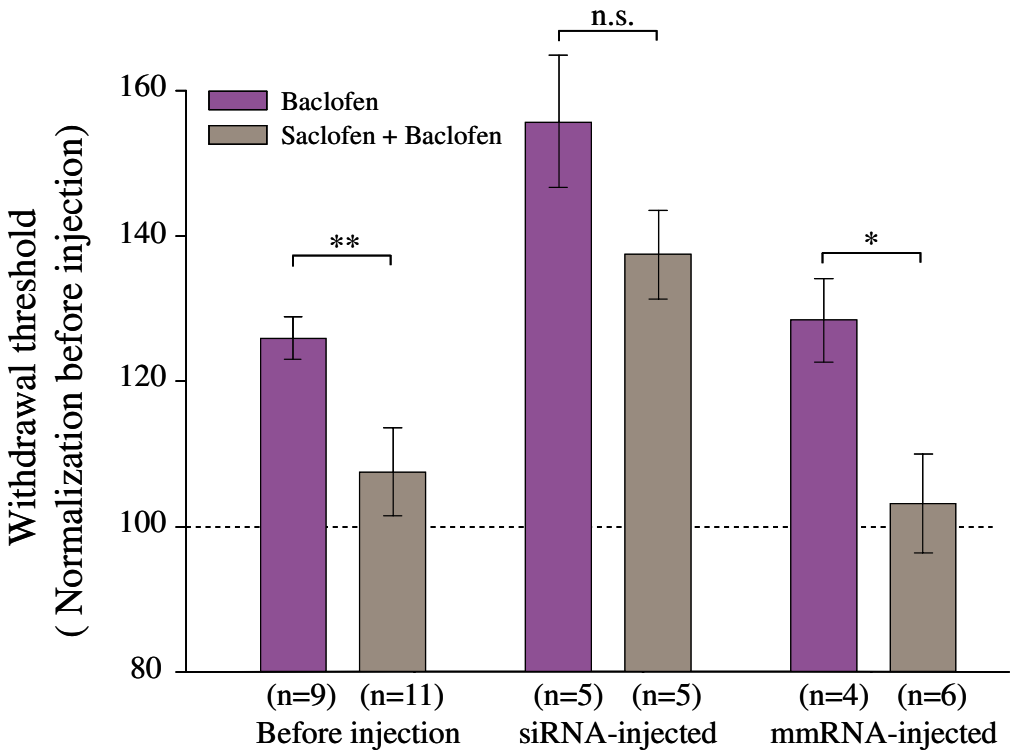
B.



A.


n.s.
**
*
Withdrawal threshold
(% of day-1 before surgery)
100
90
80
70
60
50
40
30
SNL
(n=9)
+ Baclo
(n=9)
SNL siRNA
+ Baclo
(n=5)
SNL mmRNA
+ Baclo
(n=4)

B.


n.s.
Baclofen
Saclofen + Baclofen
**
*
Withdrawal threshold
(Normalization before injection)
160
140
120
100
80
(n=9) (n=11)
Before injection
(n=5) (n=5)
siRNA-injected
(n=4) (n=6)
mmRNA-injected

COMMENTAIRES

Dans cette étude, nous avons montré que (1) la fibuline-2 diminue l'activation du récepteur induite par son agoniste, (2) la fibuline-2 modifie la sensibilité des antagonistes, (3) la fibuline-2 régule l'inhibition $GABA_B$ pré-synaptique, (4) la fibuline-2 est surexprimée dans notre modèle de douleur neuropathique chez le rat, (5) des injections intrathécales de siRNA anti-fibuline-2 réversent partiellement l'allodynie mécanique chez des rats neuropathiques.

Par conséquent, cette étude supporte un nouveau mécanisme de désinhibition du récepteur $GABA_{B,}$ encore non identifié, en conditions de douleurs neuropathiques. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que peu d'études à ce jour montrent une régulation de l'activité d'un RCPG par une protéine de la matrice extracellulaire en conditions physiopathologiques. Nous discuterons de l'ensemble de ces résultats dans la discussion générale de ce manuscrit.

Etude de la mobilité et de la distribution du récepteur $GABA_B$ et de ses protéines associées en conditions normales et douloureuses

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la redistribution du récepteur $GABA_B$ à la surface neuronale en conditions neuropathiques. En effet, des variations de sa localisation pourraient impliquer des modifications du contrôle $GABA_B$ de la transmission synaptique et du couplage entre le récepteur et ses effecteurs intracellulaires (adénylate-cyclase, canaux potassiques Kir3, canaux calciques de type L), ou ses protéines partenaires.

Ces modifications de distribution peuvent être dues à deux types de mécanismes. Le premier d'entre eux induit des modifications à long terme qui reposent sur l'adressage spécifique de protéines néosynthétisées. Des techniques de microscopie à haute résolution, combinées à une reconstruction tridimensionnelle ont montré une telle régulation à long terme de la localisation subcellulaire du récepteur $GABA_B$ à la surface des cellules de Purkinje au cours du développement (Lujan and Shigemoto 2006). Des modifications de localisation du récepteur identifiées dans un contexte développemental, pourraient survenir également après lésion. En effet, la plasticité post-lésionnelle des neurones s'accompagne de la mise en jeu de programmes ontogénétiques (Priestley 2007).

Les modifications de distribution peuvent aussi reposer sur des mécanismes à court terme qui impliquent une mobilité du récepteur membranaire. En effet, la localisation du récepteur $GABA_B$ à la membrane est un phénomène dynamique. Des études de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) ont montré que la sous-unité B2 était capable de diffuser à la surface de neurones de l'hippocampe et de cellules hétérologues (Pooler and McIlhinney 2007). Cette mobilité peut aussi être altérée par des protéines partenaires. Ainsi, Marlin-1, protéine associée aux microtubules, interagit avec la sous-unité B1 et régule le transport du récepteur (Couve et al. 2004; Vidal et al. 2007). Nous avons donc envisagé une régulation de la mobilité latérale du récepteur par la fibuline-2, en conditions normales et neuropathiques.

Les objectifs de cette étude étaient:

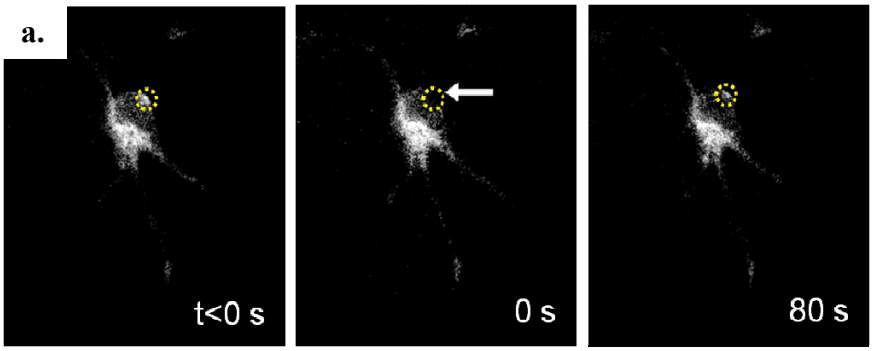
1) Etudier la dynamique du récepteur $GABA_B$ et le rôle de la fibuline-2 sur sa mobilité par une approche dynamique (FRAP).
2) Etudier les modifications de distribution du récepteur $GABA_B$ et de ses protéines associées en conditions de douleurs neuropathiques par une approche ultrastructurale.

Cette étude a débuté au cours de ma thèse et devra se poursuivre par la suite. Mon travail dans ce projet est resté préliminaire, il a consisté à développer certains des outils nécessaires.

I. APPROCHE DYNAMIQUE

Le FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching):

Concernant l'étude dynamique du récepteur, il a fallu mettre au point la technique de FRAP au laboratoire. Ainsi, nous avons seulement obtenu des résultats préliminaires suggérant que la fibuline-2, outre son effet sur les changements d'affinité (Publication II), pourrait agir par un second mécanisme pour limiter l'efficacité du récepteur $GABA_B$ en conditions neuropathiques. Les expériences de FRAP ont été réalisées sur des cultures dissociées de neurones corticaux transfectées avec B1a-GFP et B2-DsRed ± fibuline-2 et traitées ou non avec le baclofène (agoniste du récepteur $GABA_B$). Une zone d'intérêt définie sur la membrane d'une cellule transfectée est photoblanchie pendant 5 msec avec un laser Sapphire à 200mw (Coherent Laser Group, Santa Clara, CA, USA) utilisé à une longueur d'onde de 488nm (cf protocole dans le « Matériel et Méthodes »). La récupération de la fluorescence est mesurée pendant 80 sec post-bleach **(Figure 1a.).** La surexpression de la fibuline-2 modifie la mobilité du récepteur $GABA_B$ en cultures cellulaires. En effet, la fibuline-2 entraîne une diminution de la récupération de la fluorescence 50 sec après le photoblanchiement, de 56,1±2,7% (n=15) à 47,3±2,9% (n=18) **(Figure 1b et 2).** Cependant, après 70 sec, la récupération de la fluorescence n'est plus différente **(Figure 2).** Ces résultats suggèrent que la fibuline-2 pourrait séquestrer le récepteur dans des compartiments neuronaux spécifiques, limitant ainsi son accès aux zones actives ou aux effecteurs intracellulaires.



b.

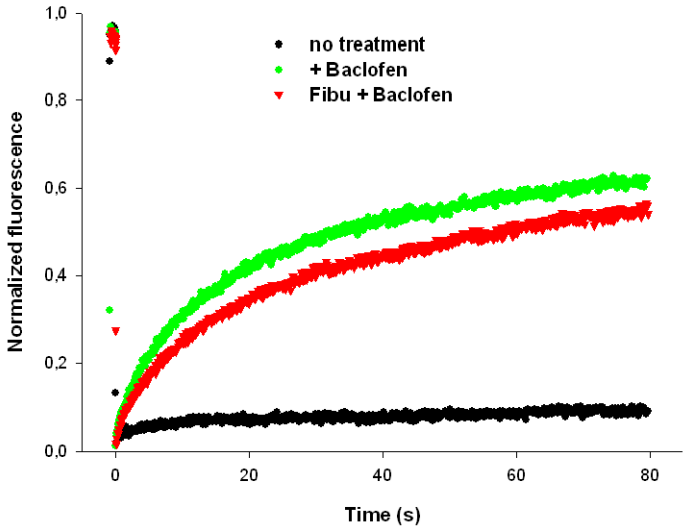


Figure 1: Expériences de FRAP révélant différentes mobilités de la sous-unité GABAB1a. (a) Exemple d'un neurone transfecté avec B1a-GFP avant, pendant, et 80 sec après photoblanchiment d'une zone membranaire (cercle jaune). La région d'intérêt est photoblanchie pendant 5msec avec un laser Sapphire à 200mw (Coherent Laser Group, Santa Clara, CA, USA) utilisé à une longueur d'onde de 488nm. La récupération de la fluorescence est mesurée pendant 80 sec post-bleach. **(b)** Courbes moyennes normalisées de récupération de la fluorescence de B1a-GFP sur des cultures doublement transfectées avec B1a-GFP et B2-DsRed traitées ou non avec le baclofène (en vert et en noir, resp., n=15), et sur des cultures surexprimant en plus la fibuline-2 et traitées avec le baclofène (en rouge, n=18). La récupération est plus rapide sur des cellules traitées avec le baclofène (courbe verte comparée avec la courbe noire). La surexpression de la fibuline-2 diminue la récupération de la fluorescence de B1a-GFP (courbe rouge comparée à la courbe verte).

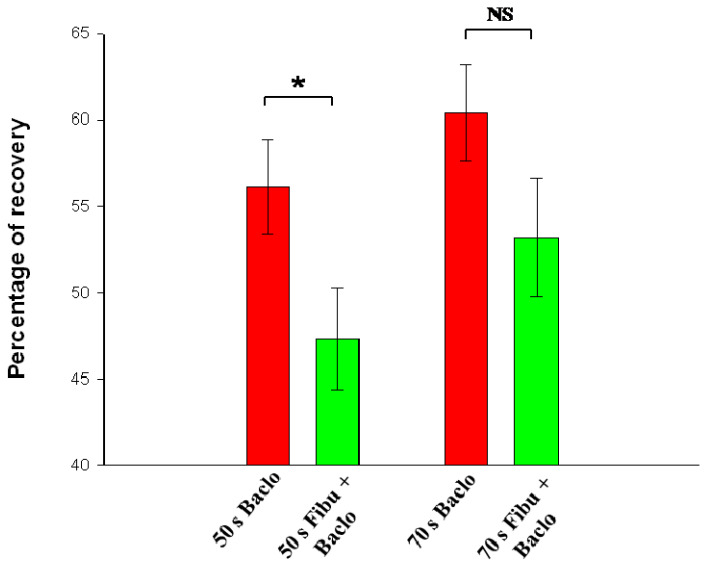


Figure 2: La récupération de fluorescence est significativement plus importante sur des cellules doublement transfectées que sur des cellules surexprimant en plus la fibuline-2 après 50 sec (+ Baclo=56,1±2,7%, Fibu + Baclo=47,3±2,9%, Student's *t* test, P<0,05) mais pas 70 sec après photoblanchiment (+ Baclo=60,3±2,7%, Fibu + Baclo=53,2±3,4%, Student's *t* test, P>0,05).

La principale limite de ces résultats est que la mobilité latérale et le trafic intracellulaire ne peuvent être distingués dans ce cas.

Perspectives :

1) Il faudra utiliser une construction B1a couplée à une étiquette GFP sensible au pH (Phluorin) pour se limiter uniquement à la mobilité latérale membranaire du récepteur. En effet, la fluorescence est éteinte dans les compartiments intracellulaires d'endocytose à pH acide (Miesenbock et al. 1998). De cette façon, les récepteurs à la surface membranaire peuvent être détectés spécifiquement et suivis par des approches d'imagerie sur cellules vivantes (Ashby et al. 2004).
2) De plus, il sera intéressant de faire une étude utilisant des quantum dots afin de suivre les trajectoires du récepteur. Nous pourrions étudier la mobilité membranaire au niveau synaptique. Les quantités de fractions immobile et mobile pourront aussi être définies (Lippincott-Schwartz et al. 2001; Groc et al. 2007; Mikasova et al. 2008; Thoumine et al. 2008; Jaskolski et al. 2009).

Il a été récemment démontré que les protéines de la matrice extracellulaire pouvaient compartimentaliser la surface neuronale et restreindre ainsi la mobilité de surface des récepteurs (Frischknecht et al. 2009). L'ensemble de nos données pourrait généraliser ces résultats en montrant qu'une protéine de la matrice, la fibuline-2, limite l'activation du récepteur $GABA_B$ en le confinant dans des domaines inactifs. Nous montrerions ainsi que la matrice extracellulaire contrôle la disponibilité des récepteurs pour les synapses. Un tel mécanisme de régulation de la plasticité synaptique présenterait alors une signification beaucoup plus large que le simple contexte des douleurs chroniques. Nous discuterons de façon plus détaillée le rôle des protéines extracellulaires sur la mobilité d'un récepteur couplé aux protéines G dans la discussion générale de ce manuscrit.

II. APPROCHE ULTRASTRUCTURALE

Analyse morphologique grâce à des cryométhodes :

La microscopie électronique en transmission (MET) a amélioré considérablement les recherches en biologie cellulaire. Grâce à sa haute résolution, la MET a permis de mettre en évidence plusieurs organelles ainsi que l'organisation ultrastructurale des tissus (Palade et al. 1954). L'inconvénient de la MET est que les échantillons à l'état natif ne peuvent être imagés

directement. En effet, l'échantillon doit pouvoir supporter l'énergie du bombardement des électrons, ce qui implique qu'il soit non vivant. De plus, l'eau des échantillons doit être éliminée car l'observation est réalisée dans des conditions de vide. Enfin, l'échantillon doit pouvoir être traversé par les électrons, ainsi, seulement des coupes fines de matières solides peuvent être observées (Hayat 2000). Dans la procédure standard, les échantillons biologiques sont fixés chimiquement, puis déshydratés, enrobés dans une résine, et des coupes ultrafines sont réalisées et contrastées avec des ions métalliques lourds (Pease et al. 1981). Cependant, toutes ces étapes de préparation peuvent introduire de nombreux artéfacts ; la fixation avec le glutaraldéhyde et la déshydratation à température ambiante avec les solvants organiques entraînent, par exemple, une agrégation des protéines, un affaissement des glycanes (oligo et polysaccharides attachés à des glycolipides et glycoprotéines), et une perte des lipides (Cope et al. 1968; Cope et al. 1969; Cope et al. 1969; Kellenberger et al. 1992; Studer et al. 2008).

En collaboration avec la plateforme de microscopie électronique du centre d'imagerie de Bordeaux (BIC), nous avons adapté à nos modèles animaux de douleur, d'autres techniques de préparations des tissus : les cryométhodes (PLT : Progressing Lowering of Temperature et HPF : High Pressure Freezing). Nous avons validé la faisabilité de ces protocoles en étudiant les modifications ultrastructurales des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière chez des animaux Sham et neuropathiques (modèle SNL, cf protocole dans le chapitre « Matériel et Méthodes »).

a. Les cryométhodes

La première technique de cryométhode utilisée est la PLT (Progressing Lowering of Temperature, cf protocole dans le chapitre « Matériel et Méthodes ») qui implique dans sa première étape une fixation chimique. Les étapes de substitution et d'enrobage en résine se font ensuite à basse température. En effet, plus la température est basse, moins il y a d'extraction et meilleure est la préservation de l'antigénicité. La déshydratation débute à 0°C, la température est abaissée au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration en solvant. Cependant, la fixation chimique reste un obstacle puisqu'elle altère le tissu et donc la morphologie synaptique. De par leur forte osmolarité, les fixateurs aldéhydiques utilisés causent une rétraction des tissus (Hayat M, 1982). Ils provoquent un rétrécissement du diamètre des boutons synaptiques **(Figure 2a et c).** De plus, les aldéhydes entraînent une agrégation des filaments (Gulley et al. 1981; Tatsuoka et al. 1989).

Une alternative à la fixation chimique est une fixation physique par le froid. Toutefois, les protocoles de congélation classiques, dont les vitesses de refroidissement sont lentes, induisent la formation de cristaux de glace qui détruisent les tissus. La glace formée dans le cytoplasme induit des phases de séparation entre l'eau et les solutés (matière organique et sels). Les composés cellulaires sont concentrés et précipitent entre les ramifications des cristaux de glace, phénomène visible en microscopie électronique (Allison et al. 1987; Dubochet 2007). Il arrive même que ces cristaux de glace s'enfoncent à l'intérieur des membranes cellulaires et détruisent les organelles (Meryman 2007). Pour remédier à ce problème, certains auteurs ont développé des techniques de congélation ultra-rapide telles que l'immersion d'un échantillon de petite taille (<100nm) dans de l'éthane liquide (-88,7°C). Cette technique de « plunge-freezing » permet d'obtenir de la glace amorphe et limite la formation de cristaux de glace. Cependant, elle permet d'obtenir au mieux une vitrification de quelques micromètres d'épaisseur (Galway et al. 1995; Richter et al. 2007). Le fort gradient de refroidissement à la surface de l'échantillon diminue très rapidement à l'intérieur de celui-ci, jusqu'à une valeur qui provoque la cristallisation de l'eau.

Une alternative exploitée tout d'abord par Moor et son étudiant Riehle (Moor et al. 1980; Dubochet 2007) a été de modifier la pression lors de la congélation. En effet, sous des conditions de très fortes pressions (2100 bar=2100.10^5 pascal) et pour des températures inférieures à -90°C, l'eau est congelée très rapidement (environ 10ms) sous forme de glace amorphe **(Figure 3).** Le tissu est ainsi stabilisé dans son état natif (Dubochet et al. 1988; Studer et al. 1989; Studer et al. 2008). De plus, les composés chimiques sont stabilisés en limitant la redistribution des électrolytes inorganiques et les constituants diffusibles par non-formation des cristaux de glace. La congélation à très haute pression (-196°C ; P=2100 bar) augmente ainsi l'épaisseur des couches vitrifiées par un facteur de dix par rapport aux techniques de congélation à pression ambiante (par ex, le « plunge-freezing »). Le protocole détaillé de la cryofixation par haute pression (HPF) est décrit dans le chapitre « Matériel et Méthodes ». Cette technique de HPF permet d'améliorer la préservation du tissu **(Figures 4b et d)** comme le décrivent plusieurs auteurs (Zuber et al. 2005; Rostaing et al. 2006).

Après HPF, des structures en épines sont clairement distinguées et les vésicules de neurotransmetteurs organisées en chapelet sont réparties de façon homogène dans le bouton pré-synaptique **(Figures 4d et 5),** comme l'ont observés Siksou et collaborateurs (Siksou et al. 2007). Les synapses sont mieux conservées après cryofixation et cryosubstitution (Frotscher et al. 2007). Les membranes sont lisses, les structures ne sont pas réduites et le cytoplasme apparaît dense, ce qui démontre qu'il y a moins de précipitation et de perte de

matière solide. Le tissu est uniformément préservé après HPF tandis que des espaces vides, « extraits », dominent après fixation chimique **(Figure 4).**

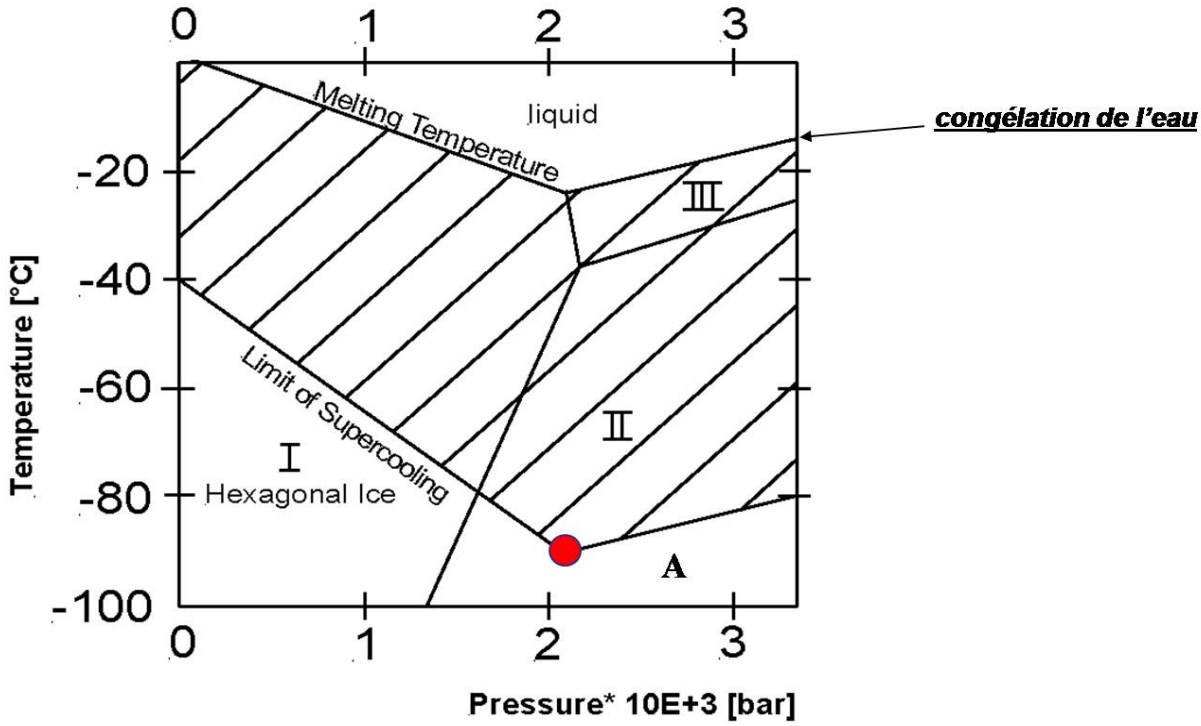


Figure 3 : Diagramme de phase de l'eau. À la pression atmosphérique normale (101 325 Pa), l'eau est sous forme de glace lorsque sa température est inférieure à sa température de fusion qui est, par convention, de 0°C. À la pression atmosphérique normale (et jusqu'à une pression d'environ 0,2 GPa ou 2 000 bars), les molécules d'eau de la glace ordinaire forment une structure cristalline suivant un réseau hexagonal (a = 4,52 Å, c = 7,37 Å), dont la stabilité est assurée par des liaisons hydrogène ; cette variété allotropique est appelée glace hexagonale. En fonction des conditions de température et de pression, la glace peut adopter d'autres structures cristallines, généralement plus compactes que la glace ordinaire : I = glace hexagonale ; II = glace orthorhombique centrée ; III = glace tétragonale et A = glace amorphe. La congélation à très haute pression (-196°C ; P=2100 bar, point rouge) correspond au point de congélation et de vitrification de l'eau les plus bas.

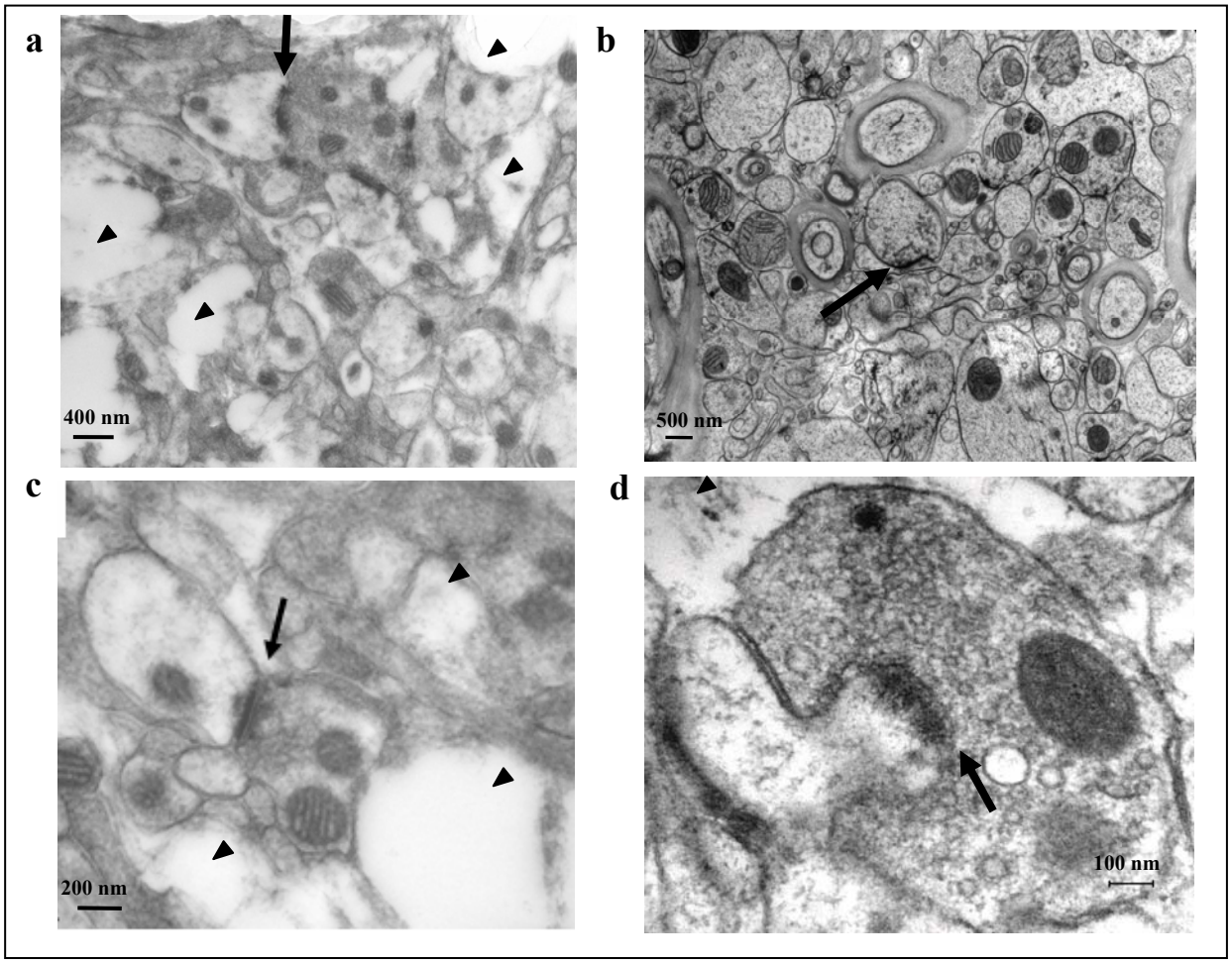


Figure 4 : Photos de ME pour une étude morphologique. (a et c) Photos obtenues après fixation chimique (PLT). L'intégrité des tissus est peu préservée. Nous pouvons observer des zones d'extraction tissulaire (têtes de flèche). Les flèches pointent des synapses. **(b et d)** Photos obtenues après cryofixation à haute pression (HPF). Le tissu est mieux préservé. Les membranes sont clairement délimitées. **(d)** Photo d'une épine obtenue après fixation par cryométhode (HPF). Nous distinguons le bouton présynaptique contenant un amas de vésicules claires et l'épine post-synaptique. La flèche pointe la densité post-synaptique de la synapse excitatrice, située sur l'épine dendritique.

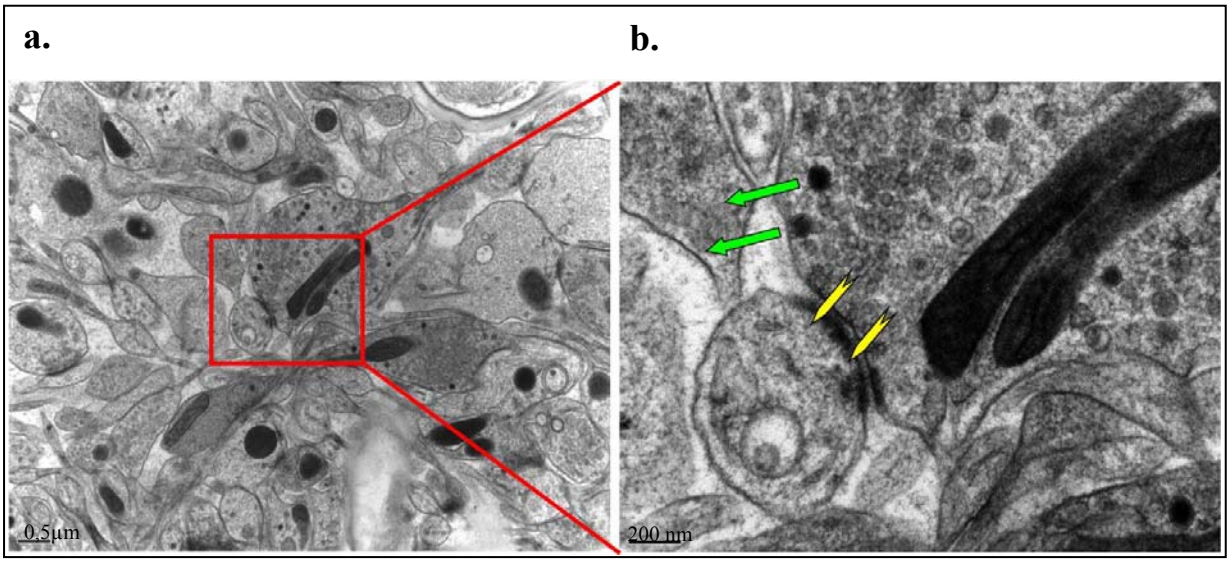


Figure 5 : Spécificité des sites de libération des vésicules. (a) Photo obtenue après cryofixation (HPF). **(b)** Grossissement de la zone rouge en a. Nous pouvons observer une zone de libération synaptique des vésicules claires (neurotransmetteurs) (flèches jaunes) et une zone possible de libération extrasynaptique des vésicules à cœur dense (neuropeptides) (flèches vertes).

- Distribution des vésicules claires à la synapse : Pour évaluer la qualité de la préservation obtenue par HPF et montré que ce protocole permet d'accéder à des informations nouvelles, nous avons comparé la distribution des vésicules claires ou vésicules de neurotransmetteurs, au niveau des synapses des neurones spinaux, entre des animaux Sham et neuropathiques **(Figure 6).** Il a été montré que les fixateurs chimiques d'action lente induisent une redistribution particulière des vésicules synaptiques que l'on ne retrouve pas après HPF (Weimer 2006). Globalement, après HPF, les vésicules claires sont de tailles uniformes et parfaitement circulaires. La fusion de ces vésicules avec la membrane du bouton synaptique est aussi fréquemment observée **(Figure 5).** Nous pouvons observer une distribution étalée dans l'espace de ces vésicules claires chez les animaux Sham **(6a).** Les vésicules des animaux SNL ont au contraire une distribution plus compacte et plus proche de la membrane synaptique **(6b)** que chez les Sham. Afin de comparer ces distributions, nous avons évalué la distance à la synapse des vésicules. Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen du nombre de vésicules par synapse, réparties sur des intervalles de 50 nm **(6c).** A moins de 50 nm de la synapse, il y a en moyenne 0.6% ± 0,45 de vésicules chez les animaux Sham, contre 1.9% ± 0,40 chez les SNL (p=0.026). Entre 50 et 100 nm de la synapse, une moyenne de 4.44% ± 1,85 de vésicules est comptabilisée chez les animaux Sham, contre 9.45% ± 1,65 chez les SNL (p=0.002). Enfin, entre 300 et 350 nm, la tendance s'inverse avec en moyenne 13.24% ± 1,84 des vésicules chez les animaux Sham contre 8.53% ± 0,82 chez les rats neuropathiques (p=0.033).

L'efficacité de la transmission synaptique peut être en partie expliquée par les modifications des différents pools de vésicules synaptiques. Rizzoli et collaborateurs ont décrit trois pools de vésicules synaptiques selon leur distance à la zone active: le pool facilement libérable ou RRP (Readily Releasable Pool, <60nm), le pool recyclable ou RP (60-200nm) et le pool de réserve (>200nm) (Rizzoli et al. 2004). Dans cette étude, nous avons observé une augmentation des pools RRP et RP, et une diminution du pool de réserve chez les animaux neuropathiques. Certains auteurs ont montré que la LTP conduit à une augmentation du relargage des neurotransmetteurs (pool RRP) (Stanton et al. 2005; Lushnikova et al. 2008). Une autre étude dans le cortex cingulaire antérieur a montré que chez des modèles d'inflammation chronique chez des souris, il y a une augmentation de la probabilité de relargage des neurotransmetteurs et une augmentation du nombre de vésicules disponibles alors que seule une augmentation de la probabilité de relargage est observée dans des modèles de douleurs neuropathiques (ligation du nerf péronéal commun) (Toyoda et al. 2009). Les mécanismes présynaptiques mis en jeu semblent donc différents en fonction du modèle de neuropathie. La toxine botulinique de type A diminue ce relargage exagéré de neurotransmetteurs dans les terminaisons synaptiques des neurones sensoriels trigéminaux et

soulage ainsi le comportement douloureux suite à une constriction du nerf infraorbital (Kitamura et al. 2009). Nos résultats confirment ces données et montrent que la transmission synaptique exagérée des neurones de la moelle épinière en conditions douloureuses s'explique en partie par une augmentation du relargage des neurostranmetteurs (pool RRP) ainsi qu'un recyclage rapide des vésicules (pool RP). Le pool de réserve se rapprocherait de la synapse pour potentialiser cette transmission synaptique d'où la diminution de ce pool qui est observée.

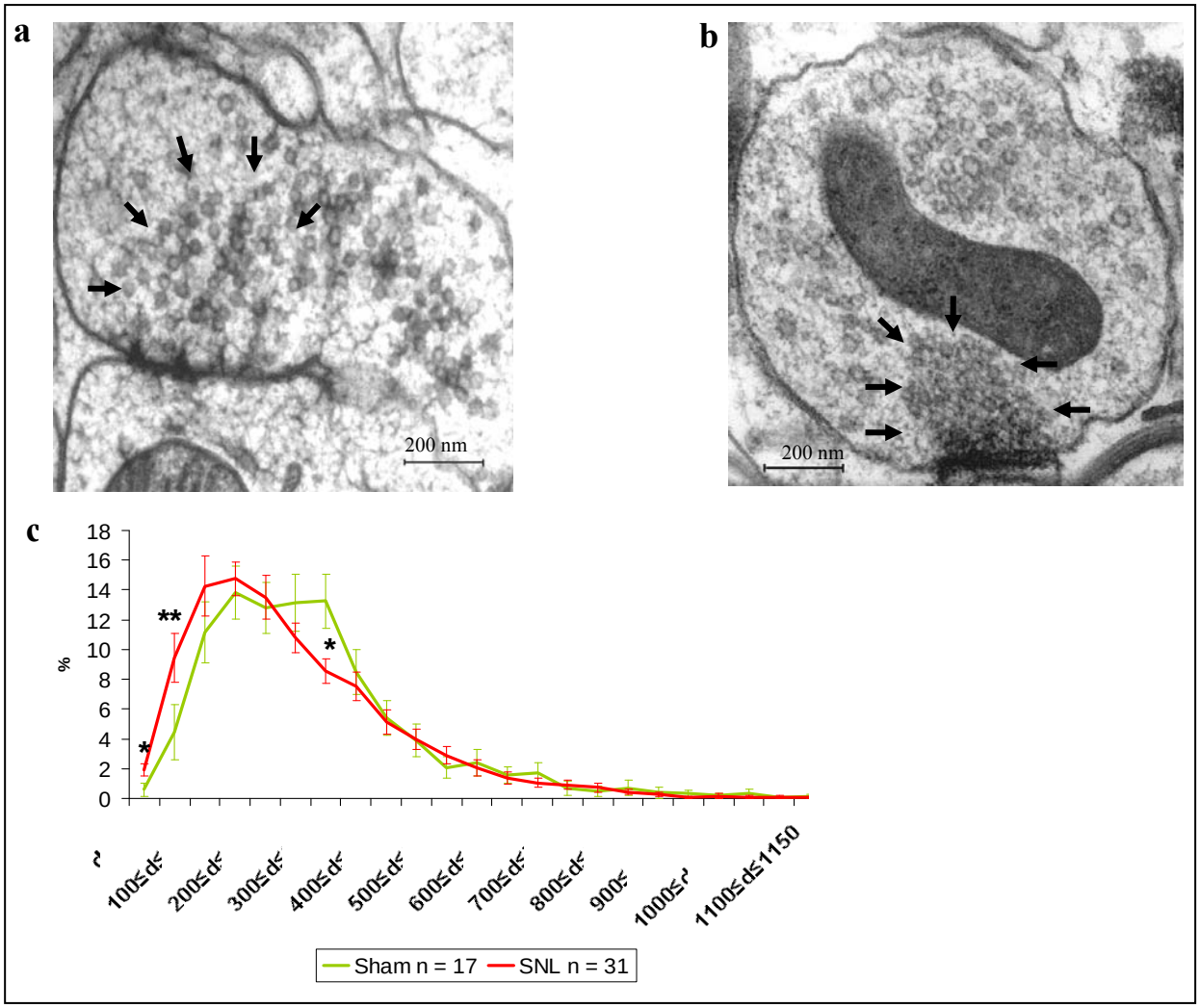


Figure 6 : Distribution des vésicules claires autour de synapses excitatrices. **(a et b)** Photos de boutons synaptiques obtenues par microscopie électronique en transmission à partir d'un rat Sham **(a)** et SNL **(b).** Les flèches délimitent la distribution de faible **(a)** et grande densité **(b)** des vésicules. **(c)** Courbes représentant le pourcentage moyen du nombre de vésicules claires d'un bouton, localisées à des distances de 0 à 1150 nm du centre de la synapse par intervalles de 50 nm en 50 nm. Les astérisques (*) indiquent des différences significatives ($p<0.05$, Mann-Whitney) entre les animaux Sham (vert) et SNL (rouge). Les résultats représentent la moyenne ± SEM.

De plus, nous pouvons observer que ces vésicules synaptiques sont interconnectées par des filaments **(Figure 6a)** comme l'ont montré Léa Siksou et collaborateurs (Siksou et al. 2007). Ces filaments correspondent à des molécules de synapsines nécessaires pour maintenir les vésicules synaptiques proche de la zone active (Siksou et al. 2007) (Landis et al. 1988;

Gitler et al. 2004). Chez des souris triple knock out pour les trois synapsines, une forte réduction du nombre de vésicules présynaptiques glutamatergiques est observée (Gitler et al. 2004; Schmidtko et al. 2005; Siksou et al. 2007; Schmidtko et al. 2008). De plus, il a été montré qu'une délétion génétique de la synapsine II diminue le comportement douloureux en réduisant le relargage de glutamate et en augmentant celui du GABA dans la corne dorsale de la moelle épinière (Schmidtko et al. 2005; Schmidtko et al. 2008). Il serait donc intéressant de regarder les variations d'expression de la synapsine dans notre modèle SNL de douleur neuropathique.

- Distribution et nombre moyen des vésicules à cœur dense par bouton synaptique : Nous avons par ailleurs appliqué les mêmes mesures aux vésicules à cœur dense, ou vésicules peptidiques, dans les boutons synaptiques. Une coupe fine de bouton synaptique de la corne dorsale d'un animal témoin en contient en moyenne 0,65 ± 0,33. Celle d'un animal neuropathique en contient 1,09 ± 0,39. De la même manière que pour les vésicules claires, la distance séparant le centre de chaque vésicule à cœur dense au centre de la synapse a été mesurée **(Figure 7a).** La distance moyenne pour l'animal témoin est de 677 ± 87,12 nm. Elle diminue significativement à 345 ± 45,73 nm chez l'animal neuropathique (p=0.002). Des photos de microscopie électronique en transmission obtenues à partir de la moelle épinière d'un rat Sham **(7b)** et d'un animal SNL **(7c),** illustrent cette donnée quantitative.

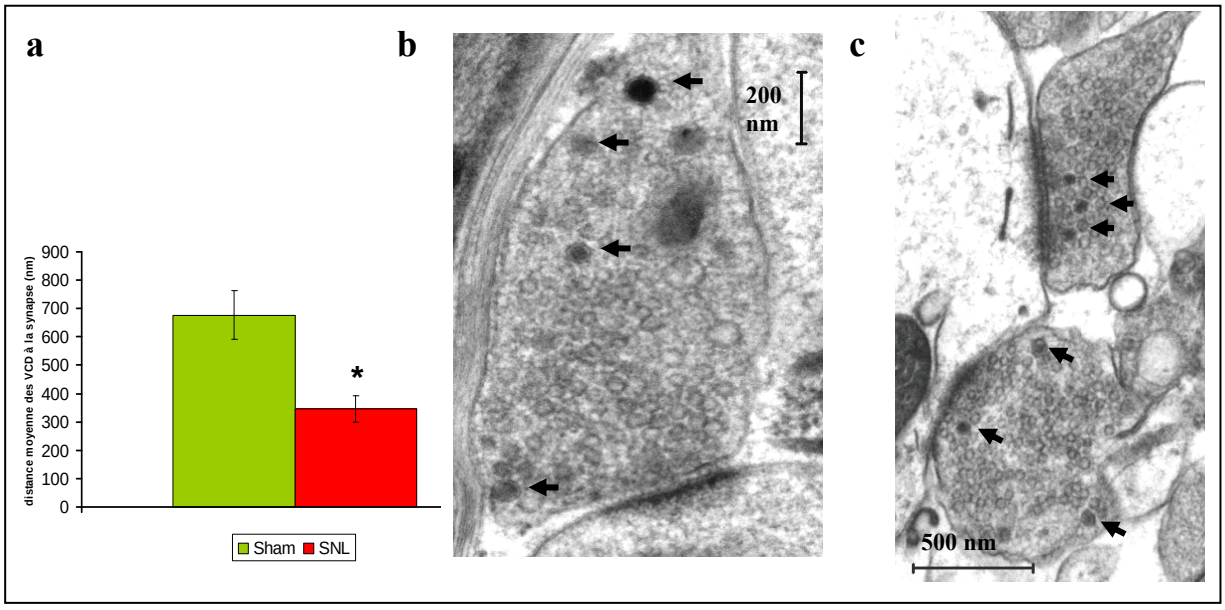


Figure 7 : Distribution des vésicules à cœur dense (VCD) autour de synapses excitatrices. **(b)** Photo d'un bouton synaptique obtenue après HPF à partir d'un rat Sham. **(c)** Photo de deux boutons synaptiques obtenue après HPF à partir d'un rat SNL. Les flèches pointent des vésicules à cœur dense. **(a)** Histogramme de la distance moyenne séparant le centre des vésicules à cœur dense du centre de la synapse en nm. La quantification a été obtenue à partir de 17 synapses d'un animal Sham et 31 synapses d'un animal neuropathique. Les astérisques (*) indiquent des différences significatives ($p<0.05$, Mann-Whitney) entre les animaux Sham (vert) et SNL (rouge). Les résultats représentent la moyenne ± SEM.

Dans notre modèle de douleur neuropathique, les vésicules à cœur dense (ou vésicules peptidergiques) augmentent dans les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière, et sont retrouvées très proches de la membrane. Leur distance moyenne diminue de moitié par rapport à un animal Sham. Plusieurs auteurs se sont interrogés quant à la nature des neuropeptides contenus dans ces vésicules à cœur dense. De nombreux études ont montré une surexpression du taux de galanine en conditions douloureuses (Hokfelt et al. 1987; Villar et al. 1989; Zhang et al. 1993). La galanine (peptide de 29 acides aminés) joue un rôle important dans la neurotransmission chez de nombreux modèles animaux de douleur neuropathique (Zhang et al. 1998; Wiesenfeld-Hallin et al. 2001; Liu et al. 2002; Wiesenfeld-Hallin et al. 2005). L'expression de la cholecystokinine (CCK), neuropeptide excitateur, est elle aussi augmentée dans la moelle épinière de rats neuropathiques, du coté ipsilatéral à la lésion (Kim et al. 2009). L'adrenomédulline, un membre de la famille des CGRP, est un médiateur pronociceptif surexprimé dans la moelle épinière et dans les ganglions rachidiens de rats après induction de douleur inflammatoire (Hong et al. 2009).

- Limites de cette méthode de quantification : Cette méthode de quantification est imparfaite. En effet, l'orientation des coupes en deux dimensions ne nous permet pas d'évaluer sans équivoque l'appartenance de vésicules synaptiques à une synapse en particulier. Il est possible que d'autres synapses existent dans le bouton synaptique visualisé, mais soient absentes du plan de coupe. Pour y remédier, nous avons envisagé une technique de tomographie afin de reconstruire en trois dimensions les boutons synaptiques (cf ci-dessous). Il faudra ensuite développer des protocoles de quantification tridimensionnelle.

b. La tomographie et reconstruction tridimensionnelle

Le principe de la tomographie électronique est d'obtenir des images de projections d'un objet à différents angles et de reconstruire le volume de celui-ci à partir de ces images (Lucic et al. 2008). Il est donc nécessaire d'avoir une bonne structure sur des coupes épaisses (400nm). La cryofixation à haute pression est donc particulièrement avantageuse puisqu'elle permet de conserver une bonne ultrastructure sur une grande profondeur. Les coupes sont transférées sur un microscope électronique JEOL 2100HC qui opère à 200kV. Les images de chaque série du tomogramme sont alignées, l'axe de tilt est déterminé, et le volume final est reconstruit avec un algorithme de projection en utilisant le logiciel Etomo (Kremer et al. 1996). Le logiciel IMOD est utilisé pour réaliser les reconstructions tridimensionnelles.

Cette approche de tomographie a été réalisée avec l'aide de Thomas Boudier de l'Université Pierre et Marie Curie (acquisition des tomogrammes), et Florian Levet de Bordeaux (reconstruction). Pour le moment, nous n'avons réalisé que des acquisitions préliminaires **(Figure 8).** Ce travail sera poursuivi par une nouvelle étudiante en thèse, Petra Horakova.

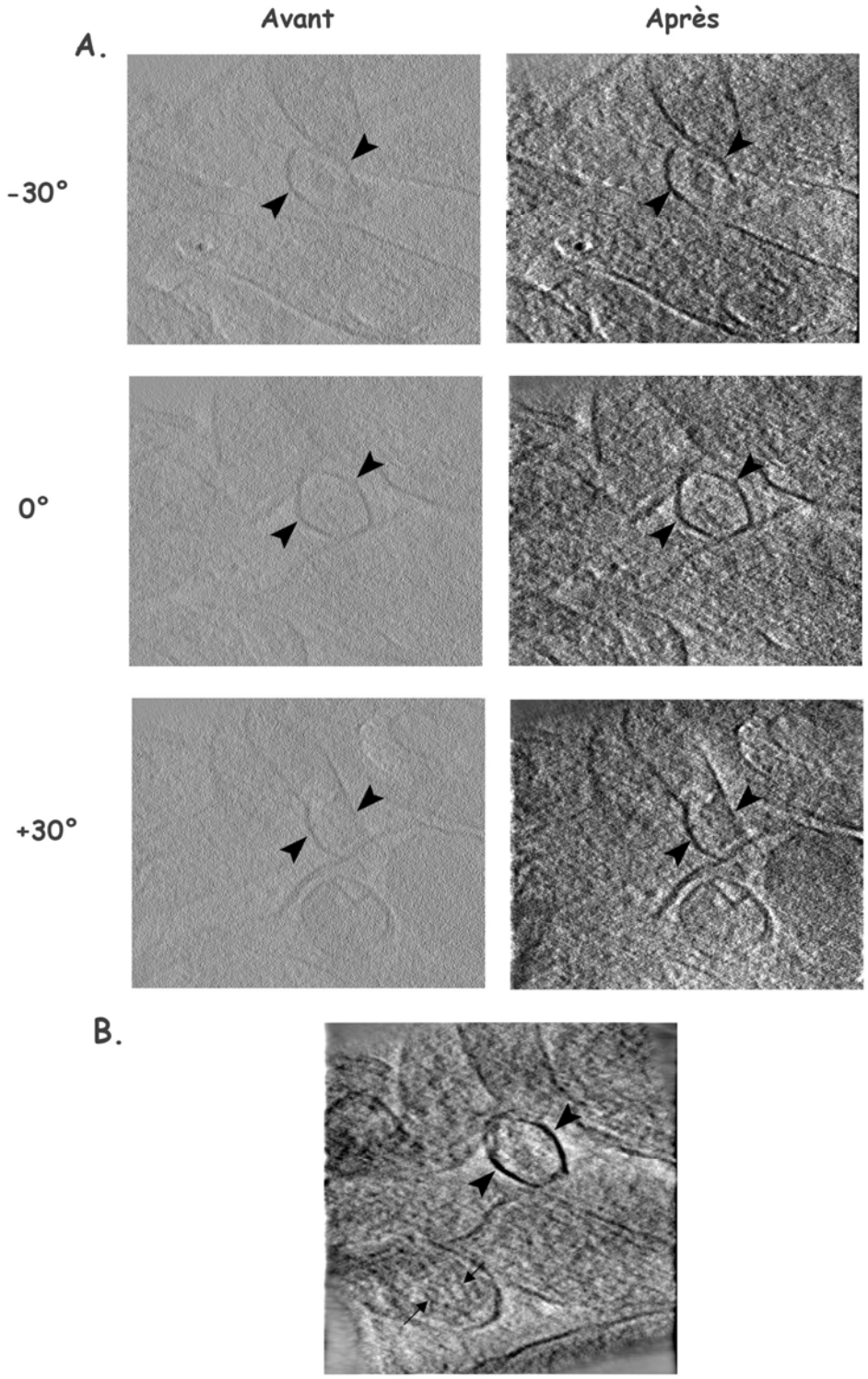


Figure 8 : (A) Exemples de z-sections obtenues avant et après le recalage, l'alignement puis le filtrage. **(B)** Tomogramme final reconstitué. Deux synapses sont visibles (têtes de flèches) ainsi que des vésicules claires (flèches).

Analyse immunohistochimique:

Les immuno-marquages à l'or observés en microscopie électronique ont permis au laboratoire de localiser très précisément les sous-unités du récepteur $GABA_B$ ainsi que les protéines d'interaction 14-3-3ζ ou fibuline-2 au sein des synapses (cf protocole dans le chapitre « Matériel et Méthodes »). Toutefois, les ultrastructures restent difficilement observables en raison des protocoles de fixation chimique **(PLT, Figures 9a).** Nous avons donc essayé d'appliquer des détections immunohistochimiques aux échantillons obtenus après HPF **(9b).** Nos premiers essais n'ont pas permis de préserver l'excellente ultrastructure observée lors des études morphologiques. Nous envisageons de répéter ces expériences en diminuant les temps d'incubation dans les différents réactifs d'immunohistochimie car de longues durées d'incubation dans des solutions aqueuses détériorent petit à petit la résine et donc le tissu.

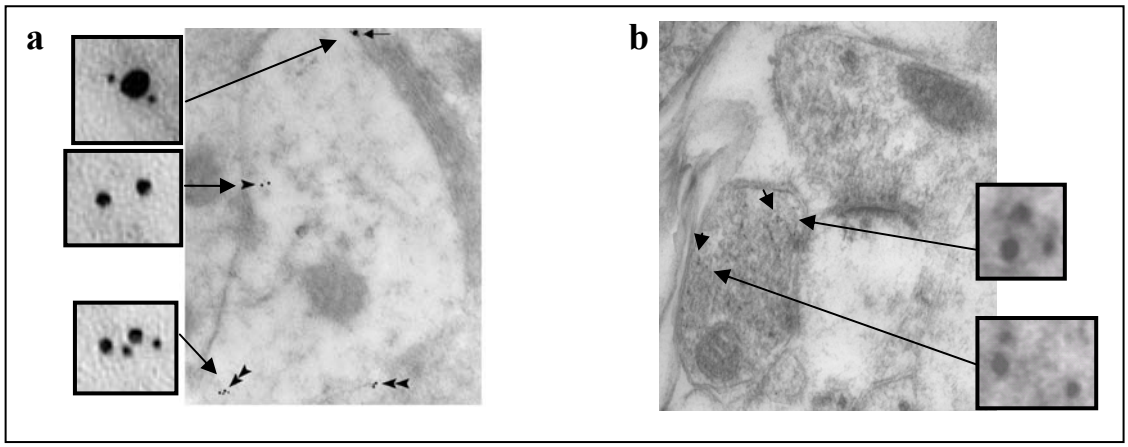


Figure 9: Photos de MET pour une étude immunohistochimique. (a) Cliché obtenu après fixation chimique ou **(b)** après HPF **(a et b)** puis immuno marquage à l'or. $GABA_{B1b}$ est marqué par des billes d'or de 6 nm de diamètre, 10 nm pour $GABA_{B2}$ et 15 nm pour 14-3-3ζ.

Toutefois, si les différentes tentatives d'immunomarquage en post-embedding après HPF s'avèrent infructueuses, la PLT reste une méthode de choix particulièrement dédiée à l'immunomarquage en post-embedding.

Perspectives :

1) Les techniques de cryofixation à haute pression (HPF) complétées par des études de tomographie électronique et de reconstruction tridimensionnelle permettront de préciser les modifications ultrastructurales en conditions neuropathiques (distribution des vésicules claires et à cœur dense, nombre, nature et localisation des synapses, nombre et distribution des mitochondries).

2) Nous envisagerons d'étudier la localisation des sous-unités du récepteur $GABA_B$ chez des souris transgéniques knock-in dont la sous-unité B1 est couplée à une étiquette GFP (Casanova et al. 2009). La présence de cette étiquette rendra en effet plus aisée la détection immunohistochimique en post-embedding après HPF. Pour étudier la plasticité de la distribution du récepteur $GABA_B$ sur des modèles de souris B1-GFP neuropathiques, nous appliquerons la technique de « Sciatic Nerve Cuffing » (Benbouzid et al. 2008). Ce modèle consiste à placer un tube en plastique autour du nerf sciatique de la souris. Il nous évite ainsi de réaliser des chirurgies plus lourdes telles que la ligature des racines L5-L6 du nerf sciatique (modèle SNL) sur des petits animaux. La procédure pour l'obtention de ces souris B1-GFP en provenance du laboratoire de Bernhard Bettler de l'Université de Bâle, Suisse, a commencé en Octobre 2007. Ces souris ont d'abord subi une décontamination au CDTA d'Orléans (Centre de Distribution, de Typage et d'Archivage animal, Orléans) avant d'être transportées dans notre animalerie en Juillet 2009.

3) Enfin, il sera intéressant d'associer une étude dynamique (avec des quantum dots) à la morphologie ultrastructurale des compartiments contenant les fractions mobiles et immobiles du récepteur. Celà pourrait être envisagé en cultures, par une approche de microscopie corrélative. Cette étude nécessite de repérer les cellules étudiées par tracking (quantum dots) puis de les fixer par HPF et de les observer à l'échelle de la microscopie électronique en transmission en repérant les quantum dots dont on a suivi les trajectoires.

DISCUSSION GENERALE

I. DEFINITIONS IMPORTANTES

Un récepteur représente l'unité fonctionnelle minimale capable de convertir un signal extracellulaire en signal intracellulaire. Les récepteurs peuvent représenter un assemblage de deux ou plusieurs chaînes polypeptidiques, appelées sous-unités (Neubig et al. 2003), qui sont dérivées ou non du même gène.

Nous proposons d'une part le terme de **récepteur hétéromérique** pour définir un récepteur dimérique ou oligomérique, dans lequel l'unité fonctionnelle minimale est composée de deux ou plusieurs sous-unités différentes qui ne sont pas fonctionnelles par elles-mêmes. Concernant, les RCPGs, ce terme peut donc s'appliquer au récepteur $GABA_B$, composé de deux protéines à sept domaines transmembranaires, B1 et B2, qui sont impliquées dans la liaison du ligand et dans la signalisation cellulaire respectivement, mais qui ne sont pas fonctionnelles séparément. Les récepteurs au goût, pour lesquels une délétion génétique d'une sous-unité supprime la fonctionnalité du récepteur, sont aussi appelés récepteurs hétéromériques. Si les sous-unités du récepteur sont identiques, on parlera alors de récepteur homomérique.

D'autre part, nous parlerons de **récepteur hétéromère** pour un complexe macromoléculaire, composé de deux ou plusieurs récepteurs (unités fonctionnelles), avec des propriétés pharmacologiques et fonctionnelles qui sont différentes de celles des unités individuelles prises séparément. Ainsi, le complexe formé par le récepteur à l'adénosine A2A et le récepteur à la dopamine D2 est un exemple de récepteur hétéromère (Ferre et al. 2007; Ferre et al. 2009).

Enfin, **l'oligomérisation** est un terme général qui décrit l'association de plusieurs protéines au sein d'un même complexe. Le dimère, qui correspond à l'interaction de deux protéines, constitue la structure minimale de l'oligomère. Cette notion de **dimérisation** a été beaucoup utilisée pour décrire l'organisation des RCPGs longtemps considérés uniquement sous forme monomérique. Les méthodes décrivant des dimères de RCPGs ne permettent pas d'exclure une oligomérisation plus grande de ces récepteurs.

II. ROLES ET REGULATION DES RCPGs

Un pool toujours grandissant de données biochimiques et biophysiques nous apporte la preuve que beaucoup de récepteurs couplés aux protéines G forment des homo- et hétérodimères. Alors que leur existence est maintenant bien admise (Angers et al. 2000; George et al. 2002), leur importance fonctionnelle reste plus énigmatique et est dans certains

cas toujours controversée. Quelle est l'importance physiologique et physiopathologique des complexes de RCPGs? Comment sont-ils régulés? De nombreuses données montrent que l'oligomérisation des RCPGs est régulé par des mécanismes spécifiques qui sont 1) l'adressage membranaire, 2) la liaison du ligand, 3) la signalisation ou encore 4) l'internalisation du RCPG. Nous allons détailler ces divers mécanismes ci-dessous.

II-1) Ontogénèse d'un récepteur

La biosynthèse et le transport des RCPGs jusqu'à la membrane sont peu caractérisés mais leur sortie du réticulum endoplasmique (RE) est une étape clé qui contrôle leur expression à la surface cellulaire (Petaja-Repo et al. 2000). En effet, dans le cas des protéines membranaires, la stabilité structurale d'une protéine est reflétée par sa capacité à atteindre la membrane plasmique. Seules les protéines correctement repliées peuvent passer les systèmes de contrôle-qualité de la cellule pour finalement atteindre leur lieu d'adressage. Pour certaines protéines, l'assemblage en oligomères a un rôle crucial au niveau du RE, puisqu'il va permettre de masquer les signaux de rétention ou des séquences hydrophobes (Reddy et al. 1998). Cette notion ne se limite pas aux RCPGs, c'est le cas par exemple du récepteur de l'insuline (famille des récepteurs tyrosines kinases) qui homodimérise temporairement au niveau du RE en formant un pro-récepteur (Bass et al. 1998). Les pro-récepteurs mutants incapables d'homodimériser sont détruits. De même, pour les canaux potassiques (tétramères, octamères…), la biogénèse et leur multimérisation a lieu dans le RE et c'est aussi une étape clé dans le contrôle-qualité de ces molécules (Papazian 1999; Zerangue et al. 1999). En ce qui concerne les RCPGs, la nécessité de dimériser pour un transport correct vers la surface est bien illustrée par le récepteur $GABA_B$. Comme nous l'avons vu, ce récepteur est un hétérodimère obligatoire constitué de deux sous-unités différentes, B1 et B2. L'hétérodimérisation de B1 avec B2 au sein du RE entraîne le masquage de son signal de rétention RSR et un adressage membranaire du complexe (Margeta-Mitrovic et al. 2000). Comme pour le $GABA_B$, d'autres récepteurs doivent être sous forme dimérique pour atteindre la membrane plasmique. C'est ainsi le cas pour les récepteurs hétérodimériques du goût T1R3 / T1R1 et T1R3 / T1R2 (Nelson et al. 2001; Nelson et al. 2002) et les récepteurs hétéromères α1D – α1B adrénergiques (Uberti et al. 2003; Hague et al. 2004), ou encore le récepteur olfactif M71 dont l'interaction avec le β2AR permet l'adressage d'un hétérodimère en surface (Hague et al. 2004).

D'autres données expérimentales soutiennent cette dimérisation précoce qui représente une étape clé dans l'envoi en surface des récepteurs. La co-expression de récepteurs mutés (retenus dans les compartiments intracellulaires) empêche l'envoi en surface des formes

sauvages de ces mêmes récepteurs. Cela a pu être démontré pour les récepteurs V2 de la vasopressine (Zhu et al. 1998), D3 de la dopamine (Karpa et al. 2000) et β2- adrénergique (Salahpour et al. 2004). Ainsi, des mutations naturelles dominantes de RCPG peuvent avoir des conséquences pathophysiologiques. CCR5 et CXCR4 sont des co- récepteurs connus pour l'entrée du VIH dans la cellule (Cairns et al. 1998). Chez des patients présentant le génotype CCR5 / CCR5Δ32, la perte d'expression du récepteur CCR5 co-exprimé avec le mutant CCR5Δ32 retenu dans le RE, retarde l'infection par le VIH (Benkirane et al. 1997; Chelli et al. 2001). Ce rôle de la dimérisation dans l'ontogénèse d'un récepteur couplé aux protéines G n'exclu pas la possibilité qu'une fois à la membrane son état oligomérique puisse être dynamiquement régulé.

II-2) Régulation par un ligand

Le concept selon lequel la dimérisation aurait un rôle dans la diversité pharmacologique des RCPGs a d'abord été mis en évidence par des études sur les récepteurs δ et κ opiacés (Jordan et al. 1999). En effet, la co-expression des deux récepteurs permet la formation d'un hétérodimère stable présentant une faible affinité pour les deux ligands sélectifs de chaque monomère. En revanche, on retrouve une haute affinité pour les ligands si les deux sont appliqués simultanément, ce qui suggère une coopérativité positive, une synergie entre les deux ligands. Cet effet synergique n'est pas observé sur des membranes de cellules exprimant individuellement les récepteurs δ ou κ opiacés. L'hétérodimérisation des récepteurs δ et κ entraîne donc un changement dans les propriétés de liaison des ligands. Des coopérations positives ou négatives entre les monomères d'un complexe pour la liaison de ligands sont maintenant bien documentées et ont été interprétés comme la conséquence des phénomènes d'hétérodimérisation. C'est le cas des récepteurs muscariniques M2 et M3 (Maggio et al. 1999), des récepteurs à la somatostatine SST5 et à la dopamine D2 (Rocheville et al. 2000), des récepteurs δ / μ opioïdes (Gomes et al. 2000), des récepteurs à l'adénosine A_{2A} et à la dopamine D2 (Ferre et al. 2007), ou encore des récepteurs à la sérotonine $5HT_{2A}$ et au glutamate mGluR2 (Gonzalez-Maeso et al. 2008). De telles associations entre des récepteurs pharmacologiquement distincts, permet d'entrevoir l'existence d'une pharmacodiversité très importante. Ceci pourrait avoir de grandes implications dans le développement de nouvelles drogues et en particulier, le développement de composés plus sélectifs qui cibleraient spécifiquement les hétérodimères sans affecter les monomères (George et al. 2002). Un modèle de ligand bivalent a été proposé par Maggio et collaborateurs en 2005 (Maggio et al. 2005). C'est ainsi que Bhushan et collaborateurs ont récemment synthétisé le ligand KDN-21, ligand bivalent pour les complexes δ et μ opioïdes (Bhushan et

al. 2004). Enfin, le concept de drogue sélective d'un tissu a part ailleurs été démontré pour le 6'-guanidinonaltrindole (6'-GNTI) qui a la capacité d'activer sélectivement les hétérodimères κ/μ opioïdes et non les momomères, au niveau de la moelle épinière mais pas au niveau du cerveau (Waldhoer et al. 2005). De plus, les effets analgésiques de cet agoniste opioïde démontrent la pertinence *in vivo*, de cette organisation en hétérodimère, spécifique d'un tissu.

II-3) Transduction du signal

Les RCPGs à l'état actif sont capables de se coupler spécifiquement à des protéines G, relais intracellulaire de l'information extracellulaire détectée par les récepteurs. Il paraît évident que la nature des monomères formant le dimère est déterminante dans la spécificité de couplage du récepteur aux différentes protéines G (Gs, Gi, Gq et G12). Si les récepteurs sont sous forme d'homo- ou hétérodimères, les voies de signalisation activées par ces complexes pourront être différentes. Les récepteurs δ et μ opiacés peuvent individuellement se coupler à des protéines G sensibles à la PTX (Gi/o). Cependant, sous forme hétérodimérique, ces récepteurs sont toujours capables de signaler en présence de cette toxine (George et al. 2000; Charles et al. 2003). L'hétérodimère pourrait donc s'associer spécifiquement à des protéines G insensibles à la PTX. Les mêmes conclusions ont été rapportées notamment pour les récepteurs aux chimiokines CCR2 / CCR5 (Mellado et al. 2001). Plus récemment, il a été montré que l'hétéromère à la dopamine D1-D2 est couplé aux protéines Gq alors que D1 et D2 exprimés en tant que monomères sont couplés à Gs et Gi respectivement (George et al. 2007; Rashid et al. 2007). Certains récepteurs activent plus efficacement les protéines G lorsqu'ils sont sous forme de monomère plutôt que sous forme de dimère, comme par exemple le récepteur à la neurotensine NTS1 (White et al. 2007). Concernant les récepteurs hétérodimériques du goût, il a été proposé que la réponse aux goûts sucrés (saccharine, sucrose…) serait strictement dépendante de la formation de l'hétérodimère T1R3 / T1R2 (Nelson et al. 2001) alors que l'hétérodimère T1R3 / T1R1 serait préférentiellement sensible aux acides aminés (Nelson et al. 2002). De manière intéressante, des études de souris KO suggèrent que l'hétérodimère T1R3 / T1R1 est nécessaire pour avoir une sensation umami (goût différent apporté notamment par le glutamate) (Zhao et al. 2003). De multiples exemples démontrant l'impact de la dimérisation sur la signalisation des RCPGs traduisent l'importance de ce phénomène.

II-4) Internalisation

Pour un certain nombre d'hétérodimères, il a pu être démontré que la stimulation d'un seul monomère permet la co-internalisation des deux récepteurs. Parmi ces récepteurs, on

trouve les récepteurs de la somatostatine SSTR1 / SSTR5 (Rocheville et al. 2000), δ opiacés / β2AR (Jordan et al. 2001), α2AAR / β1AR (Xu et al. 2003), α1aAR / α1bAR (Stanasila et al. 2003), SSTR2A de la somatostatine / μ opiacés (Pfeiffer et al. 2002) et A2A de l'adénosine / D2 de la dopamine (Hillion et al. 2002). A l'inverse, l'hétérodimérisation peut aussi empêcher l'endocytose d'un monomère par un effet dominant négatif du monomère qui lui est associé. On citera le cas du récepteur κ opiacé qui empêche l'endocytose du récepteur δ opiacé (Jordan and Devi 1999) et du β2AR (Jordan et al. 2001). De même, le β1AR bloque l'internalisation du β2AR lorsqu'ils sont co-transfectés dans les mêmes cellules (Lavoie et al. 2002). Les conséquences physiologiques de telles observations sur la régulation des phénomènes de désensibilisation des RCPGs sont encore à déterminer.

III. OLIGOMERISATION DES RCPGs A LA SURFACE CELLULAIRE

Les multiples zones de contact identifiées au niveau des domaines transmembranaires des RCPGs (TMI, II, IV, VI…) ne permettent pas de définir simplement une seule interface de dimérisation entre deux récepteurs. Les récepteurs pourraient donc être organisés dans des complexes d'interaction oligomériques plus grands que les dimères. Les travaux de Fotiadis et collaborateurs ont révélé pour la première fois en 2003, à partir de données obtenues en AFM, une organisation complexe de la rhodopsine en rangées de dimères (Fotiadis et al. 2003). Fonctionnellement, ce niveau d'organisation oligomérique à grande échelle favoriserait des réponses rapides des récepteurs comme cela a été démontré ensuite par Jastrzebska et collaborateurs (Jastrzebska et al. 2006). En effet, ces auteurs décrivent des cinétiques d'activation des protéines Gαt plus rapides quand la rhodopsine est sous forme oligomérique plutôt que dimérique ou monomérique. D'autres données relativement récentes suggèrent aussi l'implication de l'oligomérisation du récepteur α1B-adrénergique pour son envoi à la surface cellulaire (Milligan et al. 2006). Il a aussi été montré des homo-tétramères et des homo-oligomères de plus haut ordre comme pour le récepteur à la dopamine D2 et à l'adénosine A_{2A} (Gandia et al. 2008; Guo et al. 2008). Certains ont décrits des hétéro-trimères pour le récepteur à l'adénosine A_{2A}, dopamine D2 et cannabinoide CB1, mais aussi pour A_{2A}, D2 et mGluR5 (Carriba et al. 2008; Cabello et al. 2009). D'autres récepteurs, au contraire, s'observent sous forme dimérique mais non sous forme oligomérique, comme les récepteurs à la sécrétine (Harikumar et al. 2008) et les récepteurs au glutamate (Maurel et al. 2008).

Dans ce contexte, les travaux de Pin et collaborateurs ont révélé que le récepteur $GABA_B$, connu pour être un hétérodimère obligatoire, est capable de s'organiser à la surface cellulaire en dimères d'hétérodimères (Maurel et al. 2008). Dans cette structure oligomérique,

la sous-unité B1 pourrait avoir un rôle clé dans l'association des hétérodimères (Maurel et al. 2008; Pin et al. 2009). L'interaction directe ou éventuellement par des protéines annexes reste encore méconnue. L'oligomérisation du récepteur $GABA_B$, montrée à la fois dans des cellules transfectées mais aussi dans le cerveau, entraîne une moindre efficacité de couplage aux protéines G. Il semblerait en effet que dans un dimère d'hétérodimères $GABA_B$, une seule unité de récepteur (c'est-à dire l'association entre les sous-unités B1 et B2) est capable d'activer la protéine G (Maurel et al. 2008; Pin et al. 2009). Toutefois, le rôle physiologique d'une telle organisation pour ce type de récepteur reste encore à déterminer.

IV.ALTERATION LIEES A L'ETAT OLIGOMERIQUE DES RCPGs

L'ensemble, non exhaustif, des données de la littérature présenté ci-dessus ne nous donne aucun exemple de régulations physiopathologiques des états d'oligomérisation de RCPGs, ni des conséquences physiopathologiques de cette régulation. Cependant, une étude montre chez la femme enceinte, une augmentation des hétérodimères formés des récepteurs de l'angiotensine II de type AT1 et des récepteurs de la bradikynine B2 (AbdAlla et al. 2001). Ceci conduit à une hypertension artérielle par hypersensibilité à l'angiotensine II, et à la préclempsie, très dangereuse pour le fœtus. De plus, d'autres résultats ont permis de démontrer par des techniques de BRET et de co-immunoprécipitation, l'hétérodimérisation du récepteur EP1 de la prostaglandine E2 avec le récepteur β2AR, dans des cellules musculaires des voies respiratoires (McGraw et al. 2006). Le récepteur EP1 qui, exprimé seul, n'a pas d'effet significatif sur le tonus respiratoire, agirait comme un modulateur du β2AR en le découplant des protéines Gs via la formation d'un hétérodimère. L'effet bronchodilatateur induit par l'agoniste du β2AR serait ainsi fortement réduit. D'un point de vue pathologique, cette hétérodimérisation pourrait contribuer à réduire la réponse des agonistes du β2AR dans le cas de crises d'asthme sévères. Enfin, très récemment, la présence d'oligomères de RCPGs (récepteur à la sérotonine $5HT_{2A}$ et au glutamate mGluR2) a été impliquée dans des conditions physiopathologiques telles que les troubles psychiques (Gonzalez-Maeso et al. 2008). Il a notamment été montré que l'agoniste du mGluR2, le LY379268, augmente l'affinité des différentes drogues hallucinogènes pour le site de liaison du récepteur $5HT_{2A}$ mais aussi qu'un agoniste sélectif de $5HT_{2A}$ diminue l'affinité des agonistes de mGluR2 (Gonzalez-Maeso et al. 2008).

Dans notre étude, nous avons voulu savoir quelles étaient les différentes régulations de l'activation des RCPGs oligomériques en conditions de douleurs neuropathiques. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux mécanismes de désinhibition dans la moelle

épinière en conditions douloureuses, notamment à la perte de contrôle GABAergique $GABA_B$. En effet, les conditions de douleurs chroniques constituent un excellent modèle physiopathologique pour étudier, au niveau de la moelle épinière, des régulations éventuelles de l'état hétérodimérique du récepteur $GABA_B$. Nos résultats indiquent de nouveaux mécanismes par lesquels des protéines partenaires peuvent réguler l'activité oligomérique des RCPGs.

V. PERTE D'EFFICACITE DU CONTROLE INHIBITEUR $GABA_B$ EN CONDITION DE DOULEUR CHRONIQUE

V-1) La technique de FRET pour mesurer l'état d'activation d'un RCPG

Les techniques de FRET et de BRET sont couramment utilisées pour montrer des homo et hétéromères de RCPGs dans les cellules vivantes (Milligan et al. 2005; Pfleger et al. 2005; Pfleger et al. 2006; Pfleger et al. 2006). Aujourd'hui, il est bien accepté que différents ligands peuvent induire différentes conformations du récepteur (Perez et al. 2005; Vauquelin et al. 2005; Urban et al. 2007). Le FRET est une technique utilisée pour mesurer l'activation d'un récepteur. En effet, la première approche qui a mesuré l'activation d'un récepteur en réponse à son ligand en étudiant ces changements de conformation par la technique de FRET a été publiée en 2003 (Vilardaga et al. 2003). Les récepteur α2 adrénergiques et de l'hormone parathyroïdienne *(PTH)* ont été étudiés et des changements de conformation se produisent en réponse à une stimulation par les agonistes. Des effets opposés ont été constatés en stimulant le récepteur avec un agoniste ou un agoniste inverse (Vilardaga et al. 2001; Vilardaga et al. 2005). La première étude sur des RCPGs de la classe C a utilisé le récepteur mGluR1α comme modèle d'étude de l'activation de ce type de récepteur (Tateyama et al. 2004). Cependant, le concept est ici différent puisque les auteurs étudient les mouvements à l'intérieur du dimère plutôt que ceux à l'intérieur de chaque sous-unité individuelle du récepteur. Ces données suggèrent un changement de conformation du dimère durant l'activation du récepteur. Comme nous l'avons vu en introduction, la particularité des récepteurs de la classe C vient de la structure de leur domaine N-terminal extracellulaire où se fixe le ligand. En effet, la résolution de la structure de ce domaine pour le récepteur du glutamate de type 1 (mGlu1) (Kunishima et al. 2000), de la même famille que le récepteur $GABA_B$, montre qu'il s'agit de deux lobes se faisant face (Kaupmann et al. 1997; Galvez et al. 1999). Ces lobes sont capables de se refermer sur le ligand agoniste à l'image de la fermeture des deux lobes de la dionée (plante carnivore appelée aussi « gobe mouche ») au contact d'un insecte. Ainsi, alors que la forme ouverte semble prépondérante en l'absence de

ligand, la fixation d'une molécule agoniste au niveau de ces domaines stabiliserait la forme fermée. La résolution des structures cristallographiques des domaines externes de mGlu1, en présence ou absence d'agoniste, a permis de montrer que cette fermeture s'accompagne d'un changement conformationnel aboutissant à une modification de l'orientation relative des deux protomères. Ce mouvement de grande amplitude entre sous-unités permettrait le passage à l'état actif du domaine heptahélice conduisant à l'activation des protéines G. Dans cette étude, nous avons donc mesuré l'activation du récepteur hétérodimérique $GABA_B$ en réponse à un ligand en utilisant la technique de FRET/FLIM. Nous avons montré que la stimulation du $GABA_B$ par son agoniste (baclofène) entraîne une augmentation de l'efficacité de FRET entre les deux sous-unités du récepteur hétérodimérique (B1a/B2 ou B1b/B2) ce qui traduit un changement de conformation du récepteur et un rapprochement des deux extrémités en N-terminal.

Cette technique de FRET/FLIM, complétée par des approches de co-immunoprécipitation, nous a aussi permis de montrer deux mécanismes différents qui pourraient expliquer le dysfonctionnment du récepteur $GABA_B$ en conditions neuropathiques : d'une part, la dissociation entre les deux sous-unités du récepteur $GABA_B$ via la protéine 14-3-3ζ (Publication I), et d'autre part, une diminution de l'activation du récepteur par ses ligands lorsque la fibuline-2 est surexprimée (Publication II).

V-2) Interaction membranaire du récepteur $GABA_B$ et de la protéine cytosolique 14-3-3ζ : dé-dimérisation du récepteur $GABA_B$ post-synaptique

A ce jour, comme nous l'avons vu dans cette Discussion, les données expérimentales montrent que l'assemblage d'oligomères de RCPGs est régulé par l'adressage du récepteur (McLatchie et al. 1998; Margeta-Mitrovic et al. 2000), par la liaison du ligand (Rocheville et al. 2000), par la transduction du signal ou encore par l'internalisation. Nos résultats démontrent un nouveau mécanisme d'inactivation du récepteur $GABA_B$. Ce mécanisme repose sur la dé-dimérisation du récepteur à la suite de la liaison, sur la sous-unité B1, d'une protéine chaperonne intracellulaire nommé 14-3-3 (cf Publication I). Ainsi, l'état hétérodimérique du récepteur $GABA_B$ est perturbé par la protéine 14-3-3ζ, entraînant une diminution de l'efficacité du récepteur. De façon intéressante, cette étude fournit le premier exemple d'un processus endogène qui dissocie un oligomère mature de RCPG. Cette dissociation entraîne une perte partielle du contrôle GABAergique dans la corne dorsale de la moelle épinière de rats neuropathiques, contribuant ainsi au processus de désinhibition en condition de douleur neuropathique.

Notre étude offre plusieurs arguments en faveur d'une interaction membranaire entre le récepteur $GABA_B$ et la protéine 14-3-3ζ. Dans un premier temps, nous avons montré par des approches biochimiques que la sous-unité B1b co-immunoprécipitait significativement plus avec la protéine 14-3-3ζ lorsque la sous-unité B2 était aussi surexprimée. De plus, lorsque les trois partenaires sont surexprimés, l'association B1b/14-3-3ζ n'est pas localisée au niveau du réticulum endoplasmique. Ceci suggère donc que l'association B1b/14-3-3ζ surviendrait principalement lorsque les deux sous-unités du récepteur $GABA_B$ sont assemblées en hétérodimère après leur sortie du réticulum, confirmant de surcroît l'absence de rôle de 14-3-3ζ au niveau du réticulum (Brock et al. 2005). Pour confirmer ces résultats, nous avons réalisé des transfections séquentielles et utilisé la toxine botulinique qui bloque la fusion de vésicules sécrétoires et par conséquent qui bloque l'insertion de nouveaux hétérodimères synthétisés. Ainsi, nous avons montré par des études de FRET/FLIM que le processus de dé-dimérisation par 14-3-3ζ affecte seulement des hétérodimères $GABA_B$ déjà préformés et insérés à la membrane plasmique. Nous mettons donc en évidence une dissociation de l'hétérodimère préexistant plutôt qu'une moindre association entre les deux sous-unités au niveau du réticulum endoplasmique. De plus, plusieurs études concourent à démontrer que la sous-unité B1b sur laquelle nous nous sommes focalisés, serait préférentiellement localisée sur des sites postsynaptiques (Towers et al. 2000; Perez-Garci et al. 2006; Vigot et al. 2006; Bouvier 2001; Bowery et al. 2002). La protéine 14-3-3ζ a, elle aussi, été identifiée dans les densités postsynaptiques au niveau du système nerveux central (Rajan et al. 2002). Dans cette étude, nous avons aussi démontré que la protéine 14-3-3ζ est absente des terminaisons nerveuses de la corne dorsale. En effet, 14-3-3ζ ne colocalise pas ou peu avec des marqueurs pré-synaptiques tels que la synaptophysine (terminaisons pré-synaptiques), la GAD65 (terminaisons inhibitrices), VGLUT (terminaisons excitatrices) ou encore CGRP (terminaisons peptidergiques) sur des coupes de moelle épinière de rats. Par conséquent, l'interaction B1b/14-3-3ζ se produit principalement dans des compartiments post-synaptiques, et non dans les terminaisons pré-synaptiques. Nos résultats confirment que le récepteur $GABA_B$ post-synaptique contribue en partie à l'inhibition centrale de la transmission nociceptive.

Nous avons aussi montré au cours de notre travail que la protéine 14-3-3ζ est surexprimée en condition de neuropathie. Elle est à l'origine de la dissociation de l'hétérodimère B1b/B2. Or, l'hétérodimérisation entre les deux sous-unités est essentielle à la formation de récepteurs fonctionnels, capable d'activer les protéines G (Margeta-Mitrovic et al. 2000; Galvez et al. 2001; Duthey et al. 2002), et par conséquent essentielle à la régulation des cibles intracellulaires telles que les canaux calciques, ou potassiques et l'adénylate

cyclase. Les enregistrements électrophysiologiques en patch clamp des courants potassiques de type Kir3 induit par le baclofène, confirment l'altération fonctionnelle de la signalisation GABAergique $GABA_B$ lorsque le récepteur est dissocié après surexpression de la protéine 14-3-3ζ. Cette perte de fonctionnalité du récepteur $GABA_B$ en conditions douloureuses est confirmée par des dosages de GTPgammaS sur des coupes de moelles épinières de rats Sham (contrôles) et neuropathiques. Enfin, l'injection intrathécale d'anti-sens anti-14-3-3ζ ou de peptides de compétition *in vivo,* permet de potentialiser les effets anti-nociceptifs du baclofène. A l'inverse des travaux de Engle et collaborateurs (Engle et al. 2006), nos données suggèrent donc fortement que la fonctionnalité du récepteur $GABA_B$ est altérée en condition de douleur neuropathique.

La surexpression de la protéine 14-3-3ζ est spécifique de la corne dorsale ipsilatérale à la lésion et laisse penser que la dissociation du récepteur $GABA_B$ induite par 14-3-3ζ est limitée à cette corne dorsale. Cette régionalisation de la dissociation du récepteur pourrait expliquer l'efficacité du baclofène au niveau de la corne ventrale, comme agent anti-spastique comme le rapportent diverses études cliniques (Loubser and Akman 1996; Slonimski et al. 2004). La découverte d'un processus de dé-dimérisation représente donc une avancée conceptuelle qui changera notre manière d'appréhender les mécanismes de régulation de l'activation des RCPGs.

V-3) Interaction membranaire du récepteur $GABA_B$ et d'une protéine de la matrice extracellulaire, la fibuline-2 : diminution de l'activation du récepteur $GABA_B$ pré-synaptique

La dé-dimérisation n'est très certainement pas le seul mécanisme qui participe à l'inactivation du récepteur $GABA_B$ dans la moelle épinière en condition de douleur neuropathique. L'autre hypothèse que nous avons étudiée durant ma thèse, repose sur des mécanismes additionnels qui sont impliqués dans la perte de l'inhibition $GABA_B$, en particulier au niveau pré-synaptique où le $GABA_B$ limite la libération de glutamate par les fibres sensorielles primaires (Malcangio and Bowery 1996; Ataka et al. 2000; Riley et al. 2001; Bowery 2006). Une étude récente montre que l'association B1a/B2 serait majoritairement impliquée dans cette inhibition présynaptique (Vigot et al. 2006). La sous-unité B1a interagit avec une protéine de la matrice extracellulaire, la fibuline-2 (Blein et al. 2004) qui se lie aux domaines « Sushis » présents uniquement sur la région extracellulaire N-terminale du variant d'épissage B1a (Blein et al. 2004).

i) La fibuline-2 se lie aux domaines « Sushis » présents spécifiquement sur l'isoforme B1a

Les domaines « Sushis » sont également conservés dans les RCPGs de la classe B (Parthier et al. 2007; Sun et al. 2007). L'existence d'une grande hélice α dans tous les ligands peptidiques naturels des récepteurs de la classe B suggèrent que les modalités d'interaction entre le VIP (VasoIntestinal Peptide) et les récepteurs VPAC1 sont généralisables à l'ensemble des membres de cette famille de récepteurs. Il a été montré que la plus grande partie du VIP, constitué d'une hélice α, entre en contact étroit avec l'ectodomaine amino-terminal du récepteur qui est lui-même structuré par deux feuillets β antiparallèles, ou domaines « Sushis », stabilisés par trois ponts disulfures. Des mutations à l'intérieur de ces domaines « Sushis » modifient l'activation du récepteur. Ainsi, pour le récepteur VIP, l'Asp68 semble essentielle pour la liaison du ligand (Gaudin et al. 1995). De la même façon, pour le récepteur au glucagon, une mutation de l'Asp64 empêche la liaison du ligand (Carruthers et al. 1994) et pour le récepteur à la sécrétine, une mutation de D49R ou R83D diminue la liaison et la signalisation (Di Paolo et al. 1999). Ces mutations entraînent des modifications de la structure tridimensionnelle du récepteur, ce qui a pour conséquence des perturbations dans la liaison du ligand et l'activation des RCPGs. Ces domaines « Sushis » sont responsables de nombreuses interactions protéines-protéines qui peuvent moduler de façon additionnelle l'activation des RCPGs.

ii) La fibuline-2 module l'activation du récepteur $GABA_B$ pré-synaptique

Un ensemble d'études *in vitro* (FRET/FLIM) nous a permis de montrer que l'augmentation de la concentration dans le milieu ou la surexpression de la fibuline-2 entraîne une diminution de l'activation du récepteur $GABA_B$ par son ligand (baclofène), et ceci de façon dose-dépendante. Les mêmes effets sont retrouvés avec le ligand endogène, le GABA. Au contraire, une perte de la fibuline-2 par une stratégie anti-sens augmente l'efficacité de FRET entre les deux sous-unités du récepteur. Cet effet est spécifique du sous-type de récepteur B1a/B2 puisqu'aucun effet n'est observé sur l'hétérodimère B1b/B2. Nous avons ainsi montré que la fibuline-2 endogène excerce une inhibition tonique sur l'activation du récepteur $GABA_B$.

Ces résultats ont été confirmés par des études de dosage de GTPgammaS que j'ai réalisées en collaboration avec le Pr Rafael Rodriguez-Puertas (Bilbao, Espagne). Ainsi l'augmentation de la concentration dans le milieu de la fibuline-2 diminue le couplage fonctionnel des récepteurs $GABA_B$ aux protéines G alors qu'une perte de la fibuline-2

(siRNA anti-fibuline-2) augmente le nombre de récepteurs $GABA_B$ capables d'activer les protéines G.

Nous avons par ailleurs montré par des expériences de co-IP que contrairement à la protéine 14-3-3ζ, la fibuline-2 ne régulait pas l'état dimérique du récepteur. Ainsi, la fibuline-2 pourrait agir via deux mécanismes différents, soit en masquant le site de liaison des ligands, soit en modifiant la conformation du récepteur. Cependant, nous avons montré que la perte de la fibuline-2 augmente l'action des agonistes (GABA et baclofène), mais empêche celle des antagonistes (Saclofen et CGP55845). Cette apparente contradiction suggère que la fibuline-2 n'empêche pas l'action des ligands en masquant directement leur site de liaison. Cette protéine de la matrice extracellulaire peut altérer la conformation du récepteur, ayant pour conséquence un changement d'affinité des agonistes. Dans ce sens, notons que dans des conditions où l'expression de la fibuline-2 est inhibée, la forte affinité de l'agoniste pour le récepteur $GABA_B$ implique d'utiliser des concentrations élevées d'antagonistes compétitifs pour réverser son effet (résultats observés en FRET).

Cependant, afin de confirmer cette hypothèse, des expériences de binding sont actuellement en cours, en collaboration avec l'équipe de Rafael Rodriguez-Puertas (Bilbao, Espagne). Ces expériences sont primordiales pour confirmer le mécanisme d'action de la fibuline-2. Nous avons préalablement commencé les expériences avec du baclofène tritié mais certainement du fait de sa faible affinité, les nombreux tests réalisés n'ont pas été concluants. Nous envisageons donc d'utiliser des antagonistes tritiés et de réaliser des expériences de compétition avec du baclofène.

Enfin, afin de connaître le rôle de cette protéine sur la transmission synaptique GABAergique, des études d'électrophysiologie ont été réalisées sur des cultures de neurones de moelle traitées ou non avec des siRNA anti-fibuline-2. Nous avons enregistré les courants post-synaptiques excitateurs miniatures (mEPSCs) en présence de TTX. Nous nous sommes intéressés au compartiment pré-synaptique puisque le récepteur B1a/B2 est localisé préférentiellement dans ce compartiment. En condition contrôle, la baclofène diminue la fréquence moyenne des mEPSCs et cet effet est réversé par le Saclofen et le CGP55845. Cependant, lorsque les cellules sont transfectées avec le siRNA anti-fibuline-2, le Saclofen n'a plus d'effet. Ceci confirme les résultats de FRET/FLIM décrits précédemment et montre que la fibuline-2 contrôle l'inhibition pré-synaptique médiée par le $GABA_B$.

Un exemple où des molécules de la matrice extracellulaire module l'activation du récepteur $GABA_B$ est celui fourni par la tenascine-R (TN-R). Il a été montré que HNK-1, un carbohydrate exprimé notamment par la glycoprotéine tenascine R, se lie au domaine extracellulaire de B1b, présent sur les somas de neurones pyramidaux (Saghatelyan et al.

2003). Cette interaction inhibe l'activation du récepteur $GABA_B$ post-synaptique. Ainsi, la matrice extracellulaire et ses molécules associées peuvent réguler la plasticité synaptique en régulant le niveau d'inhibition GABAergique (Saghatelyan et al. 2003).

Un autre exemple d'interaction entre un RCPG et une protéine associée qui module son activité est celui de PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1), protéine de 130 kD, membre de la superfamille des immunoglobulines. Elle est présente sur les plaquettes, les monocytes, les neutrophiles et certaines sous-populations de lymphocytes. Elle est aussi un des constituants majeurs des jonctions intercellulaires des cellules endothéliales vasculaires. Il a été montré que cette protéine interagit avec le récepteur à la bradykinine (BKRB2) via son domaine extracellulaire et régule l'activité de ce récepteur couplé aux protéines G (Yeh et al. 2008). Les mécanismes de régulation entre PECAM-1 et BKRB2-Gαq restent encore à ce jour méconnus.

De façon plus générale, un des exemples les plus connus de modulation de l'activité des RCPGs via des interactions protéiques est celui des protéines RAMP (Receptor Activity-Modifying protein). Les protéines RAMPs sont une famille de trois protéines à un domaine transmembranaire. La famille des peptides à la calcitonine comprend la calcitonine, l'amyline, le CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide), et l'adrénomédulline. La famille des récepteurs à la calcitonine est composée de récepteurs couplés aux protéines G appartenant à la classe B (CLR : Calcitonin Receptor-like Receptor ou CT : Calcitonin) et de protéines modifiant l'activité de ces récepteurs (RAMP1, RAMP2 ou RAMP3) (Poyner et al. 2002). Ainsi, le récepteur à l'adrenomédulline est composé de CLR/RAMP2 (récepteur AM1) ou CLR/RAMP3 (récepteur AM2) tandis que les récepteurs au CGRP sont formés du complexe CLR/RAMP1 (Fraser et al. 1999; Poyner et al. 2002; Hay et al. 2006). Au contraire, les récepteurs à l'amyline comprennent le récepteur à la calcitonine (CT) avec une protéine RAMP, et chaque complexe CT/RAMP génère trois sous-types différents (AMY1, AMY2 et AMY3) (Christopoulos et al. 1999; Muff et al. 1999). Les RAMPs représentent d'excellents exemples de protéines qui augmentent la diversité de fonction des RCPGs. Ils facilitent la création de sites de liaison aux ligands, contrôlant la pharmacologie des RCPGs. De plus, ils ont la capacité de réguler le trafic, l'internalisation et la signalisation des RCPGs, créant de nouvelles opportunités pour découvrir de nouvelles drogues thérapeutiques. Deux mécanismes clefs permettent d'expliquer comment les protéines RAMP influencent la pharmacologie des RCPGs : elles peuvent contribuer directement à la liaison du ligand ou agir indirectement en modifiant la conformation des RCPGs (Foord et al. 1999; Foord et al. 1999). L'interface entre ces complexes de protéines génère une structure unique nécessaire pour la liaison de ligands sélectifs. Ainsi, l'acide aminé tryptophane en position 74 sur RAMP1 et sur

RAMP3 apparait déterminer l'affinité de l'adrénomédulline ; et la Phenylalanine en position 93 sur RAMP1 contribue à l'affinité du CGRP (Qi et al. 2008). Pour déterminer la nature précise des interactions entre CLR et RAMPs qui entraînent des liaisons de ligands sélectifs, il faudrait envisager une étude en trois dimensions de la structure de ces complexes.

Plus récemment, un rôle de protéine chaperonne pour les RAMPs 1 et 3, mais non pour RAMP2, a été proposé pour le trafic des récepteurs sensibles au calcium (CaS récepteur) qui sont des RCPGs de la classe C (Bouschet et al. 2005). Ainsi, les RAMPs peuvent moduler l'activation de RCPGs autres que ceux appartenant à la classe B.

iii) La fibuline-2, protéine de la MEC, régule le comportement douloureux

Dans cette étude, nous avons montré que l'expression de la fibuline-2 est surexprimée dans notre modèle de douleur neuropathique, le modèle SNL (Kim and Chung 1992), dans la corne dorsale de la moelle épinière, du coté ipsilatéral à la lésion nerveuse. Nous notons que la fibuline-2 est peu exprimée chez les animaux Sham, et qu'elle est fortement surexprimée après lésion (RT-PCR et immunohistochimie). Une autre étude récente a montré une surexpression de la fibuline-2 dans des conditions pathologiques (Piscaglia et al. 2009). De plus, nous ne notons aucune variation d'expression dans les ganglions rachidiens chez les animaux neuropathiques comparés aux animaux Sham, ce qui suggère que la fibuline-2 est surexprimée et sécrétée par des neurones ou par la glie au niveau de la moelle épinière. Nous n'avons pour le moment pas identifié la source exacte de cette surexpression, et les mécanismes par lesquels la fibuline-2 est surexprimée après lésion nerveuse restent à être éclaircis. Nous avons montré par immunohistochimie (optique et électronique) que la fibuline-2 colocalise avec la sous-unité B1a au niveau de la membrane plasmique de compartiments extrasynaptiques, sur des tissus provenant de rats neuropathiques.

Finalement, nous avons évalué la pertinence de ces mécanismes *in vivo*, dans notre modèle de douleur neuropathique. Nous montrons que des injections intrathécales de siRNA anti-fibuline-2 potentialisent l'effet antinociceptif du baclofène et diminuent la sensibilisation douloureuse chez des rats neuropathiques. Les siRNA anti-fibuline-2 permettent de restaurer de façon partielle l'activation du récepteur $GABA_B$ et ainsi de limiter le relargage du glutamate, responsable de l'hypersensibilité douloureuse. La surexpression de la fibuline-2 semble donc être en partie responsable du comportement douloureux, et de l'allodynie mécanique observée chez des rats neuropathiques. Cet effet passe par la modulation de l'activation du récepteur $GABA_B$, et plus spécifiquement de l'hétérodimère B1a/B2 pré-

synaptique. Toutefois, les différences pharmacologiques entre hétérodimères B1a/B2 et B1b/B2 subsistent en absence de fibuline-2 (sensibilité aux antagonistes). La fibuline-2 n'est donc pas seule responsable des caractéristiques pharmacologiques des deux types d'hétérodimères. Il faut alors envisager d'autres mécanismes, soit à travers d'autres partenaires, soit à travers un effet direct des « Sushis » (Carruthers et al. 1994; Couvineau et al. 1995) pour expliquer les différences pharmacologiques obtenues *in vitro* entre les deux sous-types de récepteurs $GABA_B$.

D'autres molécules de la matrice extracellulaire sont connues pour être surexprimées chez l'adulte suite à une lésion nerveuse (Jones 1996). Une étude montre notamment une surexpression de la fibronectine, une protéine de la matrice extracellulaire, dans la corne dorsale de la moelle épinière du coté ipsilatéral à la lésion nerveuse (Nasu-Tada et al. 2006; Tsuda et al. 2008). Cette surexpression de la fibronectine participe à la surexpression des récepteurs P2X4 au niveau de la microglie (Tsuda et al. 2003; Tsuda et al. 2008). En effet, il a été montré une surexpression des récepteurs purinergiques P2X4 dans la microglie spinale après lésion nerveuse (Tsuda et al. 2003; Zhang et al. 2006). L'injection intrathécale de fibronectine chez des rats naïfs entraîne une augmentation du taux protéique de P2X4 dans la moelle épinière et produit une allodynie tactile (Tsuda et al. 2003; Tsuda et al. 2008; Tsuda et al. 2008; Ulmann et al. 2008). La stimulation de ces récepteurs P2X4 entraîne le relargage de BDNF qui est responsable de la modification du gradient transmembranaire des ions chlorures dans les neurones nociceptifs de la lamina I (Coull et al. 2005) et contribue ainsi à la sensibilisation douloureuse (Tsuda et al. 2003; Tsuda et al. 2005; Ulmann et al. 2008).

Concernant la fibuline-2, une autre hypothèse possible est qu'elle pourrait être responsable de la formation d'oligomères de $GABA_B$. Comme nous l'avons discuté préalablement, le récepteur $GABA_B$ est capable de former des oligomères via la sous-unité B1 (Pin et al. 2009). Sous cette forme oligomérique, il a été montré que le couplage aux protéines G était moins efficace. Nous pourrions alors imaginer que la fibuline-2 pourrait participer à l'assemblage de ces complexes d'hétérodimères $GABA_B$. En effet, la fibuline-2 existe sous forme de dimères (Sasaki et al. 1997) et pourrait créer une interaction entre deux hétérodimères en se liant à deux sous-unités B1a différentes.

Enfin, la fibuline-2, protéine de la matrice extracellulaire, pourrait jouer un rôle d'ancrage du récepteur $GABA_B$. Elle pourrait, notamment par la formation des complexes oligomériques précédement cités, confiner le récepteur $GABA_B$ sur des sites éloignés de ses

cibles intracellulaires. Ainsi, nous avons voulu étudier le rôle de la fibuline-2 sur la mobilité latérale du récepteur $GABA_B$.

iv) La fibuline-2 diminue la mobilité du récepteur $GABA_B$ pré-synaptique

Dans cette étude préliminaire, nous avons testé l'hypothèse que la fibuline-2 contrôle la distribution du $GABA_B$ à la surface des neurones en affectant sa mobilité latérale. Nous avons pour cela réalisé des expériences de FRAP sur des cultures dissociées de neurones transfectées ou non avec la fibuline-2 et avec les sous-unités du récepteur $GABA_B$ (B1a-GFP et B2-DsRed). Ces cultures sont ensuite traitées ou non avec le baclofène, agoniste du récepteur $GABA_B$. Tout d'abord, nous avons montré que la mobilité de la sous-unité B1a-GFP du récepteur était augmentée lorsque les cultures sont traitées avec le baclofène. Cependant, lorsque le fibuline-2 est elle aussi transfectée, la mobilité de B1a est significativement diminuée. Ainsi, la fibuline-2 pourrait restreindre le récepteur $GABA_B$ dans des compartiments éloignés de ses cibles ou au contraire l'immobiliser au niveau de son site d'activation. Une stratégie envisageable pour suivre la mobilité du récepteur entre les compartiments synaptiques et extrasynaptiques sera de faire un suivi de particule unique en utilisant des quantum dots.

Les synapses sont enveloppées par un dense maillage de matrice extracellulaire (ECM), contenant des glycoprotéines et des protéoglycanes d'origine gliale et neuronale. Ce réseau est assemblé durant les 3 à 5 semaines du développement postnatal, et atteint un niveau d'expression adulte dès que le circuit synaptique mature est établi (Koppe et al. 1997; John et al. 2006). A cause de son effet inhibiteur sur les réarrangements structuraux et la croissance axonale, la matrice extracellulaire a été impliquée dans la stabilisation synaptique et la maintenance du réseau synaptique dans le système nerveux central de l'adulte (Celio et al. 1994; Pizzorusso et al. 2002). Il a notamment été montré une interaction entre les récepteurs ionotropiques au glutamate NMDA membranaires avec des composants de la matrice extracellulaire tels que la Reelin. Cette interaction régule la rétention synaptique du récepteur NMDA et sa distribution de surface au cours du développement (Groc et al. 2007).

Un autre papier récent a montré que la matrice extracellulaire affecte la mobilité latérale du récepteur AMPA et la plasticité synaptique à court terme (Frischknecht et al. 2009). D'autres papiers montrent qu'en effet, les protéines présentes à la surface cellulaire, incluant les récepteurs ionotropiques $GABA_A$, sont mobiles dans la membrane plasmique neuronale par diffusion latérale (Triller et al. 2003; Thomas et al. 2005; Bannai et al. 2009). Les échanges de récepteurs entre les compartiments synaptiques et extrasynaptiques

contribuent à réguler le nombre de récepteurs à la synapse. La matrice extracellulaire semble compartimentaliser la surface neuronale et par conséquent restreindre la mobilité de surface de protéines membranaires (Frischknecht et al. 2009). Cependant, l'ensemble de ces données fait référence à la mobilité latérale de récepteurs ionotropiques. A ce jour, peu de données sont connues sur la mobité latérale des récepteurs métabotropiques (Serge et al. 2002).

L'ensemble de nos résultats généralise ces données et montrent d'une part que l'activation du récepteur $GABA_B$ par son ligand augmente sa mobilité. D'autre part, nous montrons pour la première fois qu'une protéine de la matrice extracellulaire, la fibuline-2, limite la diffusion d'un récepteur métabotropique, le récepteur $GABA_B$. Il faudra cependant poursuivre cette étude par des techniques de suivi de particules uniques afin de connaître plus précisément la localisation synaptique de ce confinement. Nous montrerons ainsi que la matrice extracellulaire contrôle la disponibilité des récepteurs pour les synapses. Un tel mécanisme de régulation de la plasticité synaptique présenterait alors une signification beaucoup plus large que le simple contexte des douleurs chroniques.

VI .DOULEUR ET APPROCHES THERAPEUTIQUES

VI-1 Effets controversés du baclofène

Un des premiers points de débat est lié à l'efficacité controversée du baclofène, agoniste du récepteur $GABA_B$, comme agent antinociceptif sur les douleurs persistantes chez l'animal. En effet, plusieurs travaux concluent que cet agent est capable de réverser les douleurs neuropathiques (Hwang and Yaksh 1997; Patel et al. 2001). Or, les auteurs ne se sont attachés à tester la diminution du comportement douloureux après injection de différentes doses de drogues, que sur la patte lésée de l'animal. Ils n'ont, dans ces travaux, pas cherché à comparer leurs résultats à une situation témoin que peuvent représenter la patte controlatérale à la lésion du même animal, les scores comportementaux de l'animal avant l'opération engendrant la neuropathie, ou même des animaux non neuropathiques (naïfs ou sham) subissant le même traitement. A l'inverse, les études qui ont testé les effets du baclofène sur des animaux rendus neuropathiques et qui les ont comparés à une situation témoin (Idanpaan-Heikkila and Guilbaud 1999; Franek et al. 2004; Gwak et al. 2006), concluent pour leur part que si le baclofène a bien des effets antinociceptifs, ces derniers ne sont que partiels. Le contrôle inhibiteur qu'il engendre s'avère insuffisant pour palier complètement aux états douloureux chroniques. Dans les travaux présentés ici, nous avons testé, lors de deux études distinctes, les effets du baclofène sur la réversion du comportement d'allodynie statique

développée par les animaux rendus neuropathiques. Les seuils de retrait de la patte après neuropathie chutent de près de 60% illustrant une sensibilisation des animaux. Ceux-ci ne sont que partiellement augmentés (25% d'augmentation en moyenne) lors de l'administration de baclofène. Aucun animal neuropathique n'a totalement récupéré sa sensibilité pré-opératoire, ni présenté des scores de retrait de la patte comparables à ceux des animaux Sham subissant les mêmes injections. Ceci démontre qu'en condition de douleur chronique, la mise en jeu du système inhibiteur GABAergique $GABA_B$ est insuffisante pour compenser l'état de sensibilisation douloureuse de l'animal. Il nous a cependant été possible d'augmenter l'efficacité du contrôle inhibiteur $GABA_B$ chez l'animal neuropathique par deux approches discutées dans une partie suivante. Le fait de pouvoir potentialiser l'effet du baclofène montre que ce récepteur n'est pas pleinement efficace en conditions de douleurs chroniques. Ces résultats sont en accord avec une diminution de la liaison d'agonistes $GABA_B$ dans la moelle en condition douloureuse (Castro-Lopes et al. 1995).

La mise en évidence de la perte d'efficacité du contrôle inhibiteur GABAergique $GABA_B$ en conditions de douleurs neuropathiques, résultant de la dissociation de l'hétérodimère par la protéine cytosolique 14-3-3ζ, nous a conduit à envisager deux approches distinctes pour la réversion du phénomène (cf Publication I). Nous avons tout d'abord réalisé une « down-régulation génique » de la protéine 14-3-3ζ par l'utilisation de siRNA (*small interference RNA*), puis une « down-régulation fonctionnelle » par l'utilisation de peptides de compétition pour la liaison B1b/14-3-3ζ (cf Publication I). Dans les deux cas, nous avons montré que nous potentialisions les effets antinociceptifs de l'agoniste du récepteur $GABA_B$, le baclofène. Une récupération de près de 80% de la réponse au seuil de retrait de la patte pour les animaux neuropathiques nous encourage à penser que ce mécanisme représente une cible non négligeable dans la lutte contre les douleurs neuropathiques.

VI-2. Avantages d'une « down-régulation fonctionnelle »

Lorsque la protéine cible possède un aussi large éventail de fonctions que les protéines de la famille 14-3-3, l'extinction de cette protéine par une stratégie anti-sens provoque inévitablement de larges effets secondaires, même en cas de traitement local. Bien que dans nos travaux, aucune étude systématique des effets secondaires n'ait été conduite, les injections intrathécales de siRNA anti-14-3-3ζ n'échappent probablement pas à la règle. Cependant, nous ne notons aucune différence majeure dans le comportement locomoteur et d'exploration entre les animaux traités et non traités. Du fait des nombreuses interactions de la protéine 14-3-3 avec d'autres partenaires intracellulaires, nous ne pouvons cependant pas exclure que la modulation de l'activation $GABA_B$ par les anti-sens anti-14-3-3 soit due à une inhibition des

cascades de signalisation intracellulaire plutôt qu'à la perturbation directe de l'interaction B1b/14-3-3ζ. Nous avons par ailleurs montré que contrairement aux siRNA, cette stratégie de « down-regulation fonctionnelle » avec les peptides présente l'avantage de cibler spécifiquement l'interaction B1b/14-3-3ζ tout en laissant la protéine 14-3-3ζ disponible pour ses nombreux autres partenaires protéiques tels que Raf (Pozuelo Rubio et al. 2004). En effet, l'interaction B1b/14-3-3ζ apparaît caractéristique d'un motif de liaison de type III (Coblitz et al. 2006). Les peptides de compétition qui représentent une séquence du domaine coiled-coil C-terminal de B1b, sont donc complémentaires d'un site de liaison sur 14-3-3 de type III (Ganguly et al. 2005; Coblitz et al. 2006) alors que la majorité des partenaires protéiques de 14-3-3 se fixe sur des sites de type I (RSXpSXP) ou II (RXXXpSXP) (Coblitz et al. 2006). Ainsi, l'inhibition fonctionnelle de cette interaction par l'utilisation de ces peptides de compétition présente moins de risque de perturber d'autres voies de signalisation.

Nous avons aussi montré que les peptides testés pénètrent dans le soma et les prolongements des cellules neuronales par une voie indépendante de l'endocytose, avec une nette préférence pour ceux couplés au pVEC notamment pour le pVEC-B1(922-930). Le pVEC représente donc un « cell-penetrating peptide » efficace (Elmquist et al. 2001) permettant une internalisation des peptides sans induire de toxicité cellulaire *in vitro*. Toutefois, la localisation nucléaire de nos peptides d'intérêt pose un problème, car nous n'avons aucun recul quant aux effets indésirables que cela peut avoir.

Une meilleure efficacité des peptides par rapport à la stratégie anti-sens est aussi suggérée par l'effet des inhibiteurs injectés seuls. Nous pouvons noter que les injections intrathécales de siRNA anti-14-3-3ζ seuls n'ont pas d'effet sur les seuils de retrait de la patte d'animaux neuropathiques, alors que les injections de peptides d'intérêt dans les mêmes conditions permettent d'augmenter ces seuils de 30% en moyenne. Enfin, «la down-régulation génique» de 14-3-3 implique de réaliser sur plusieurs jours, des injections répétées d'anti-sens souvent lourdes à mettre en œuvre. A l'inverse, le traitement d'animaux avec des peptides de compétition ne nécessite qu'une seule injection pour observer rapidement les effets.

Enfin, l'action conjointe des peptides de compétition et du baclofène induit une réversion quasi-totale des comportements allodyniques mécaniques chez les animaux neuropathiques. N'ayant testé qu'une seule concentration et qu'un seul temps d'incubation, nous pouvons imaginer améliorer encore ces résultats. En effet, il faudrait évaluer la durée des effets induits par les injections. Cette durée dépend probablement de la stabilité et de la disponibilité des molécules de compétition. Il s'agit d'une donnée nécessaire pour envisager une application clinique de cette stratégie. Ainsi, de tels peptides de compétition représenteraient un moyen nouveau et efficace pour la régulation à long terme du contrôle inhibiteur GABAergique $GABA_B$ en condition de sensibilisation douloureuse.

L'équipe de Salter MW a elle aussi montré que l'on pouvait traiter les douleurs neuropathiques et inflammatoires en utilisant des peptides de compétition (Liu et al. 2008). Dans leur étude, ils s'intéressent aux récepteurs NMDA impliqués dans l'hypersensibilité des douleurs chroniques. Cependant, l'utilisation clinique d'antagonistes des récepteurs NMDA est délétère due aux nombreuses fonctions physiologiques de ce récepteur. L'activité du récepteur NMDA est augmentée par une protéine tyrosine kinase Src. Cette protéine régulatrice Src est liée au récepteur via une protéine adaptatrice ND2. L'idée a donc été d'utiliser des peptides de 40-49 acides aminés fusionnés à un peptide de pénétration cellulaire qui permettent de dissocier Src de ND2. Ainsi, cette stratégie permet de limiter l'hyperactivité du récepteur NMDA par Src sans abolir ses autres fonctions, et sans inhiber directement l'activité catalytique de Src. Ce découplage entre Src et le complexe NMDA permet de supprimer l'hypersensibilité douloureuse sans effet secondaire.

De plus, un autre avantage des peptides est qu'ils peuvent cibler un sous-type spécifique de récepteur. En effet, dans notre cas, nos peptides de compétition couplés au pVEC ciblent spécifiquement l'interaction entre la protéine 14-3-3ζ et le domaine C-terminal de la sous-unité B1b, dans les compartiments post-synaptiques. D'autres peptides qui ciblent les domaines « Sushis » présents uniquement sur la sous-unité B1a permettent de cibler quant à eux l'hétérodimère B1a/B2, préférentiellement localisé dans des compartiments pré-synaptiques (Tiao et al. 2008). Il serait donc intéressant d'utiliser ces peptides pour cibler directement l'interaction entre les domaines « Sushis » de B1a et la fibuline-2 et observer leurs effets sur la sensibilisation douloureuse de l'animal.

Ainsi, l'utilisation conjointe des peptides de compétition visant l'interaction de B1b/14-3-3ζ et de ceux visant l'interaction de B1a/fibuline-2 permettraient peut-être une meilleure potentialisation de l'effet du baclofène et ainsi une meilleure réversion de la sensibilisation douloureuse.

VI-3. Les cell penetrating peptides (CPP) comme vecteurs thérapeutiques

De très nombreux travaux se sont efforcés depuis des années de proposer des vecteurs efficaces et inoffensifs pour la distribution d'agents à vertus thérapeutiques. Plusieurs types de vecteurs ont ainsi été développés, viraux et non-viraux. Les vecteurs viraux sont de loin les plus efficaces pour la distribution intracellulaire de molécules bioactives mais plusieurs limites en restreignent l'utilisation : capacité de chargement limitée, problème de production, possible recombinaison virale et immunogénicité *in vivo* (Miller et al. 1990). Les vecteurs non

viraux, à base de polycations et de lipides, sont non-immunogéniques, mais on leur reproche souvent leur coût, leur toxicité cellulaire, leur faible taux de transfection et l'instabilité des complexes charge-vecteur (Wearley 1991; Luo et al. 2000). Depuis une dizaine d'années, le développement de vecteurs courts, cationiques et amphipatiques, les peptides de pénétration cellulaire (« cell penetrating peptides » ou CPPs) présente beaucoup d'intérêt. Ces vecteurs de distribution offrent plusieurs avantages : faible toxicité, transport de charges très variées (protéines, peptides, antisens, PNA, liposomes, plasmides), efficacité remarquable car ils augmentent de façon massive l'internalisation de ces diverses molécules (Dietz et al. 2004; Vives 2005; Noguchi et al. 2006). Le CPP pVEC utilisé dans ce travail (Publication I) a été identifié en 2001 et possède toutes ces caractéristiques (Elmquist et al. 2001; Elmquist et al. 2006).

Les profils d'internalisation que nous avons obtenus avec nos peptides d'intérêt couplés au pVEC sont assez inhabituels et très intéressants. En effet, la plupart des CPPs voient leur internalisation diminuer à basse température, sont affectés par des inhibiteurs de l'endocytose, et présentent une répartition intracellulaire vésiculaire (Lundberg et al. 2002; Richard et al. 2003). Nos peptides sont eux majoritairement internalisés par des voies indépendantes d'une production d'énergie et se répartissent dans la cellule de façon uniforme. Ces caractéristiques sont en accord avec des travaux précédemment réalisés avec le pVEC (Elmquist et al. 2001). Comme les ponts disulfures qui unissent le CPP et sa charge sont rompus dans le cytoplasme (Saito et al. 2003), cela signifie que le peptide d'intérêt lui-même n'est pas retenu dans des vésicules, ce qui lui confère très rapidement après internalisation, une grande disponibilité pour ses cibles. De plus, nous avons vérifié que ces peptides présentent une absence de cytotoxicité cellulaire. Ainsi, les vecteurs de transport de type CPP et plus particulièrement le pVEC représentent des outils utiles pour le développement d'agents thérapeutiques.

Cependant, les CPPs sont capables de pénétrer des types cellulaires d'une grande diversité. Cette non-sélectivité représente une limite de ces méthodes. Pour remédier à ce problème, on pourrait envisager une distribution cellulaire spécifique médiée par la reconnaissance d'un motif spécifique d'une population cellulaire, couplé au CPP transportant la molécule d'intérêt (Vives 2005).

VI-4. Multiplicité des cibles pertinentes pour la réversion des douleurs chroniques

De nombreuses équipes concentrent leurs recherches sur les mécanismes cellulaires à l'origine des douleurs chroniques neuropathiques. Notamment, l'élaboration de nouvelles

approches visant les canaux ioniques, qui exercent un rôle central dans l'excitabilité cellulaire, a rapidement pris de l'essor au cours des dix dernières années (Markman et al. 2006). L'inhibition de canaux sodiques de type Nav1.8 par une stratégie antisens induit par exemple une diminution des douleurs neuropathiques (Lai et al. 2002). L'Ambroxol, un bloquant sélectif de ces mêmes canaux sodiques supprime aussi les symptômes douloureux chez des animaux lésés (Gaida et al. 2005). L'α-hydroxyphenylamide, un nouvel antagoniste des canaux sodiques TTX sensibles et résistants, a quant à lui montré des propriétés antihyperalgiques sur des modèles de rats neuropathiques sans affecter la coordination motrice (Ko et al. 2006). Le traitement par des anti-sens dirigés contre le sous-type $Ca_v3.2$ des canaux calciques de type T produit des effets anti-nociceptifs, anti-hyperalgiques et anti-allodyniques majeurs (Bourinet et al. 2005). D'autres travaux réalisés au laboratoire montrent de surcroît que le blocage spécifique de l'expression des sous-types $Ca_v1.2$ des canaux calciques de type L réverse les comportements douloureux chroniques, alors que l'inhibition des sous-types $Ca_v1.3$ ne produit pas ces effets anti-allodyniques (Fossat et al. soumis).

Ces exemples portent à croire que de nombreux mécanismes cellulaires sont régulés en conditions de douleur chronique et que d'en neutraliser un, suffit à reverser de façon généralement partielle mais encourageante, les états neuropathiques. Toutefois, cette version simpliste se heurte à l'inefficacité en clinique humaine des traitements ciblant un seul mécanisme. On peut alors imaginer que la maîtrise de plusieurs de ces mécanismes à la fois permettrait une réversion plus efficace de ces états.

VI-5. Nécessité de nouvelles approches thérapeutiques

L'hypothèse unificatrice d'un mécanisme unique sous-jacent à toutes les douleurs neuropathiques est donc plus qu'improbable. Par contre, l'idée qu'un ensemble de mécanismes périphériques, spinaux, et cérébraux, tous en étroite relation, contribueraient à la genèse des douleurs neuropathiques, paraît plus réaliste. Le phénomène douleur est hétérogène en termes de facteurs étiologiques, de mécanismes sous-jacents et de caractéristiques temporelles. On peut ainsi envisager que la combinaison des mécanismes en cause dans la sensibilisation douloureuse varie en fonction des atteintes ou des individus. Cette idée s'accorde avec (1) la diversité des cibles identifiées (Cf. précédemment), (2) la complexité de mécanismes par lesquels les stimuli nociceptifs sont détectés, et les informations nociceptives propagées, intégrées et perçues (Cf. Introduction), (3) la multiplicité des symptômes observée en clinique. Cette hypothèse permet d'envisager d'un point de vue mécanistique la multiplicité des symptômes révélés par chaque patient atteint de neuropathie.

Une analyse basée sur les symptômes des douleurs chroniques est souvent la seule à disposition des cliniciens pour évaluer la progression de la maladie et le choix des traitements. Mais, étant donné la diversité et la complexité des mécanismes pouvant être mis en œuvre en cas de douleur chronique, la symptomatologie comme seul outil permettant de définir la stratégie thérapeutique ne semble pas pertinente. En effet, les symptômes n'ont pas de strictes correspondances avec les mécanismes sous-jacents : (1) un mécanisme peut ainsi être responsable de symptômes divers et variés, (2) un même symptôme chez deux patients distincts peut être engendré par différents mécanismes, (3) plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine d'un seul symptôme chez un patient, (4) l'ensemble de ces mécanismes peuvent même évoluer au cours du temps. Ainsi, en clinique, chez les patients atteints de douleurs chroniques, il est actuellement impossible de prédire le ou les mécanismes responsables de leur douleur sur la seule base de l'étiologie de la neuropathie ou sur la distribution et la nature des symptômes. Sans l'identification des mécanismes, la stratégie optimale pour un traitement des patients douloureux ne peut être déterminée (Woolf and Mannion 1999).

L'identification des mécanismes et de leurs combinaisons est donc un élément crucial dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Elle repose sur deux approches complémentaires : (1) les recherches focalisées sur le rôle d'une protéine particulière impliquée dans la nociception (Woolf 2000; Hunt and Mantyh 2001; Julius et al. 2001); (2) les analyses à haut débit cherchant à identifier les produits d'expression génique (ARNm ou protéines) à cibler (Wood 2000). La première approche a permis de mettre en évidence efficacement un grand nombre de récepteurs et de canaux ioniques responsables de la transduction du message nociceptif dans les terminaisons périphériques (Scholz and Woolf 2002). Elle a également documenté le rôle des voies de signalisation intracellulaire dans les modulations et modifications à l'origine des phénomènes de sensibilisation douloureuse (Woolf 2000; Woolf and Salter 2000). Comparativement, la seconde approche n'en est qu'à ses débuts. Les données déjà disponibles révèlent que de nombreux gènes voient leur expression modulée dans les neurones sensoriels, ou dans la moelle dorsale après lésion d'une fibre nerveuse périphérique (Yang et al. 2004).

La multiplicité des molécules impliquées rend illusoire la possibilité de les cibler individuellement. Il faut alors envisager d'identifier et de cibler les points de convergence des mécanismes dans lesquels ces molécules sont impliquées. Il peut s'agir d'un récepteur ou d'un canal membranaire, cible de plusieurs mécanismes de régulation, ou bien d'une voie de signalisation intracellulaire, cible de plusieurs systèmes de transduction.

Dans notre laboratoire, nous travaillons actuellement sur des mécanismes dépendants des microARNs capables de cibler simultanément l'expression de plusieurs cibles (Favereaux

et al. soumis). Il s'agit ici, non pas de cibler une molécule intervenant dans la douleur, mais d'intéragir avec les systèmes de régulation de son expression (cf Annexe 4).

CONCLUSION

Les douleurs neuropathiques d'origine centrale ou périphérique sont particulièrement difficiles à traiter à l'aide des moyens thérapeutiques actuellement disponibles et il est absolument nécessaire d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Le but essentiel de nos travaux était ainsi de définir les mécanismes cellulaires, moléculaires, et physiologiques impliqués dans ces douleurs neuropathiques au niveau spinal.

Bien que le ciblage de la transmission synaptique puisse représenter une option thérapeutique envisageable (Dworkin et al. 2007), l'ubiquité des mécanismes impliqués pose de réels problèmes et limite effectivement l'efficacité de telles approches. Pour ces raisons, nous avons plutôt concentré notre étude sur la balance excitation/inhibition qui module la manière dont les neurones, ou les microcircuits spinaux, intègrent et répondent à des informations nociceptives chroniques. Ainsi, nous pensons pouvoir identifier et cibler des mécanismes nouveaux, plus spécifiques et avec moins d'effets secondaires.

Dans cette étude, nous avons considéré les processus de désinhibition qui limitent l'inhibition du récepteur métabotropique $GABA_B$ dans la moelle épinière de rat. Plus précisément, l'ensemble de ce travail présenté ici a permis de montrer que l'activation du récepteur $GABA_B$ est finement ajustée grâce aux interactions entre ce récepteur et des protéines associées. En effet, nous avons montré que deux protéines partenaires de $GABA_B$ sont surexprimées en conditions de neuropathie et sont capables d'ajuster finement son activation, et probablement d'autres RCPGs, par la mise en jeu de mécanismes nouveaux. Ces deux protéines partenaires, la protéine cytosolique 14-3-3ζ et la fibuline-2, qui est une protéine de la matrice extracellulaire, agissent de manière différente. Nous avons en effet démontré que 14-3-3ζ régule l'état oligomérique de RCPGs par des mécanismes de dé-dimérisation tandis que la fibuline-2 module l'activation de l'hétérodimère par son ligand. De plus, elles agissent dans des compartiments distincts, 14-3-3ζ agissant sur l'hétérodimère B1b/B2 post-synaptique et la fibuline-2 sur l'hétérodimère B1a/B2 pré-synaptique. Enfin, ces protéines partenaires semblent conférer des propriétés pharmacologiques différentes entre les deux sous-types de récepteurs mais les mécanismes restent encore à élucider.

De tels mécanismes offrent autant de niveaux de contrôle supplémentaires pour réguler les processus physiopathologiques. L'ensemble de ces recherches devrait contribuer à mettre au point des stratégies thérapeutiques permettant de déplacer la balance excitation/inhibition afin d'inhiber l'hyperexcitabilité neuronale en conditions douloureuses sans altérer la perception sensorielle normale. Enfin, ce concept présente une haute valeur heuristique puisqu'il forcera à reconsidérer la régulation de l'activation des RCPGs dans des conditions physiopathologiques.

MATERIEL ET METHODES

1. Etudes in vitro

1.1 Les cultures

1.1.1.Cultures primaires de neurones de moëlle épinière et de cortex

Les cultures primaires de neurones de moëlles épinières ont été utilisées pour les expériences d'électrophysiologie alors que des cultures de cortex cérébraux ont été réalisées pour les études de FRET et de FRAP. Ce choix est justifié par la densité cellulaire élevée nécessaire pour les études d'imagerie.

Les cultures primaires dissociées de neurones sont réalisées à partir d'embryons de rattes gestantes de souche Sprague-Dawley à 18 jours de développement embryonnaire (stade E18). Pour les cultures de moelle épinière, les corps sont tout d'abord rincés dans du GBSS (Gey's Balanced Salt Solution, Eurobio, CS1GEY00-01) + glucose 1% (Sigma G-6152). La moelle est ensuite prélevée puis transvasée dans une boite de pétri disposée sur de la glace pilée contenant de l'EBSS (Earle's Balanced Salt Solution, Invitrogen, 14155-048) + Penicilline/Streptomycine 1% (Gibco 15140-122). Tous les animaux sont ainsi disséqués. Puis toutes les moelles sont nettoyées (membranes ôtées) dans du DMEM-F12 (Gibco 31331-028) et morcelées en petits morceaux au scalpel. La dissection du cortex se fait dans du DMEM-P-Glutamax^{TM} I (Dulbelcco's Modified Eagle's Medium, Gibco 31966-021). Les tissus (moelle épinière lombaire ou le cortex) sont ensuite dissociés chimiquement avec de la trypsine 1X (Gibco 25300-054) pendant 25 min à 37°C (incubateur à CO_2) puis mécaniquement avec une pipette Pasteur. Un culot cellulaire a été obtenu après centrifugation (suivant cortex ou moelle, à 1000 rpm ou 3000 rpm resp., pendant 5 min) puis traité avec un inhibiteur de la trypsine (STI : Soybean Trypsin Inhibitor, Sigma T6414) et de la DNase (Sigma D5025). Le culot a ensuite été resuspendu dans du milieu complet Neurobasal TM medium (Gibco, 21103-49) supplémenté avec 2% de sérum B-27 (Gibco 17504-044), 1% de GlutaMAX-I (Gibco 35050-038) et 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco 15140-122). Les supports de culture, lamelles de verres sont préalablement recouverts de poly-D-lysine à 0,1mg/mL (Sigma P2636, Saint Louis, MO) toute une nuit à 37°C, puis 2 heures avec une solution de laminine à 0,05mg/mL (Sigma L 2020) afin de favoriser l'adhésion des neurones sur le support. Les puits sont ensemencés avec 1.10^5 ou $8.\ 10^5$ cellules selon le type d'expériences réalisées et pré-incubés 2 heures pour permettre l'adhésion cellulaire. L'incubation est réalisée en présence de 1 mL (plaque 12 puits) ou 2 mL (plaque 6 puits, Nunclon™ Surface 140675) de milieu de culture. Elle est maintenue pendant 7 à 12 jours à 37°C dans une atmosphère saturée en eau et enrichie à 5% de CO_2. Le renouvellement de milieu s'opère tous les 2-3 jours.

1.1.2. Culture des cellules COS-7 :

La lignée cellulaire COS-7 est issue de cellules tumorales provenant de l'épithélium rénal du « singe vert » d'Afrique. Ces cellules, très souvent utilisées, ont la propriété d'être stables et d'avoir une capacité de division par mitose illimitée, à condition d'utiliser un milieu complet en éléments nutritifs. Il est alors très important de réaliser des repiquages pour diviser les cellules dans plusieurs flasques après un comptage sur la cellule de Malassez. De par leur origine tumorale, chaque utilisateur doit les manipuler sous un **P**oste à **S**écurité **M**icrobiologique (PSM) avec des gants désinfectés à l'éthanol à 70°. En effet, un PSM est préconisé lors de la manipulation de matériel biologique pathogène ou potentiellement pathogène. Ce dernier possède une ouverture frontale partielle sur le plan de travail et une aspiration frontale de l'air ambiant à la base du poste, suivi d'une expulsion dans la partie supérieure à travers un filtre. Une partie de l'air filtré redescend dans l'enceinte (flux laminaire vertical), garantissant ainsi une protection totale du produit, de l'utilisateur et de l'environnement.

1.1.3. Culture organotypique

Ce modèle consiste à mettre en culture la moelle épinière lombaire ainsi que le ganglion rachidien correspondant **(Figure 1)** suivant le protocole original de Braschler et al., 1989 (Braschler et al. 1989). L'organisation et la circuiterie entre les neurones sont bien conservées par cette technique.

Brièvement, les rats nouveaux-nés (P0 : post-natal 0) de souche Wistar sont sacrifiés par décapitation. Dans des conditions de stérilité optimales, la moelle épinière lombaire ainsi que le ganglion rachidien correspondant sont prélevés et isolés dans une boite de Petri contenant du GBSS (Gey's balanced salt solution, Eurobio, CS1GEY00-01). La moelle est ensuite coupée en tranches de 300µm d'épaisseur grâce à un chopper (McIlwain, Gomshall, Surrey, UK), puis la partie dorsale est isolée. Tranches et ganglions sont alors irradiés afin de limiter la prolifération gliale (Cesium 137 comme source radioactive, dose absorbée de 15 Gray). Une tranche (2a) et un ganglion (2b) sont enfin positionnés sur une lamelle préalablement traitée avec 1mg/mL de polylysine (Sigma P2636, Saint Louis, MO), et placés dans un tube contenant 750 µl de milieu de culture (milieu Neurobasal additionné de 2.5% de sérum de cheval (Gibco 26050-070), 2% de B27 (Gibco 17504-044), 1% de Glutamax (Gibco 35050-038), et 1% de penicilline/streptomycine (Gibco 15140-122-070)). Ces tubes sont incubés à 37°C (5% CO2, 100% d'humidité) dans un roller (support rotatif) et conservés 5 semaines. Dans ces conditions, les fibres sensorielles émises par le ganglion établissent des connections avec la tranche de moelle en culture **(Figure 1)**. La moitié des cultures est stimulée de façon chronique avec 150nM de capsaïcine (Sigma, M2028), principe actif du piment rouge et ligand des récepteurs TRPV1. Ces récepteurs sont exprimés par les neurones sensoriels ganglionnaires *in vivo* et *in vitro*. Une application répétée (10 jours) de capsaïcine est réalisée. Il est ainsi possible de mimer un état de stimulation chronique des neurones spinaux par des fibres afférentes sensorielles.

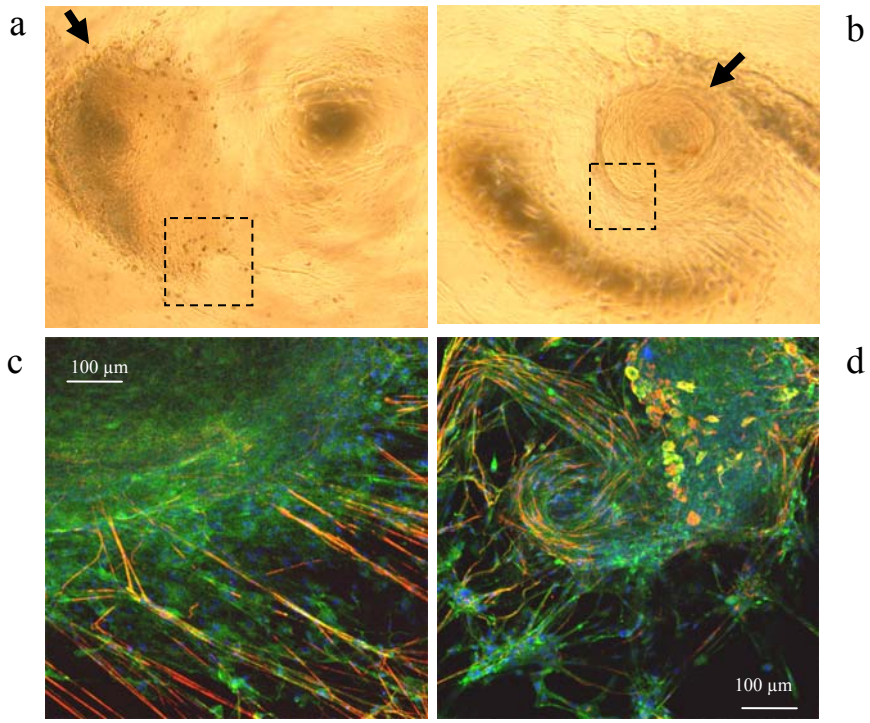


Figure 1 : Photos d'une culture organotypique constituée d'une tranche de moelle épinière lombaire (a et c) et un ganglion rachidien de la racine dorsale (b et d). (a et b) Photos de la culture obtenue à l'aide d'un microscope inversé (x4). **(c et d)** Les encadrés pointillés des photos a et b sont représentés sur les photos c et d respectivement, obtenues au microscope confocal (x20). Un marqueur des fibres nociceptives, la CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide) est visualisé en vert ; les neurofilaments sont visualisés en rouge ; les noyaux des neurones s'observent en bleu par un marquage au bis-benzimide.

1.2. Construction plasmidique de GABAB1a-GFP

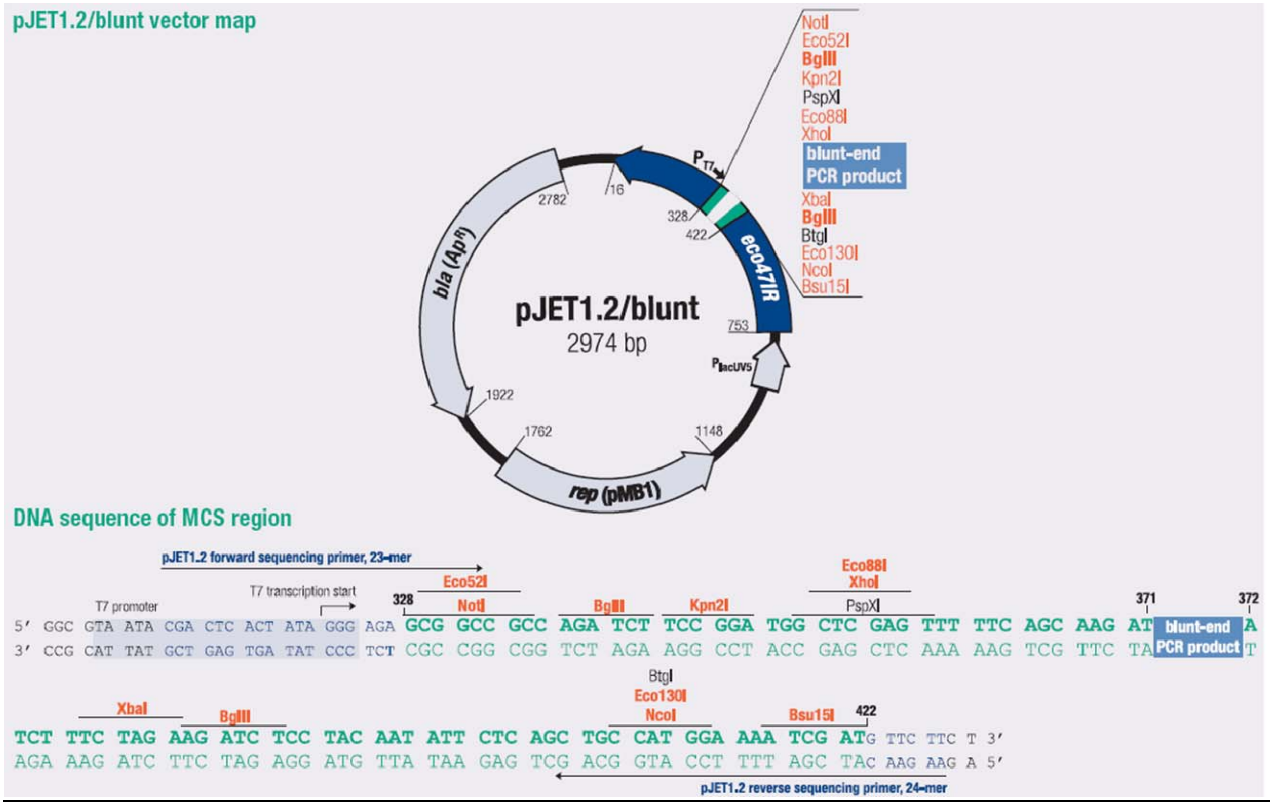
1) Clonage de B1a dans le vecteur pJET :

1.1. La Polymérase Chain Reaction (PCR) :

Le plasmide à partir duquel nous sommes partis est le plasmide GABAB1a (pcDNA3.1) à une concentration de 20ng/µL.
Les amorces (Eurogentec SA) utilisées sont conçues grâce au logiciel Perl Primer (Marshall 2004) en insérant de part et d'autre des sites de restriction :
Gabab1a_F + XhoI : GCG CGC **CTC GAG** ATG CTG CTG CTG CTG CTG GC
Gabab1a_R + EcoRI : GCG CGC **GAA TTC** CCC TCA CTT ATA AAG CAA ATG CAC TCG
Le milieu réactionnel que nous avons utilisé est le suivant : H_2O, Tampon 10X de l'enzyme, $MgSO_4$ à 50mM, dNTP à 10mM, les amorces à 10µM, l'enzyme Pfx (Proof Reading polymerase) et l'ADN plasmidique à amplifier.
La PCR comprend 35 cycles. Chaque cycle se décompose en plusieurs étapes : une étape de dénaturation du double brin d'ADN à 94°C pendant 20 sec, une étape d'hybridation des amorces à 55°C pendant 30 sec, et une étape d'élongation à 68°C pendant 8 min.
Après avoir fait migrer les produits de la PCR sur gel d'agarose, nous avons extrait et purifié l'ADN (kit *QIAEX II*, 20021, QIAGEN).

1.2. Ligation du produit PCR dans le plasmide pJET *(Rapid DNA Ligation Kit, K-1422, FERMENTAS) :*

Nous avons utilisé le vecteur de clonage pJET de façon à pouvoir plus facilement cribler les clones de bactéries. En effet, ce vecteur possède un gène létal (Eco471R) **(cf schéma ci-dessous).** L'insertion du fragment lors de la ligation décale le cadre de lecture de ce gène létal Eco471R qui ainsi ne s'exprime plus. Par conséquent, seules les bactéries ayant intégré l'insert pourront pousser sur la boite de gélose.



Ainsi, nous avons fait une ligation du produit de la PCR dans le pJET, pendant 30 min à 22°C (5X Ligation Buffer, plasmide, insert, T_4 ligase et H_2O).

1.3. Transformation de bactéries *(Library Efficiency ® DH5α ™ Competent Cells, INVITROGEN):*

La transformation des bactéries permet d'intégrer l'ADN plasmidique dans des bactéries dites « compétentes » (DH5α issues de la souche *Escherichia coli*). Du fait de leur croissance exponentielle, la culture de ces bactéries dans un milieu adapté permet de multiplier l'ADN plasmidique. Le

plasmide pJET possède un gène de résistance à l'ampicilline (bla (Ap^R)). La technique de transformation que nous utilisons est celle du choc thermique (42°C pendant 45 secondes). Les bactéries transformées sont étalées sur une boite de Pétri contenant de l'agar et de l'ampicilline, et sont incubées toute une nuit à 37°C.

1.4. Amplification par culture bactérienne de petit volume:

Afin de multiplier les clones recombinants obtenus et donc d'amplifier l'ADN plasmidique, les clones sont remis en culture dans du milieu LB (5mL) additionné d'ampicilline (5µL d'une solution à 0,1g/mL, Sigma, A-9393). Les cultures sont incubées pendant 12 heures, sous agitation à 220 rpm, à 37°C.

1.5. Extraction de l'ADN plasmidique sur faible volume de culture (Minipréparation):

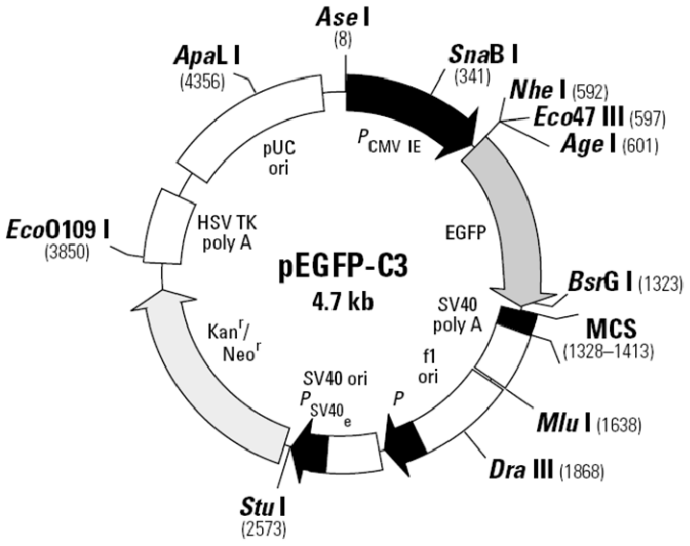
L'extraction des plasmides des bactéries et la purification de l'ADN se fait grâce au kit *E.Z.N.A ™Plasmid Miniprep* (D6943-02, OMEGA).

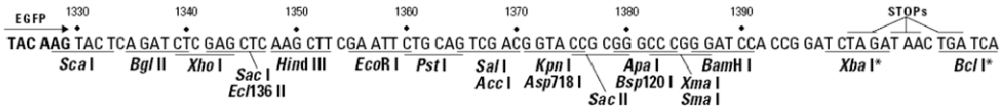
1.6. Digestion par les enzymes pour sortir l'insert B1a :

Nous avons ensuite fait une digestion avec 4 enzymes, XhoI et EcoRI pour sortir l'insert B1a, et BamHI et NotI pour couper le vecteur pJET car l'insert et le vecteur ont des poids moléculaires similaires (1µL de chaque enzyme, 4µL de buffer 10X, 4µL de plasmide et 28µL d'H_2O).
Après migration du gel d'agarose, la bande correspondant à l'insert B1a est à nouveau découpée, et l'ADN est extrait du gel et purifié (kit *QIAEX II*, QIAGEN).

2) Sous-clonage de GABAB1a dans le vecteur pEGFP-C3 :

2.1.Digestion du plasmide pEFGP-C3 :





Restriction Map and Multiple Cloning Site (MCS) of pEGFP-C3. All restriction sites shown are unique. The *Bcl* I site cannot be used for fusions since it contains an in-frame stop codon. The *Xba* I and *Bcl* I sites (*) are methylated in the DNA provided by BD Biosciences Clontech. If you wish to digest the vector with these enzymes, you will need to transform the vector into a *dam*⁻ host and make fresh DNA.

Le plasmide pEGFP-C3 est digéré par XhoI et EcoRI (1µL de pEGFP-C3, 1µL de chaque enzyme, 2µL de buffer 10X et 15µL d'H_2O). L'ADN est ensuite purifié grâce au kit *QIAEX II* (QIAEGEN).

2.2. Ligation de l'insert B1a dans le pEFGP-C3 :

Après avoir dosé le plasmide et l'insert, nous avons fait une ligation avec 0,5 µL de plasmide pEGFP-C3 (soit 50 ng) et 10 µL de B1a (soit 100 ng) dans un mélange réactionnel contenant : 5X Ligation Buffer, plasmide, insert, T_4 ligase et H_2O.

2.3. Transformation de bactéries *(Library Efficiency ® DH5α ™ Competent Cells, INVITROGEN)*:

Le plasmide pEGFP-C3 possède un gène de résistance à la kanamycine (Kan^R)). Les bactéries transformées sont étalées sur une boite de Pétri contenant de l'agar et de la kanamycine, et sont incubées toute une nuit à 37°C.

2.4. Amplification par culture bactérienne :

Afin de multiplier les clones recombinants obtenus et donc d'amplifier l'ADN plasmidique, les clones sont remis en culture dans du milieu LB (5mL) additionné de kanamycine (25µL d'une solution à 0,01g/mL, Sigma, K-3763). Les cultures sont laissées pendant 12 heures, sous agitation à 220 rpm, à 37°C.

2.5. Extraction de l'ADN plasmidique su faible volume de culture (Minipréparation) :

L'extraction des plasmides des bactéries et la purification de l'ADN se fait grâce au kit *E.Z.N.A ™Plasmid Miniprep* (OMEGA).

2.6. Digestion par les enzymes pour sortir l'insert B1a :

Le plasmide est à nouveau digéré avec XhoI et EcoRI pour sortir l'insert B1a (1µL de chaque enzyme, 2µL de buffer 10X, 3µL de plasmide et 13µL d'H_2O).

2.7. Séquençage :

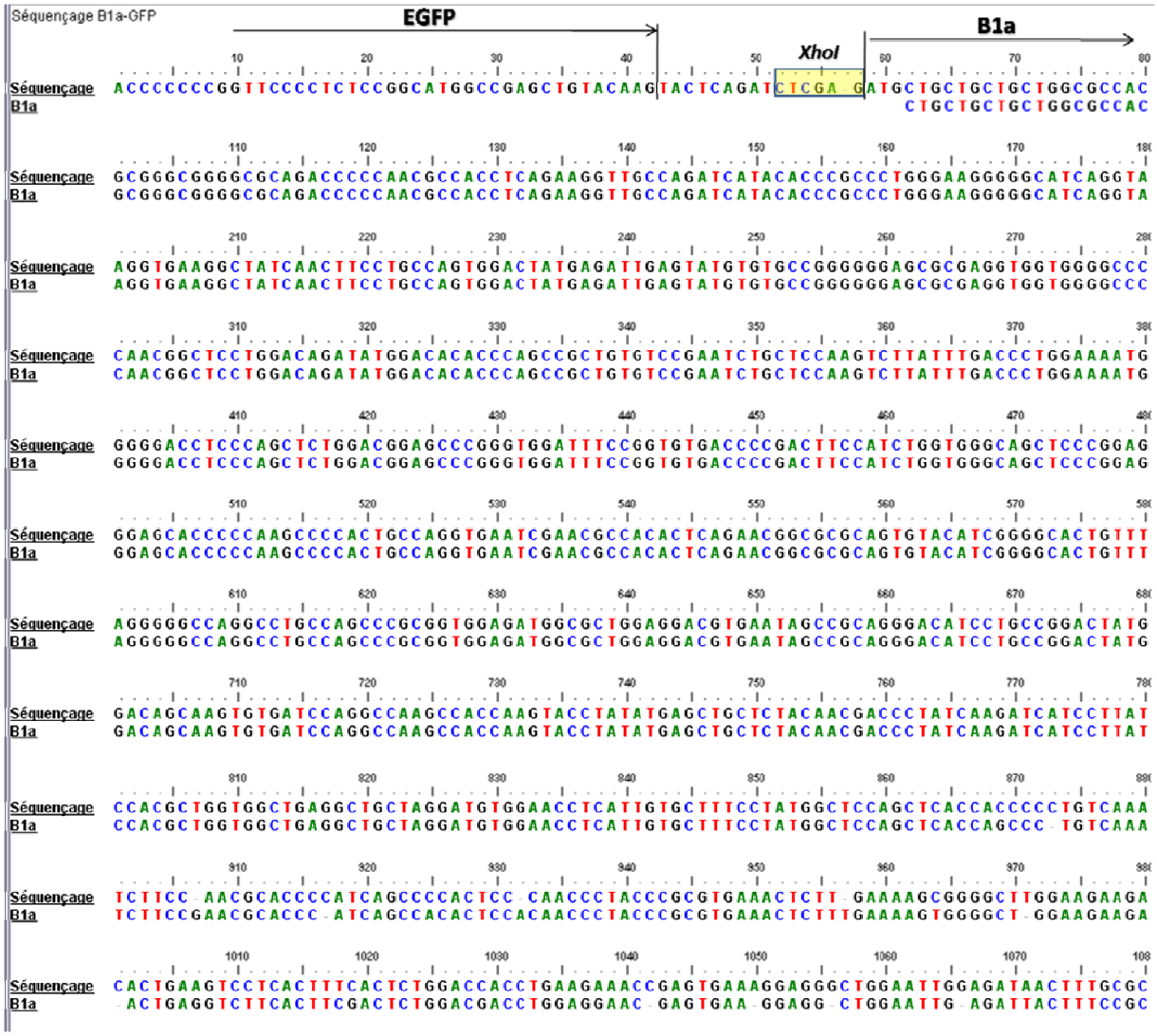
Pour confirmer notre construction, nous avons finalement séquencé notre insert afin de vérifier qu'il n'y ait aucune mutation dans le gène d'intérêt. Pour cela, les amorces utilisées, conçues grâce au logiciel Perl Primer sont les suivantes (EUROGENTEC SA):
pEGFP-C3-F : CAT GGT CCT GCT GGA GTT CGT G
pEGFP-C3-R : TTC AGG GGG AGG TGT GGG AG

2.8. Amplification par culture bactérienne de gros volume :

Le séquençage vérifié **(cf ci-dessous),** nous avons amplifié l'ADN plasmidique sur un plus gros volume. Les cultures de bactéries transformées sont en effet remis en culture dans du milieu LB (200mL) additionné de kanamycine (1mL). Les cultures sont laissées pendant 12 heures, sous agitation à 220 rpm, à 37°C.

2.9. Extraction de l'ADN plasmidique sur grand volume de culture (Maxipréparation) :

Le principe est le même que celui de la minipréparation, à savoir extraction et purification de l'ADN plasmidique à partir des bactéries, mais sur un plus grand volume. Le kit utilisé est le *QIAGEN Endofree Plasmid Maxi Kit*.



1.3 Transfection des cultures

Les ADNc GABAB1b et GABAB2 sont respectivement modifiés en N-terminal par l'addition d'un GFP introduite après l'acide aminé 61 ou un t-Dimer DsRed introduit après l'acide aminé 42 (Laffray et al. soumis). La construction $GABAB1_{ASA}$ étiquettée en C-Ter avec une GFP a été décrite par Brock et coll., 2005 (Brock et al. 2005).

Les constructions B1b et B2 étiquettées respectivement avec c-myc ou hemagglutinin (HA) sont décrites par Calver et coll., 2001 (Calver et al. 2001).

La construction plasmidique GABAB1a-GFP a été construite durant ma thèse. (cf ci-dessus, paragraphe 1.2).

La construction 14-3-3ζ étiquettée avec l'épitope Flag en N-terminal (DYKDDDDK, introduit après l'acide amine 1 de la protéine naissante) a été décrite par Truong et coll., 2002 (Truong et al. 2002).

Le vecteur d'expression de la fibuline-2 nous a été donné par T.Sasaki (EM_ROD :X75285).

1.3.1. Transfection des cultures dissociées de neurones

1.3.1.1. Transfections ADN plasmidique :

Des simples, doubles, ou triples transfections sont réalisées sur des cellules âgées d'une semaine, ensemencées à 100 000/100µL cellules, grâce à un lipide cationique, la Lipofectamine 2000 (Invitrogen 11668, Cergy Pontoise, France). Dans chaque cas, L'ADN plasmidique (400, 800 ou 900 ng/mL de plasmide final respectivement en simple, double et triple transfections) est complexé à la Lipofectamine 2000 à raison de 1 µL de Lipofectamine pour 200ng d'ADN plasmidique. Avant de déposer le complexe lipofectamine/ADN plasmidique sur les cellules, le milieu de culture est prélevé

et remplacé par 800 µL de milieu M (Neurobasal medium + 1% glutaMAX). Puis le complexe est ajouté délicatement aux cultures. Après une incubation de 45 min à l'étuve, le mélange de transfection est éliminé et remplacé par le milieu de culture initialement prélevé. Les cellules sont ensuite fixées 48 heures après la transfection.

1.3.1.2. Transfection siRNA :

Les siRNA sont transfectés 24 heures après la transfection avec les ADNs plasmidiques à raison de 1200ng siRNA/3µL of Lipofectamine 2000 pour le siRNA anti-14-3-3 et 500ng siRNA/3µL de Lipofectamine 2000 pour le siRNA anti-fibuline-2.
Le siRNA anti 14-3-3 utilisé est un pool de 4 siRNA de 20-25 nucléotides spécifiques de la cible (sc-29583, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).
Le siRNA anti-fibuline-2 utilisé est un pool de 3 siRNA de 20-25 nucléotides spécifiques de la cible (sc-43120, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).
Les mismatch RNA (mmRNA) sont des anti-sens contrôles (contrôle négatif) de 20-25 nucléotides n'ayant aucune cible spécifique (sc-37007 et sc-36869, Santa Cruz Biotechnology, resp.).
Le milieu est remplacé après 6 heures d'incubation et la fixation est effectuée environ 36 heures après la transfection de siRNA.

1.3.2. Transfection des cultures COS-7

Les cellules COS-7 sont transitoirement transfectées avec B1b-GFP, B1a-GFP, myc-B1b, HA-B2, et/ou Flag-14-3-3ζ en utilisant le Fugen6 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). Les cellules sont ensuite lysées 24 heures après la transfection.

1.3.3. Transfection des cultures organotypiques

Les cultures organotypiques sont transfectées avec la Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) à raison de 1µL pour 200ng d'ADN. Après une incubation de 45 min à l'étuve, le mélange de transfection est éliminé et remplacé par le milieu de culture initialement prélevé. Les cellules sont ensuite fixées 48 heures après la transfection.

1.4. Les peptides de compétition 14-3-3

1.4.1. Les peptides de compétition

L'hétérodimérisation GABAB1/GABAB2 fait intervenir les domaines coiled-coil de chaque sous-unité (Kammerer et al. 1999; Kuner et al. 1999). Plus précisément, les acides aminés S_{887}-L_{921} de GABAB1 sont essentiels pour leur interaction (Calver et al. 2001). Le site de fixation de 14-3-3ζ sur GABAB1 chevauche partiellement le domaine d'interaction entre GABAB1 et GABAB2. La région de GABAB1 impliquée repose sur les acides aminés E_{905}-P_{928} et peut probablement s'étendre jusqu'à l'acide aminé K_{960} (Couve et al. 2001; El Far and Betz 2002). Basé sur ces données, des petits peptides de compétition spécifiques du site d'interaction de 14-3-3ζ (mais pas de GABAB2) sur GABAB1 ont été synthétisé en collaboration avec le laboratoire du professeur Ulo Langel (Dpt of Neurochemistry, university of Stockholm, cf Annexe 2). Pour faciliter leur internalisation, les peptides de compétition ont été modifiés soit par couplage à des acides aminés chargés positivement tels que des lysines ou arginines (Wender et al. 2000), soit par couplage à un peptide de type « cell penetrating peptide » (CPP) appelé pVEC, dérivé d'une molécule d'adhésion cellulaire, la cadhérine endothéliale vasculaire (Elmquist et al. 2001). Toutes les constructions utilisées dans cette étude sont présentées dans le **tableau 01**:

Full name	Sequence	M.W. (g/mol)
pVEC	(Fluo)-LLIILRRRIRKQAHAHSK -amide	2569
B1 (919-927)	(Fluo)-QQLRSRRHP-amide	1535
Arg-Arg-Lys-Arg-B1 (919-927)	(Fluo)-RRKRQQLRSRRHP-amide	2131
B1 (922-930)	(Fluo)-RSRRHPPTP-amide	1461
Arg-Arg-Lys-Arg-B1 (922-930)	(Fluo)-RRKRRSRRHPPTP-amide	2057
pVEC-B1 (919-927)	(Fluo)-G-Cys-G-QQLRSRRHP-amide | S-S | Cys-LLIILRRRIRKQAHAHSK -amide	4060
pVEC-B1 (922-930)	(Fluo)-G-Cys-G-RSRRHPPTP-amide | S-S | Cys-LLIILRRRIRKQAHAHSK -amide	3986

Tableau 01: Séquence d'acides amines et poids moléculaire des différents peptides testés.

1.4.2. Internalisation des peptides

Internalisation des peptides fluorescents:

Les tests d'internalisation des peptides sont décrits d'après Holm et al., 2006 (Holm et al. 2006). Une solution d'HKR (5mM HEPES, 137mM NaCl, 2.68mM KCl, 2.05mM $MgCl_2$, 1.8mM $CaCl_2$ and 1g/L glucose) a été utilisée pour laver les cellules et pour diluer les peptides. Tous les peptides fluorescents (Fluo-peptides), décrits dans le tableau 01 ont été testés.

Microscopie confocale

Brièvement, des cultures âgées d'une semaine, ayant une densité de 150,000/100µL, sont lavées et incubées, pendant 1 ou 2 heures avec des concentrations différentes de peptides fluorescents (0.1; 1 ou 5µM) à 37°C ou à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées à nouveau puis fixées ou non pendant 20 min à 37°C dans un tampon phosphate (PB) avec 4% de saccharose (w/v) et 4% de paraformaldéhyde (w/v) (PFA 4%)

Quantification de l'internalisation des peptides fluorescents par fluorométrie

Ces expériences sont réalisées sur des lamelles ensemencées à 800,000/100µL et âgées d'une semaine. Les cellules sont lavées puis incubées avec 5µM de peptides fluorescents pendant 1 heure à 37°C ou à 4°C, puis sont lavées à nouveau. Les cellules sont ensuite détachées par un traitement à la trypsine (0,25%) pendant 10 min à 37°C et sont centrifugées à 3000g, pendant 5 min à 4°C. Le culot est ensuite lysé avec du tampon CHAPS pendant au moins une heure à 4°C et le lysat cellulaire est à nouveau centrifugé à 10 000g pendant 1 minute à 4°C. L'intensité de la fluorescence du surnageant est mesurée à 485 nm par un spectrophotomètre fluorescent, pour les cellules traitées, les cellules non traitées (pour enlever le bruit de fond) et pour les solutions d'expositions (solution originale de peptide diluée au 1/10 dans du tampon CHAPS). La quantité de protéines est déterminée pour chaque lysat cellulaire par la méthode de Lowry (Lowry et al. 1951), d'après une courbe standard de protéines BSA (Sigma). L'absorbance est mesurée à 655 nm par un Microplate Reader. Les résultats sont exprimés par une

moyenne (picomoles de peptides par milligramme de protéines totales) ± SEM de trois expériences indépendantes. Chaque mesure est dupliquée.

Internalisation des peptides fluorescents après inhibition de l'endocytose

Les cultures âgées de 8 jours, ensemencées à 150,000/100µL, sont lavées, traitées pendant une heure avec 1µM de peptides-fluorescents à 37°C ou à 4°C, et lavées deux fois par la suite. Les cellules osnt incubées avec 150nM de Wortmaninn (Sigma) à 37°C pendant 15 min. La détection du noyau se fait par incubation de biz-benzimide (1/6000, Sigma). Les cultures sont finalment montées sur des lames en verre avec un milieu de montage DakoCytomation Fluorescent (Dako SA, Trappes, France) et observées sur un microscope confocal inversé Leica TCS SP2 (Leica, Mannheim, Allemagne). La fluorescéine est excitée avec un laser argon à 488nm ; la biz-benzimide avec un laser bi-photon à 700nm. Une acquisition séquentielle d'images simples optiques sur des lamelles doublement marquées a été réalisée.

Cytotoxicité des peptides:

Brièvement, des cultures âgées d'une semaine, ayant une densité de 80,000/100µL, sont lavées et incubées, pendant 1 ou 2 heures avec 5µM de peptides fluorescents à 37°C. L'activité de la Lactate Déshydrogénase (LDH) est mesuré dans le surnageant des cultures par une simple mesure à un temps identique pour toutes les conditions avec le Kit de Détection de Cytotoxicité (Roche Apllied Biosystems). Le relargage maximal de LDH est indiqué par l'incubation de 2% Triton X-100 et est utilisé pour normaliser les données.

1.5. Immunohitochimie anti-syntaxine sur cultures dissociées de neurones corticaux

Pour confirmer que la dé-dimérisation affecte seulement des hétérodimères GABAB déjà insérés à la membrane plasmique, nous avons réalisé une expérience de FRET à la membrane plasmique, sur des hétérodimères déjà insérés à la membrane avant la surexpression de 14-3-3ζ. Pour cela, nous avons effectué des transfections séquentielles, et utilisé la toxine Botulinique de type C (Botox), capable de bloquer la fusion des vésicules sécrétoires, et par conséquent de bloquer l'insertion d'hétérodimères nouvellement synthétisés.(Lang et al. 1997; Laffray et al. 2007). Afin de s'assurer que la Botox est bien transfectée avec B1b-GFP et B2-DsRed, nous avons regardé la disparition de la syntaxine par immunohistochimie, car elle est en effet une cible de la Botox.

Les neurones sont tout d'abord transfectés avec B1b-GFP et B2-DsRed. Après 12h, la construction Botox est aussi transfectée dans les mêmes cultures. Puis, après encore 12h, l'immunohistochimie anti-syntaxine est réalisée. Les neurones de cortex en culture sont fixés pendant 20 min à 37°C (4% paraformaldéhyde et 4% saccharose dans 0,4M de tampon phosphate, pH 7,4). Ensuite les cultures sont lavées (PBS 0,1M, 10 min à RT) et sont perméabilisées 10 min dans du TNT à RT. Puis, elles sont saturées avec du TNT/BSA 1% (30 min à RT). Elles sont ensuite incubées toute la nuit à +4°C avec l'anticorps primaire anti-syntaxine (1:200, anticorps de souris, Sigma) dilué dans du TNT/BSA 1%. Après trois lavages de 10 min avec le TNT, les cultures sont ensuite incubées avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à un AlexaFluor 647 (1:1000 dans du TNB, 30 min à RT). Après rinçage, elles sont incubées 1 min à RT avec la Biz-Benzimide (1:6000 dans du TNT) pour le marquage des noyaux. Enfin, après rinçage au TNT, les lamelles de cultures sont montées sur lames avec du liquide de montage (Fluorescent Mounting Medium Dako Cytomation) et observées sur un microscope confocal Leica TCS SP2 (Mannheim, Germany).

Parallèlement à cette immunohistochimie anti-syntaxine, des cultures sont tranfectées 12h après la Botox avec la protéine 14-3-3ζ. De nouveau après 12h, les cellules sont fixées et des mesures de FRET/FLIM à la membrane sont effectuées (cf ci-desssous).

1.6 Etude d'interaction

1.6.1 Méthode biochimique (co-immunoprécipitation)

Les cellules COS-7 sont transitoirement transfectées avec B1b-myc, B1b-GFP, B2-HA et/ou 14-3-3ζ-Flag en utilisant le FuGene6 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). Les cellules COS-7

sont lavées dans du PBS 0,01M froid. Elles sont ensuite lysées dans du tampon CHAPS (25mM HEPES, 150mM NaCl, 1% CHAPS, et inhibiteurs de protéases) avec 1 mM de DSP (Dithiobis [succinimidylpropionate]) permettant de lier les groupements amines libres de protéines physiquement très proches (liaison NHS-ester). Le produit de la lyse est récupéré puis est laissé sur une roue tournante pendant 1h à 4°C afin que les protéines membranaires soient solubilisées. Après centrifugation pendant 10 min à 13000 rpm, le surnageant est récupéré (L). Le lysat est immunoprécipité avec 2,5µg d'anticorps anti-Flag (Sigma), anti-14-3-3 (TEBU-Sc-1019), anti-myc (Roche), anti-HA (Roche), anti-GFP (Sigma) ou anti-Raf (BD Bioscience Pharmingen, Franklin Lakes, NJ), toute une nuit à 4°C, suivi par une incubation avec 50µL de billes de Sepharose couplées à des protéines G (Amersham Biosciences) ou de billes d'agarose anti-souris IgG (Sigma A6531) pendant 1 heure à 4°C. Les échantillons sont ensuite centrifugés (5min, 5000 rpm) et le surnageant contenant les protéines non liées est récupéré (S). Après plusieurs lavages, les protéines liées aux billes sont éluées (IP).
La co-immunoprécipitation est ensuite détectée par Western-Blot. Les protéines sont séparées par électrophorèse sur des gels SDS-PAGE à 10%. Les protéines totales, les protéines immunoprécipitées, et les protéines du surnageant sont marquées en tant que lignes L, IP et S respestivement. Les protéines sont transférées, marquées avec un anticorps anti-Flag (1/1000, souris), un anti-14-3-3 (1/1000, lapin), un anti-myc (1/1000, souris), un anti-Raf (1/1000, souris), ou un anti-HA (1/1000, souris). Les anticorps secondaires sont des anti-souris (Dako P0447, chèvre) ou anti-lapin (Dako P0399, porc) couplés à une peroxydase (1/1000). Les membranes sont ensuite visualisées avec un kit de détection ECL (Amersham^{TM}, RPN2132). L'observation de la membrane se fait en chimioluminescence.

1.6.2 Méthode biophysique (FRET/FLIM)

Pour les expériences de FRET, les neurones en culture ont subi différents traitements 48h après la transfection, avant l'étape de fixation des cellules. Les cellules ont été traitées pendant 1 heure avec 5µM de peptides de compétition non fluorescent (pVEC-GABAB1R (919-927) et pVEC-GABAB1R (922-930)) comme décrit précédemment, ou avec 25nM ou 50nM de protéine fibuline-2 pendant 15 min ou 1 heure, à 37°C. Puis, les neurones ont été traités pendant 30 min à 37°C avec des agonistes du récepteur GABAB tels que le baclofène (de 10^{-3}M à 10^{-9}M, Sigma B5399), ou le GABA (10^{-4}M, Sigma A5835) ; ou avec des antagonistes compétitifs (simultanément avec le baclofène) tels que le CGP55485 (5.10-7M ou 50µM, Tocris 55845) ou le Saclofen (100µM ou 1mM, Sigma S166). Les neurones ont été ensuite fixés 20 min à 37°C (4% paraformaldéhyde et 4% saccharose dans 0,4M de tampon phosphate, pH 7,4), rincés (0,1M PBS, 10 min à RT) et les lamelles ont été montées (Fluorescent Mounting Medium Dako Cytomation).

Grâce au déclin mono-exponentiel de la GFP et à leur spectre de comptabilité, le couple GFP-DsRed est utilisé pour les études quantitatives de FRET/FLIM. Le t-dimer DsRed est un tandem de protéines fluorescentes monomériques qui mature rapidement, ne forme pas d'agrégat, et a une émission minimale quand il est excitée à 900 nm, longueur d'onde optimal pour la GFP et minimisant l'excitation du t-dimer DsRed (cf Annexe 3).

La technique de FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Measurements) consiste à mesurer la durée de vie de fluorescence émise par le fluorophore donneur (GFP) couplé à GABAB1 (cf Annexe 3). Le FLIM est effectué avec la méthode TCSPC (Time-Correlated Single Photon Counting) sur un microscope confocal multiphoton (SP2 AOBS Leica) en utilisant un objectif HC Plan Apo CS 63X huile NA 1.32 (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). La source de lumière pulsée est un laser Ti:Sapphire (Chameleon, Coherent Laser Group, Santa Clara, CA, USA). La longueur d'onde utilisée pour exciter la GFP est de 900nm. La fréquence du laser est de 80 MHz, ce qui donne une fenêtre de temps de 13 ns pour les mesures de durée de vie. Le système est équipé d'un TCSPC de Becker et Hickl (Berlin, Germany) qui comprend un détecteur PMC-100. Un filtre 510/40 band-pass (Chroma

Technology, Rockingham VT, USA) est utilisé pour détecter spécifiquement la fluorescence du donneur. Les courbes de fluorescence sont obtenues en utilisant le mode « single plot » du logiciel SPCM (Becker and Hickl). L'efficacité de FRET relative est calculée pour chaque acquisition comme :

Efficacité de FRET (%) = $(\tau_{Dmean}-\tau_{DA})/\tau_{Dmean}$ x 100 où τ_{Dmean} est la durée de vie moyenne du donneur GFP exprimé seul et τ_{DA} est la durée de vie de la GFP en présence de l'accepteur, DsRed. Les résultats sont exprimés en tant qu'efficacité de FRET moyenne.

Les acquisitions sont réalisées sur des régions définies du neurone, correspondant à la membrane plasmique **(Figure 2).** En effet, les effets de l'agoniste baclofène ne sont pas détectables lorsque les acquisitions sont faites en mode « single plot » sur la cellule entière.

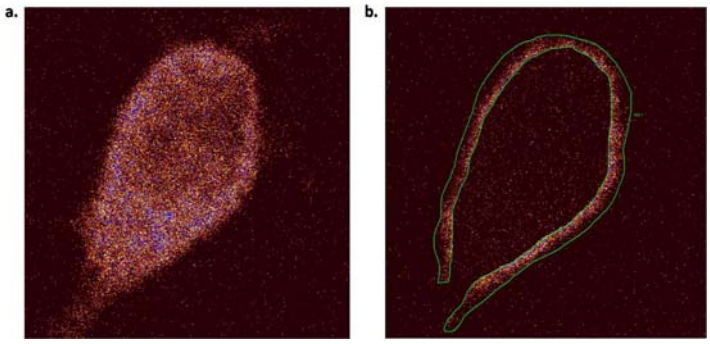


Figure 2 : (a) Image d'un corps cellulaire d'un neurone transfecté avec B1a-GFP et B2-DsRed **(b)** Région d'intérêt définie sur la membrane plasmique pour acquisition FRET/FLIM.

1.7 Etude dynamique de la localisation (vidéo-microscopie FRAP)

Les expériences de FRAP sont réalisées sur des lamelles ensemencées à 800,000/100µL et âgées d'une semaine. Les cultures de neurones transfectées avec B1a-GFP, B2-DsRed ± fibuline-2 sont traitées ou non avec le baclofène (1µM dilué dans du HKR : 5mM HEPES, 137mM NaCl, 2.68mM KCl, 2.05mM $MgCl_2$, 1.8mM $CaCl_2$ and 1g/L glucose), 30 min avant l'expérience de FRAP. Les lamelles sont ensuite montées dans des chambres fermées contenant le même milieu. Durant toute l'expérience, la culture est maintenue à 37°C sur un microscope inversé Leica DMI 6000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Ce microscope est équipé d'un laser Sapphire à 200mw (Coherent Laser Group, Santa Clara, CA, USA) utilisé à une longueur d'onde de 488nm, d'un système scanner FRAP et d'une caméra Quantem (Roper Scientific, Evry, France). Les objectifs utilisés sont : HCX PL Fluotar 40X huile 1.25 NA ou HCX PL APO CS 63X huile 1.32 NA ou HCX PL APO CS 100X huile 1.4 NA. Une région d'intérêt (« Diffracted limited region ») faite sur le neurone exprimant B1a-GFP est photoblanchie pendant 5 msec. La récupération de la fluorescence est ensuite enregistrée pendant 80 sec. Des images sont acquises toutes les 100 msec en mode streaming. Elles sont corrigées du photoblanchiment continu et du bruit de fond à l'aide du logiciel Metamorph. Elles sont ensuite normalisées par rapport à la fluorescence avant le photoblanchiment. Les résultats représentent 13 à 18 neurones pour chaque condition.

1.8 Electrophysiologie Patch Clamp

1.8.1. Préparation du poste

Les lamelles rectangulaires (12 x 24 mm, Deckglaser) de cultures de neurones de moelle épinière, non transfectées (conditions contrôles) ou transfectées avec un siRNA anti-fibuline-2 (sc-43120, Santa Cruz Biotechnology), avec un mmRNA (sc-37007, Santa Cruz Biotechnology), ou avec la Lipofectamine 2000 seule (Invitrogen 11668), ont été transférées dans une chambre d'enregistrement perfusée en continu avec du Fluide Cérébro-Spinal Artificiel (ACSF : 130,5mM NaCl ; 2,4mM KCl ; 2,4mM $CaCl_2$; 19,5mM $NaHCO_3$; 1,3mM $MgSO_4$; 1,2mM KH_2PO_4 ; 1,25mM HEPES ; 10mM glucose, 32°C, pH 7,4, équilibré avec 95% O_2 et 5%CO_2) pendant 15 min avant la réalisation des enregistrements. Les expériences ont été conduites avec le système Axon Instruments (Axoclamp 2B, Digidata 1200, pClamp 7, Axon Instruments). Les neurones ont été visualisés par vidéo-microscopie

infrarouge en contraste interférentiel-différentiel en utilisant un microscope équipé d'une caméra CCD. Les neurones ont été enregistrés en configuration cellule entière et en mode voltage imposé (0pA, mode bridge) en utilisant des pipettes de patch (9-12 MΩ, GC150TF-10, No 30-0066, 1,5 mm, O.D x 1, 17 mm I.D, Harvard Apparatus) remplies avec du milieu intracellulaire artificiel (120mM potassium gluconate ; 20mM KCl ; 0,1mM $CaCl_2$; 1,3mM $MgCl_2$; 1mM EGTA ; 10mM HEPES ; 0,1mM GTP ; 0,2mM cAMP ; 0,1mM leupeptine ; 3mM Na_2-ATP et 77mM D-mannitol, pH 7,3).

1.8.2. Pharmacologie et analyse des données électrophysiologiques

Au cours de ces expériences, on se place en mode «voltage clamp ou potentiel imposé». Le potentiel de membrane est maintenu à une valeur constante (-55mV) pour enregistrer les courants postsynaptiques excitateurs miniatures, ou mEPSCs. En circuit ouvert, on perfuse la préparation avec 1µM de TTX (Sigma T8024) pendant 10 min. Puis en circuit fermé, dans une autre éprouvette, 10 µM de baclofène (Sigma B539) est appliqué sur les neurones durant 10-15 min. A ce même tube sont ajoutés ensuite 100 µM de Saclofen (Sigma S166), l'effet sur les mEPSCs est enregistré pendant 10-15 min. Puis 50 µM de CGP55845 (Tocris 5584) est ajouté et l'effet est à nouveau enregistré pendant 10-15 min. Les différentes drogues sont diluées dans la solution TTX. Les mEPSCs ont été détectés avec le logiciel Mini Analysis (Synaptosoft) sur une période de 2 min. Au cours des expériences, la résistance d'accès est compensée et régulièrement mesurée. Toutes les cellules présentant une variation de cette résistance supérieure à 10% sont éliminées.

2. Etudes in vivo

2.1 Animaux et chirurgie

2.1.1. Animaux et éthique :

Des rats mâles Wistar (225-275g) (Charles River France, St Aubin les Elbeuf, France) ont été utilisés dans cette étude. Les animaux ont été maintenus dans une pièce tempérée, avec un cycle jour/nuit de 12 h et un accès libre à l'eau et à la nourriture. Les expériences ont suivi les recommandations de l'International Association for the Study of Pain (IASP) et du comité d'éthique local de Bordeaux (AP 1/04/2005).

2.1.2. Procédure du SNL :

Cette procédure est réalisée selon l'article princeps (Kim and Chung 1992) et a été approuvée par le comité d'éthique locale. L'anesthésie est obtenue par inhalation d'halothane (Belamont, Neuilly/Seine, France), dans un mélange oxygène/protoxyde d'azote (1:1 en flux). L'halothane est délivré à 5% en chambre pour l'induction, puis à 2% au masque pour l'entretien de l'anesthésie. La récupération d'activité est totale 20 min après la fin de l'anesthésie. L'intervention est réalisée sur un animal couché sur le ventre. Un microscope chirurgical permet d'obtenir un grossissement allant de 6,4X à 16X. L'animal est tondu en préopératoire. Une incision verticale médiane est réalisée à l'aplomb des vertèbres lombaires. L'incision de l'aponévrose des muscles para-vertébraux est décalée latéralement sur la droite. On dissèque dans l'espace compris entre le rachis en dedans et l'aile iliaque en dehors. Le processus transverse de L6 est isolé, puis sectionné à la pince gouge. Sous ce processus, on trouve la racine L6, et légèrement au dessus et latéralement, L5. Les deux sont liées en dehors du ganglion rachidien dorsal, par une ligature serrée d'un monofil 7/0 non résorbable (Prolène, Ethicon, Neuilly/Seine, France). La fermeture cutanée se fait avec des agrafes de Mitchel. Des animaux opérés dans les mêmes conditions, avec exposition du nerf, mais sans la lésion nerveuse, ont été nommés « Shams ».

2.1.3. Injections intrathécales

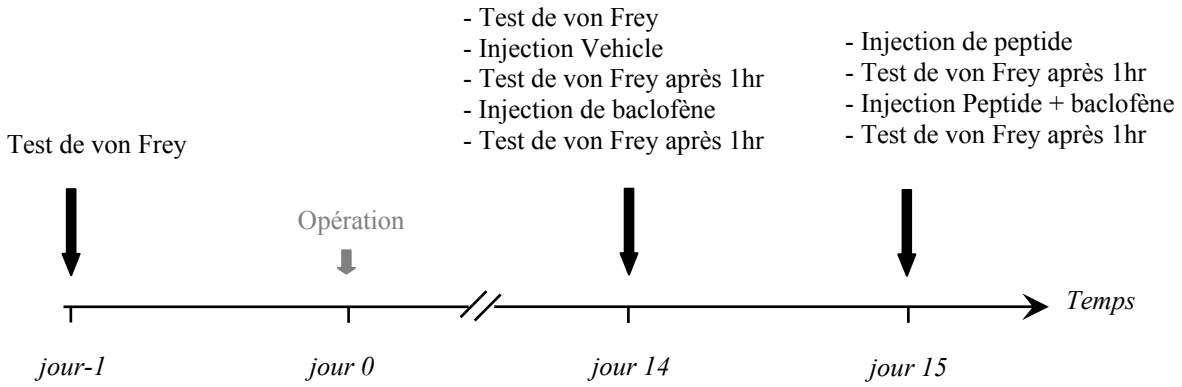
Pour les injections intrathécales de baclofène, d'ARNs (siRNA ou mmRNA), ou de peptides, les animaux Sham et SNL sont implantés avec un cathéter (PE-10; Phymep, France) inséré dans l'espace subarachnoide. L'embout est inséré jusqu'à la région L4-L5. La portion externe du cathéter est placé sous la peau jusqu'au cou (Jasmin et al. 2001). Les injections sont réalisées à l'aide d'une seringue

Hamilton. Les drogues sont délivrées dans 10µL de solution immédiatement suivi par 15µL de sérum physiologique afin de pousser la drogue jusqu'à la moëlle.

Injections de peptides de compétition et de baclofène:

Nous avons tout d'abord testé les effets d'une injection de solution saline (« Vehicle » sur le graphe) et nous avons mesuré le comportement allodynique avec le test de von Frey, 1 heure après l'injection. Nous avons ensuite testé l'effet de l'injection du baclofène (1µg dans 10µL, Sigma B5399) et la réponse comportementale associée. Le jour suivant, (jour 15), nous avons testé les effets des peptides seuls (non-fluorescent pVec-GABAB1R (922-930) et pVEC seul) ou avec le balofène. La solution de peptide est préalablement préparé à 5µM. Le comportement allodynique est mesuré 1 heure après chaque injection. Les résultats comportementaux sont présentés en pourcentage du seuil mécanique obtenu le jour avant opération (% du jour -1).

Le schéma expérimental est présenté ci-dessous:

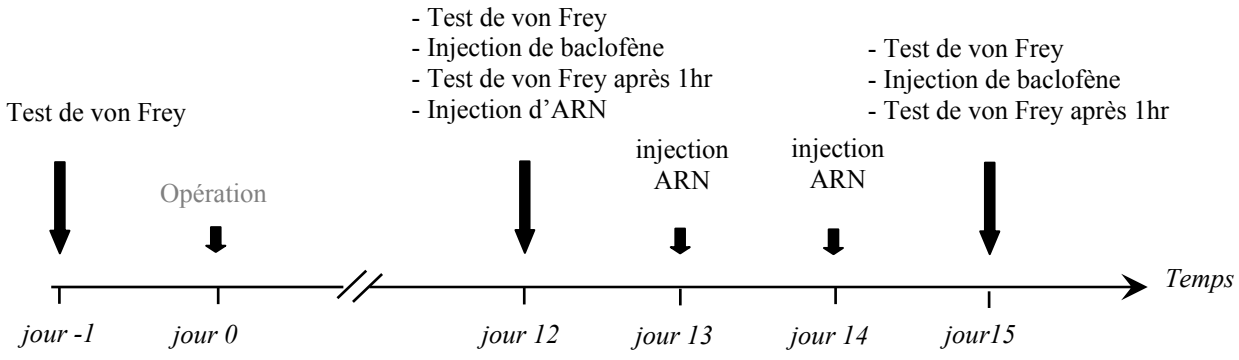


Injection d'anti-sens (siRNAs ou mmRNAs) et de baclofène:

Les rats sont testés pour l'allodynie mécanique avant opération (jour-1, valeur de référence mise à 100%).Le seuil de stimulation mécanique est monitoré chez les animaux Sham et SNL 12 jours après opération (jour 12), 1 heure après injection de baclofène (1µg dans 10µL, Sigma B5399) le même jour (jour 12 baclofène), et le jour 15 après injection de siRNA anti-14-3-3, de siRNA anti-fibuline-2 ou de mmRNA (jour 15, ARN) et finalement, après injection de baclofène le même jour (jour 15, ARN + baclofène)

Les siRNA anti-14-3-3 et anti-fibuline-2 (siRNA) et les anti-sens contrôles (mmRNA) sont injectés quotidiennement du jour 12 au jour 14 (2µg dans 10µL de I-Fect) selon un protocole publié (Luo et al., 2005) et les instructions Neuromics (Neuromics, Northfiels, MN).

Le schéma expérimental est présenté ci-dessous:



Les effets de l'injection du Saclofen (30µg) et du CGP55845 (10µg) sur l'allodynie mécanique sont aussi testés avant et après injection de RNAs. Ces derniers sont injectés en intrathécal selon le même schéma expérimental décrit ci-dessus, 10 min avant l'injection de baclofène.

2.2 Test de comportement de Von Frey

Afin de s'assurer de l'induction d'une douleur neuropathique, nous avons évalué l'allodynie mécanique statique par un test de Von Frey. Dans une cage munie d'une grille, on exerce une pression au niveau de la zone plantaire de l'animal avec une pointe en plastique reliée à un dynamomètre (Biosed, Fance), jusqu'à obtenir un retrait de la patte. Ceci représente une alternative à l'utilisation des filaments de von Frey pour mesurer le réflexe de retrait de la patte (Kalmar et al. 2003; Lever et al. 2003). Le retrait de la patte indique le seuil de pression (exprimé en mN) qui n'est plus supporté par l'animal lorsqu'il est en appui quadripodal. Ces tests on été réalisés en préopératoire, 9 à 14 jours après la ligature nerveuse et plus tard en cas de traitement intrathécal. Cinq à six mesures espacées de 2 min sont réalisées sur un animal détendu, après 10 min dans la cage, puis les valeurs ont été moyennées. Nous avons toujours testé le membre postérieur droit, celui qui sera ensuite opéré. Chaque animal étant son propre témoin. Le rat est considéré comme neuropathique lorsque la pression maximale moyenne à appliquer a diminué d'au moins 40 pour cent après l'opération comparé à J-1 avant opération **(Figure 3).** La pièce dédiée à cet usage est calme et tempérée.

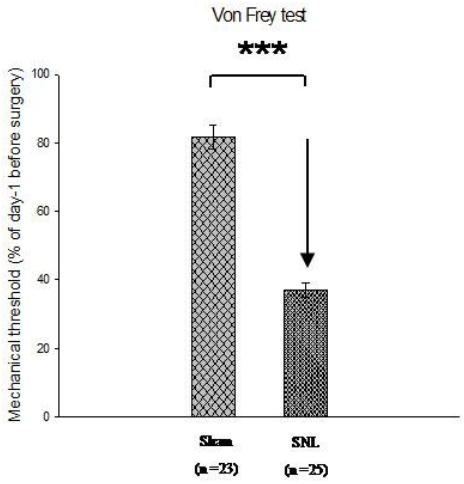


Figure 3 : Le modèle neuropthique SNL (Kim and Chung 1992) entraîne une diminution significative du seuil de retrait de la patte chez les animaux SNL comparé au seuil avant opération.

2.3 Etude de la variation d'expression des transcrits (qRT-PCR)

Les amorces utilisées pour amplifier les séquences d'ARNm de GABAB1a, GABAB1b, GABAB2, fibuline-2 (ou fbln2), fibuline-1 (ou fbln1), 14-3-3ζ, CHOP (ou GADD153) et SDHA (Succinate Deshydrogénase complex subunit A) ont été choisies à l'aide du logiciel PerlPrimer **(Tableau 2)**. Une réaction de PCR quantitative réalisée sur cinq concentrations d'ADN complémentaire (ADNc) (20, 10, 4, 0.8, 0.16 ng/µL) issu de rats naïfs a permis de valider (absence de produits de PCR non spécifiques) et de calculer l'efficacité de chaque couples d'amorces : $E = 10^{-1/pente}$ (nombre de cycles en fonction du logarithme de la quantité d'ADNc utilisée). Seulement ceux présentant une efficacité entre 90 et 110% ont été conservés

Amorces	Sens	Anti-sens
GABAB1a:	5' CCA GAT TAT ACA TCC GCC CT	5' ATC TCA TAG TCC ACA GGC AG
GABAB1b:	5' GCT GGG GTG GCT CCG GTG T	5' CAG CGC CCC GAT GTA TAC TG
GABAB2:	5' GAG AAG ACC ACA TAC ATC AAA CAG	5' TTT CCT CCA TCT GTG CTC TC
14-3-3ζ:	5' ACA TCT GCA ACG ACG TAC TG	5' CTG GCT GCG AAG CAT T
Fibuline-1:	5' GAG TGT GCT AAC GTC TAT GG	5' ACT CAT CAA TAT CTT CGC AGG

Fibuline-2:	5' AAT GCG TGG ATG TGA ATG AG	5' GGG AGG TTG TAA CAC AAT TGG
CHOP:	5' AAG CCT GGT ATG AGG ATC TG	5' TGA TTC TTC CTC TTC GTT TCC
SDHA:	5' TGC GGA AGC ACG GAA GGA GT	5' CTT CTG CTG GCC CTC GAT GG

Tableau 2: Différents couples d'amorces choisies à l'aide du logiel PerlPrimer.

2.3.1 Synthèse d'ADN complémentaires à partir des ARNm :

La partie lombaire de la moelle épinière a été prélevée et les cornes dorsales ipsi-et contralatérale ont été disséquées. Les tissus ont été broyés et lysés dans 1 mL de TRI REAGENT (Sigma T 9424) et les ARN totaux ont été extraits selon la technique du phénol chloroforme. La quantité d'ARN et la pureté (ratio A^{260}/A^{280}) ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre.
La synthèse d'ADNc a été réalisée à l'aide du kit SuperScript™ III First-Stand Synthesis System [Invitrogen].

2.3.2. PCR quantitative (qPCR) :

La PCR quantitative en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent, le SYBRGreen, dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité de produits PCR générés pendant la réaction. La PCR commence par une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 min, puis se poursuit par 40 cycles d'amplification. Chaque cycle se décompose en deux étapes : une étape de dénaturation à 95°C pendant 20 secondes suivie d'une étape d'hybridation des amorces/élongation à 61°C pendant 35 secondes. La mesure de fluorescence est réalisée à la fin de l'élongation et la quantification repose sur le concept de « threshold cycle » (Ct) où le Ct correspond au plus petit nombre de cycles pour lequel l'intensité du signal fluorescent est supérieure au bruit de fond. La réaction s'effectue dans des plaques de 96 puits à l'aide de l'appareil Opticon 2 [MJ Research] ; chaque puits contient un couple d'amorces, l'ADNc (5ng) et le mélange réactionnel nécessaire à l'amplification.

2.3.3. Analyse des résultats :

Dans un premier temps, le ΔCt correspondant à la différence entre la moyenne du Ct du gène d'intérêt et du gène de référence (SDHA) a été calculé. ΔCt = moy Ct gène d'intérêt – moy Ct SDHA
Ce gène de normalisation est exprimé de façon constitutive et son expression ne varie pas en fonction de nos conditions expérimentales. Puis, nous évaluons les modifications d'expression relative entre les différentes conditions par le calcul suivant :
ΔΔCt = ΔCt SNL - ΔCt Sham
Le facteur de variation entre les deux conditions est mesuré par la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak et al. 2001).

2.4 Etude de la localisation

2.4.1 IHC en optique sur coupes flottantes et quantification

Cette technique d'analyse morphologique des tissus utilise la grande spécificité des anticorps. Elle permet de révéler la présence d'une molécule immunogène grâce à un anticorps produit contre cette molécule d'intérêt.

Préparation des tissus

Les rats sont profondément anesthésiés avec du pentobarbital de sodium (75mg/kg en intrapéritonéale) et perfusés *via* l'artère aorte ascendante avec une solution physiologique froide (210mM Sucrose, 2,5mM KCl, 25mM $NaHCO_3$, 1mM NaH_2PO_4, 8mM $MgSO_4$, 10mM glucose) (pH 7,4) (Fiala et al. 2003) préalablement oxygénée pendant une heure, puis avec une solution froide de fixation contenant 4% de paraformaldéhyde et 0,2% d'acide picrique dans du PBS 0,4M (pH 7,4). La moelle épinière

lombaire est rapidement prélevée et immergée dans la même solution de fixation pendant 2 heures puis rincée pendant 24 heures dans du PBS 0,1M (pH 7,4) contenant 12,5% de sucrose et 0,01% d'azide de sodium. La moelle épinière est congelée dans le tissu-tek, avec de l'isopentane à -60°C, en orientant les lames dans l'axe rostro-caudal. Puis des coupes flottantes transversales (30µm) ont été réalisées grâce à un cryostat à -20°C et sont ensuite conservées jusqu'à utilisation à -80°C dans une solution de PBS 0,1M contenant 25% de sucrose et 10% de glycérol.

Immunohistochimie sur coupes flottantes de moelle épinière :

Les coupes flottantes provenant d'animaux Sham et neuropathiques sont rincées avec du PBS 0,1M puis perméabilisées 10 min à température ambiante (RT) dans du TNT (0,1M Tris, 0,15M NaCl, 0,3% Triton). Puis les coupes sont saturées avec du TNT/BSA 1% (30 min à RT). Elles sont ensuite incubées toute une nuit à 4°C avec les anticorps primaires dilués dans du TNT/BSA1% : anti-14-3-3ζ (1/100 ; anticorps de lapin, Santa cruz, sc-1019) ; anti-synaptophysine (1/500, anticorps de souris, Chemicon, MAB5258) ; anti-GAD65 (1/500, anticorps de souris, Chemicon, MAB351R), anti-VGlut1-2 (1/5000 et 1/500 resp., anticorps de cochon d'Inde, Chemicon AB5905 et AB5907) ; anti-CGRP (1/1000, anticorps de lapin, Peninsula, T4032 ou anticorps de souris, Ozyme MA1-20209) ; anti-GABAB2 (1/500, anticorps de cochon d'Inde, Chemicon, AB5394, Temecula, CA), anti-GABAB1b (1/500, anticorps de chèvre, Glaxo), anti-GABAB1a (1/20 000, anticorps de mouton, Glaxo) ; anti-fibuline2 (1/400, anticorps de chèvre, Santa Cruz, Sc-23125) ; anti-MAP2 (1/500, anticorps de souris, Sigma M4403) ; anti-Tau1 (1/500, anticorps de souris, Cell Signaling Technology, S1#4019).

Pour la double détection de 14-3-3ζ et des VGluts, les anticorps anti 14-3-3ζ et anti-VGlut1-2 sont détectés respectivement avec un anticorps secondaire anti-lapin Alexa 488 (fait chez la chèvre, A11008, Molecular Probes, 1/500) et avec un anti-cochon d'Inde biotinylé (fait chez la chèvre, Vector BA-7000) suivi d'un Alexa 568 couplé à une streptavidine (S-11226, Molecular Probes, 1/500).

Pour la double détection de 14-3-3ζ et de GAD65/synaptophysine/CGRP, un Alexa 488 anti-lapin (fait chez la chèvre, A11008, Molecular Probes, 1/500) est co-incubé avec un anticorps anti-souris couplé à un Alexa 568 (A11004, Molecular Probes, 1/500).

Pour la co-détection de fibuline-2 et de GABAB1a, un anti-chèvre biotinylé (fait chez l'âne, 1/100, Jackson Immuno Research 705-065-147) suivi d'un Alexa 568 couplé à une streptavidine (S-11226, Molecular Probes, 1/500).est co-incubé avec un anti-mouton biotinylé (1/30 dans du TNB, 30 min, Jackson Immuno Research 713-065-147) suivi d'un anticorps streptavidine conjugué à une peroxidase (1/200 dans du Tris-NaCl-BSA pendant 2 heures à RT, Perkin-Elmer, NEL700A001kt) et enfin avec un anticorps anti-tyramide couplé au FITC (1/60, 10 min, Perkin-Elmer, NEL741001kt).

Pour la co-détection de fibuline-2 et de CGRP, un anti-chèvre biotinylé (fait chez l'âne, 1/100, Jackson Immuno Research 705-065-147) suivi d'un Alexa 568 couplé à une streptavidine (S-11226, Molecular Probes, 1/500).est co-incubé avec un anticorps anti-lapin couplé à un Alexa 488 (A11008, Molecular Probes, 1/500).

Pour la co-détection de la synaptophysine/GAD65/MAP2/Tau 1 avec B1a, un anti-souris couplé à un Alexa 568 (A11004, Molecular Probes, 1/500) est co-incubé avec un anti-mouton biotinylé (1/30 dans du TNB, 30 min, Jackson Immuno Research 713-065-147) suivi d'un anticorps streptavidine conjugué à une peroxidase (1/200 dans du Tris-NaCl-BSA pendant 2 heures à RT, Perkin-Elmer, NEL700A001kt) et enfin avec un anticorps anti-tyramide couplé au FITC (1/60, 10 min, Perkin-Elmer, NEL741001kt).

Pour la co-détection de VGlut et de B1a, un anti-cochon d'Inde biotinylé (1/100 dans du TNB, 30 min, Vector BA-7000) suivi d'un Alexa 568 couplé à une streptavidine (S-11226, Molecular Probes, 1/500).est co-incubé avec un anti-mouton biotinylé (1/30 dans du TNB, 30 min, Jackson Immuno Research 713-065-147) suivi d'un anticorps streptavidine conjugué à une peroxidase (1/200 dans du Tris-NaCl-BSA pendant 2 heures à RT, Perkin-Elmer, NEL700A001kt) et enfin avec un anticorps anti-tyramide couplé au FITC (1/60, 10 min, Perkin-Elmer, NEL741001kt).

Acquisition des images en microscopie d'immunofluorescence

L'observation des différents marquages est réalisée sur un microscope confocal droit (Leica DMR TCS SP2 AOBS, Mannheim, Germany). Les objectifs utilisés sont les suivants : HC Plan Apo CS 20X huile NA 0.70 and HCX Plan Apo CS 40X huile NA 1.25 and HCX Plan Apo CS 63X huile NA 1.40 and HCX Plan Apo CS 100X huile NA 1.40. Les lasers utilisés sont : Argon (458 nm, 476 nm, 488 nm, 496 nm, 514 nm), Green Helium-Neon (543 nm), Red Helium-Neon (633 nm) et une diode laser (405 nm). Les images des différents marquages sont acquises séquentiellement sur un seul plan optique par le logiciel Leica. Les images sont ensuite importées sur le logiciel Adobe Photoshop CS.

2.4.2 IHC en microscopie électronique en transmission (PLT/HPF, IHC post-embedding)

1) Protocole de PLT "Progressing Lowering of Temperature":

Fixation chimique: Le rat est anesthésié avec du pentobarbital de sodium (75mg/kg en intrapéritonéale). Une canule est placée dans l'aorte après incision du ventricule gauche. L'oreillette droite est coupée. Une solution physiologique froide, préalablement oxygénée est perfusée (210 mM sucrose, 2.5 mM KCl, 25 mM NaHCO3, 1 mM NaH2PO4, 8 mM MgSO4 et 10 mM glucose) (Fiala et al. 2003). Les tissus sont ensuite fixés par perfusion au paraformaldéhyde 4%, glutaraldéhyde 0.2% et d'acide picrique 0.2%. La moelle épinière est prélevée et post-fixée par immersion une nuit dans le même fixateur à 4°C.

Cryosubstitution et enrobage:

Des tranches de moelle épinière sont coupées au vibratome. Les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière sont récupérées, cryosubstituées et incluses en résine dans un automate (AFS: Automated Freeze Substitution System, Leica).

La température est progressivement abaissée de 0°C à -45°C au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration en solvants (30%, 50%, 70%, 90% puis 100% d'éthanol). Les échantillons sont ensuite imprégnés à -45°C dans un mélange de résine Lowicryl HM20/Ethanol puis avec de la résine pure. La résine est ensuite polymérisée sous UV pendant 48h, à-45°C. Des coupes ultrafines (70 nm) sont obtenues et collectées sur des grilles à quadrillage en nickel avec une membrane support de budvar 1%.

2) Protocole de HPF "High Pressure Freezing"/cryosubstitution:

- ✓ **Principe:**

Les échantillons biologiques sont traités selon trois étapes successives :

1) La **congélation ultra-rapide** a pour but de **figer les structures cellulaires en quelques millisecondes**, permettant ainsi, *in fine*, de les observer dans leur état quasi **natif.** L'application d'une **pression élevée** à l'instant précis de la congélation favorise la congélation de l'eau sous une forme non destructrice (glace amorphe), jusqu'à une profondeur relativement élevée (150 µm).

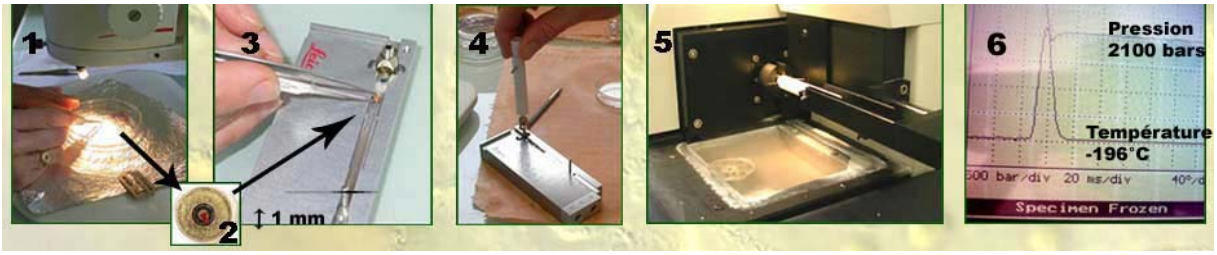
2) L'eau congelée est substituée par un solvant au cours d'une étape de **cryosubstitution** débutant à -90°C. Puis au cours d'une remontée progressive en température les tissus, stabilisés et déshydratés, interagissent avec les fixateurs en solution dans le solvant.

3) Les tissus sont infiltrés par une résine, soit de -20°C à -50°C pour les résines acryliques, soit de + 20°C à +60°C pour les résines époxy.

Cette méthode permet d'une part **d'optimiser la préservation de structures labiles**, d'autre part de **minimiser l'extraction** de constituants cellulaires. Elle n'est néanmoins efficace que sur des **échantillons de très petite taille** (diamètre inférieur à 1 mm et épaisseur inférieure à 200 µm).

- ✓ **Méthode:**

Cryofixation à haute pression: Après l'anesthésie profonde de l'animal au pentobarbital (75mg/kg en intrapéritonéale), la moelle épinière est extraite le plus rapidement possible. Des tranches transversales sont coupées avec une lame de rasoir puis les couches superficielles des cornes dorsales sont isolées. La cryofixation est réalisée dans l'EMPACT-1 (Leica Microsystems). L'échantillon est prélevé **(1)** et placé dans une cupule **(2)** ; celle-ci est insérée dans un porte-specimen **(3)** qui est alors transféré à l'aide d'un mandrin **(4)** dans l'EMPACT-1 **(5)** où il sera aussitôt soumis à une **pression de 2100 bars,** puis 20 msec après, congelé par un jet latéral d'azote liquide **(-196°C). (6)**.



Cryosubstitution et enrobage:

Nous avons ensuite procédé à une cryosubstitution qui permet de déshydrater à froid (-90°C) un échantillon cryofixé en substituant la glace amorphe par des solvants organiques. Cette procédure nécessite une remontée progressive de la température en respectant des paliers de température afin d'éviter la recristallisation. La cryosubstitution et l'inclusion en résine sont effectués par l'appareil automatique AFS (Automated Freeze Substitution System, Leica). Les échantillons congelés sont transférés, à l'aide d'un portoir immergé de l'azote liquide **(7),** à l'AFS **(8)** où ils sont répartis dans des capsules **(9)** plongées dans le milieu de substitution (solvant, avec ou sans fixateur) à -90°C. Après un palier de 24h à 72h à -90°C la température est progressivement remontée selon une courbe programmable **(10).**

La cryosubstitution et l'enrobage se font selon deux protocoles différents suivant une étude morphologique ou immunohistochimique :

Pour une étude morphologique, la cryosubstitution se fait à -90°C pendant 4 jours, dans un milieu contenant de l'acétone avec 0.1% d'acide tannique puis ce milieu est remplacé par de l'acétone avec 2% d'osmium les sept dernières heures. Les échantillons subissent une remontée progressive en température jusqu'à température ambiante. Ils sont ensuite enrobées à température ambiante dans l'AFS dans une résine EPON (résines époxy, polymérisables à chaud) par incubation dans 50% d'acétone et 50% d'EPON pendant une heure, suivi de 10% d'acétone et 90% d'EPON pendant deux heures. La résine est polymérisée en plaçant les échantillons à l'étuve (+60°C). Des coupes ultrafines de 70 nm d'épaisseur sont obtenues avec un ultramicrotome, Leica Ultracut UCT et collectées sur des grilles à quadrillage en cuivre.

Pour une étude immunohistochimique, la cryosubstitution se fait dans l'AFS dans du méthanol avec 1.5% d'acétate d'uranyle à -90°C pendant 4 jours. Les échantillons sont lentement réchauffées

(4°C/heure) jusqu'à -45°C. Ils sont imprégnés à -45°C dans une solution de résine Lowicryl HM20 (résines acryliques polymérisables à froid). La résine polymérise sous lampe UV (-45°C) posée sur la chambre de l'AFS **(11)** pendant 48h. Des coupes ultrafines (70 nm) sont obtenues et collectées sur des grilles à quadrillage en nickel avec une membrane support de budvar 1%.

3) Immunohistochimie :

Les grilles sont incubées dans 100 mM de glycine, puis dans une solution de blocage de PBS/BSA 1% contenant 4 % de sérum normal de chèvre. Elles sont alors incubées 2 heures avec les anticorps primaires dirigés contre les sous unités GABAB1a (1/100, mouton, Glaxo) GABAB1b (1/100, chèvre, Glaxo) et GABAB2 (1/1000, cochon d'Inde, Chemicon AB5394) du récepteur $GABA_B$, la protéine 14-3-3ζ (1/100, lapin, Santa Cruz, Sc-1019) ou la fibuline-2 (1/500, chèvre, Santa Cruz, Sc-23125). Après 3 lavages dans du PBS/BSA (0,1%), les grilles sont incubées deux heures, à température ambiante sous atmosphère humide, avec les anticorps secondaires couplés à des billes d'or colloïdal de tailles différentes (anti-mouton fait chez l'âne, 1/30-15nm; anti-chèvre fait chez l'âne, 1/30-15nm ; anti-cochon d'Inde fait chez la chèvre, 1/50-10nm; anti-lapin fait chez l'âne, 1/30-6nm ; anti-chèvre fait chez le lapin, 1/30-5nm) dilués dans du PBS/BSA (1%). Elles sont rincées puis fixées pendant 2 min dans une solution de PBS contenant 1% de glutaraldéhyde. Les grilles sont une nouvelle fois lavées dans une solution de PBS puis dans de l'eau distillée filtrée. Elles sont enfin laissées sécher à l'air libre.

4) Acquisition des images en microscopie électronique :

L'observation des grilles est réalisée sur un microscope électronique Hitachi H7650 (Elexience, Verrières-le-buisson, France) équipé d'une caméra Orius SC1000 (GATAN, Evry, France).

5) Quantifications

Nous avons étudié la morphologie des synapses de la corne dorsale de la moelle épinière, et plus particulièrement la distribution des vésicules à la synapse. Pour cela, nous avons mesuré la distance séparant le centre de chaque vésicule au centre de la synapse **(Figure 3)** à l'aide du logiciel MetaMorph (Meta Imaging Series Software, Molecular Devices). Le nombre total de vésicules par synapse est normalisé à 100. Nous comptabilisons le pourcentage de vésicules localisées entre 0 et 1500 nm du centre de la synapse sur des intervalles de 50 nm. Cette quantification a été effectuée à partir de 17 synapses d'un animal Sham et 31 synapses d'un animal neuropathique **(Figure 3).**

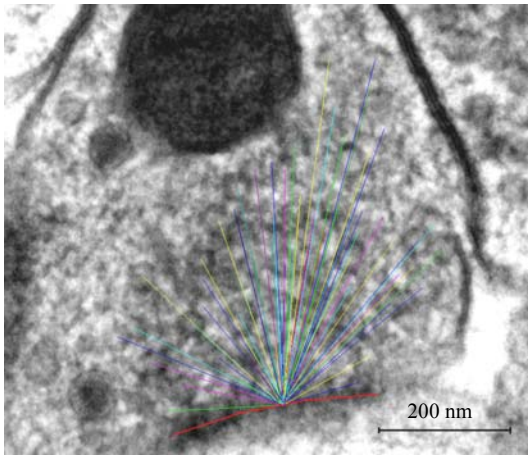


Figure 03 : Exemple de mesure des distances séparant le centre de chaque vésicule au centre de la synapse. Cette photo de microscopie électronique en transmission est un bouton synaptique de la corne dorsale de la moelle épinière d'un animal Sham. La synapse se situe au niveau du trait rouge.

3. Statistiques

Pour comparer les conditions expérimentales des conditions contrôles lorsque les résultats suivent une distribution normale, un t-test est effectué. Dans le cas contraire, nous avons effectué le test de Mann-Whitney, non paramétrique.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Lexique de termes reliés à la douleur (selon IASP 1986)

Allodynie : Douleur produite par une stimulation normalement non douloureuse.

Analgésie : Absence de douleur en réponse à une stimulation normalement douloureuse.

Causalgie : Syndrome de douleur caractérisé par une sensation de brûlure soutenue comprenant de l'allodynie et de l'hyperpathie à la suite d'une lésion nerveuse traumatique, souvent accompagné d'une dysfonction vasomotrice et sudomotrice avec des changements trophiques.

Douleur : Expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle ou décrite en de tels termes.

Douleur neuropathique : Douleur initiée ou causée par une lésion primitive ou un dysfonctionnement du système nerveux périphérique et/ou central.

Douleur nociceptive : Douleur initiée par des terminaisons nerveuses que l'on retrouve dans les tissus, muscles, os, viscères. La douleur somatique et la douleur viscérale sont des douleurs nociceptives.

Douleur somatique : Douleur initiée par des terminaisons nerveuses que l'on retrouve dans les tissus, muscles, os et articulations.

Douleur viscérale : Douleur initiée par des terminaisons nerveuses que l'on retrouve dans les viscères.

Dysesthésie : Sensation anormale désagréable, soit spontanée ou provoquée.

Hyperalgésie : Réponse exagérée à une stimulation normalement douloureuse.

Hyperesthésie/ Hypoesthésie: Augmentation/Diminution de la perception d'un stimulus.

Hyperpathie : Syndrome douloureux caractérisé par une réponse retardée et exagérée, persistant après le stimulus.

Hypoalgésie : Réponse réduite à une stimulation normalement douloureuse.

Nocicepteur : Récepteur plus particulièrement sensible à un stimulus nociceptif ou potentiellement nociceptif.

Paresthésie : Sensation anormale, non douloureuse, à type de fourmillements, de picotements, d'engourdissement, qui peut être soit spontanée ou provoquée.

Seuil sensoriel : Expérience minimale (de douleur, de toucher, etc.) qu'un sujet peut reconnaître. En psychophysique, le seuil est défini comme étant le niveau auquel 50% des stimuli sont perçus.

Seuil douloureux : La plus faible intensité d'un stimulus pour laquelle un sujet perçoit la douleur.

Stimulus nociceptif : Stimulus capable d'induire une lésion tissulaire.

ANNEXE 2 : Synthèse Peptidique En Phase Solide

La synthèse chimique de peptides est un champ de la chimie développée au cours du XX^{ième} siècle. Cette approche expérimentale s'est révélée être un outil extraordinaire avec de multiples applications dans la recherche biochimique, allant de l'étude d'interaction peptide-récepteur à la construction d'anticorps dirigés contre des fragments de protéines. Le but ultime de cette technique est d'arriver un jour à synthétiser une protéine dans son intégralité pour en faciliter l'étude structurale et fonctionnelle. Les premiers peptides furent synthétisés par Curtius (dipeptide en 1881) et par Fischer (peptide de 18 acides aminés en 1902). Ce n'est ensuite qu'en 1953 que de Vigneaud réalisa la synthèse chimique de l'ocytocine, un neuropeptide. Jusque là, les synthèses peptidiques s'effectuaient en phase liquide, ce qui produisait un nombre impressionnant de produits dérivés. Une avancée méthodologique majeure a été l'introduction de la technique de synthèse en phase solide (*Solid Phase Peptide Synthesis* ou SPPS) par Merrifield en 1963 (Prix Nobel en 1984). Le principe de la SPPS est que le peptide est ancré sur un support insoluble de type résine, stable tout au long des réactions chimiques nécessaires à la synthèse (voir schéma ci-contre). Les acides aminés sont assemblés les uns après les autres lors de cycles répétés. Les acides aminés ajoutés ont leur groupement aminé en position α, protégé temporairement (Nα-protecting group), et les groupements fonctionnels des chaînes latérales sont protégés de façon permanente (Side chain protecting group). La liaison peptidique surviendra entre le groupement carboxyle préalablement activé (Activating group) du nouvel acide aminé et le groupement amine libre de l'acide aminé déjà en place dans la chaîne peptidique. A la fin de la synthèse, le peptide est finalement clivé de son support solide et débarrassé de ses protections latérales. La synthèse peptidique est donc unilatérale. Deux types de SPPS existent en fonction du type de protection des acides aminés. On trouve ainsi les technologies t-Boc et Fmoc. Le tableau ci-dessous présente leurs principales particularités.

	t-Boc Chemistry	**Fmoc Chemistry**
Activating group	Electrophilic to facilitate the nucleophilic attack by amino group (chlorides, azides, phenyl esters = DCC, HOBt, TBTU etc.)	
Nα-protecting group	Boc group cleaved by acid	Fmoc group cleaved by base
Deprotection	TFA (Trifluoroacetic acid)	Piperidine or morphiline
Final cleavage	HF (Hydrogen fluoride) super acid	TFA (moderately strong acid)

ANNEXE 3: Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) et Flurescence Lifetime Imaging Measurement (FLIM)

- Principe du FRET (Fluorescence or Forster Resonance Energy Transfer):

Le FRET est un transfert d'énergie non-radiatif entre un fluorophore donneur (GFP, *Green Fluorescent Protein*), préalablement excité et un fluorophore accepteur (DsRed, *Discosoma Red*). Ce dernier pourra donc se retrouver dans un état excité et émettre de la fluorescence (énergie radiative) pour revenir à l'état stable. Ce phénomène a été décrit dès 1948 par Théodore Forster.

Plusieurs conditions doivent être requises pour observer ce phénomène **(Figure 1):**

- La première est un critère de distance : le rayon de Forster Ro. Pour qu'il y ait un transfert d'énergie, la distance entre le donneur et l'accepteur doit être inférieure à 10nm. L'efficacité E du transfert d'énergie est définie comme étant le rapport entre l'énergie transférée du donneur à l'accepteur sur l'énergie absorbée par le donneur. Cette efficacité de transfert décroît rapidement avec l'augmentation de la distance R entre le donneur et l'accepteur. L'efficacité de transfert varie donc suivant la relation: $E = 1/ [1+(R/Ro)^6]$.

- Un second critère doit être satisfait pour favoriser le transfert d'énergie. L'interaction au niveau moléculaire étant du type dipôle-dipôle, l'efficacité de transfert sera d'autant plus grande que les deux dipôles sont orientés dans le même sens.

- Enfin, il faut qu'il y ait chevauchement partiel entre le spectre d'absorption de l'accepteur et le spectre d'émission du donneur.

Le couple de fluorophores donneur-accepteur que nous utilisons est : la GFP (donneur) et le t-dimer DsRed (accepteur) couplés respectivement en N-terminal, à B1a/B1b et à B2. Grâce à la décomposition mono-exponentielle de la GFP et à leur compatibilité spectrale, le couple GFP / t-dimer DsRed est très bien approprié pour des mesures de FRET/FLIM. De plus, le t-dimer DsRed est un tandem de deux monomères qui a l'avantage de ne pas former d'aggrégat, de maturer rapidement et d'avoir une émission minimale lorsqu'il est excité à 900nm (longueur optimale pour l'excitation de la GFP) (Campbell et al. 2002).

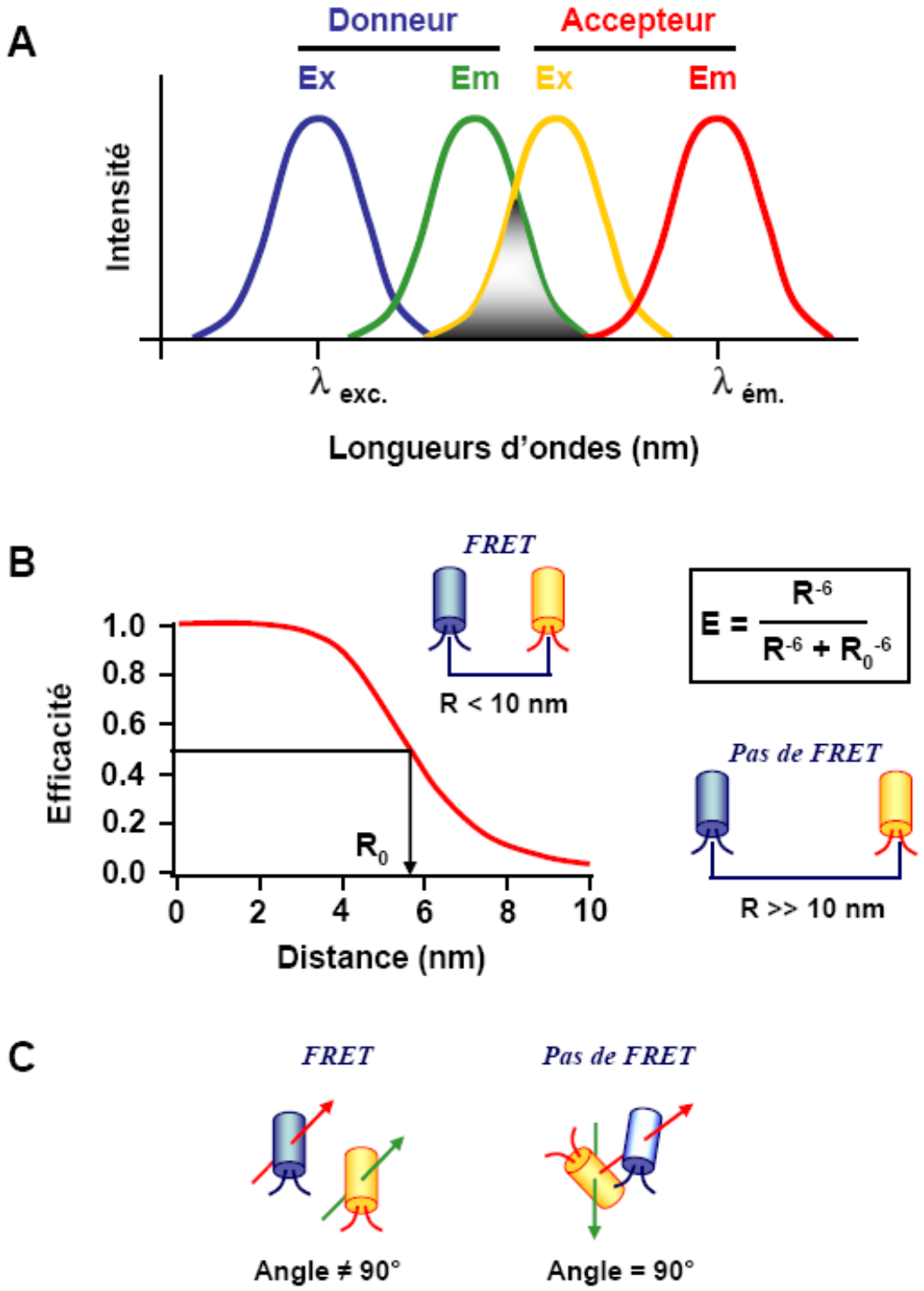


Figure 1 : Conditions du FRET. A. Un FRET peut apparaître seulement si le spectre d'émission du donneur recouvre le spectre d'excitation de l'accepteur. Ce recouvrement est défini par une intégrale de recouvrement J. **B.** Un FRET est observé si la distance séparant les deux fluorophores est inférieure à 1.8 x le rayon de Förster (R0). Ce dernier définit la distance donneur – accepteur pour laquelle l'efficacité du transfert d'énergie est de 50%. **C.** Importance de l'orientation relative des dipôles du donneur et de l'accepteur pour la mise en place d'un transfert d'énergie.

Principe du FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Measurements):

Le FLIM est une technique permettant de quantifier des efficacités de FRET en mesurant la durée de vie de la molécule donneur, ici la GFP couplée au B1a ou B1b. En condition de FRET, cette durée de vie mesurée sera plus courte qu'en absence de FRET et l'efficacité de FRET calculée en pourcentage sera donc augmentée. Toutes les expériences sont réalisées à 900nm, longueur d'onde optimale pour l'excitation de la GFP et minimisant l'excitation de la DsRed. Les courbes de déclin de fluorescence de la GFP sont mesurées en utilisant le mode « single-spot » du logiciel SPCM et analysées par le logiciel SPC Image (Becker and Hickl). Pour quantifier les interactions protéiques, nous calculons une efficacité de FRET relative pour chaque acquisition telle que : FRET efficiency (%) = $(\tau_{Dmean}-\tau_{DA}) / \tau_{Dmean}$ X100 où τ_{Dmean} est la durée de vie moyenne du fluorophore donneur (GFP) quand il est exprimé seul et $\tau_{DA,}$ la durée de vie du fluorophore donneur en présence de l'accepteur (DsRed). Les résultats sont exprimés en tant qu'efficacité de FRET moyenne ± SEM.

Principe du TCSPC (Time-Correlated Single Photon Counting):

La méthode TCSPC (Time-Correlated Single-Photon Counting) consiste à mesurer le délai (Δt) entre l'impulsion laser et la détection du premier photon de fluorescence émis par une molécule excitée. Le déclin de fluorescence représente donc le nombre de photons selon leur Δt.

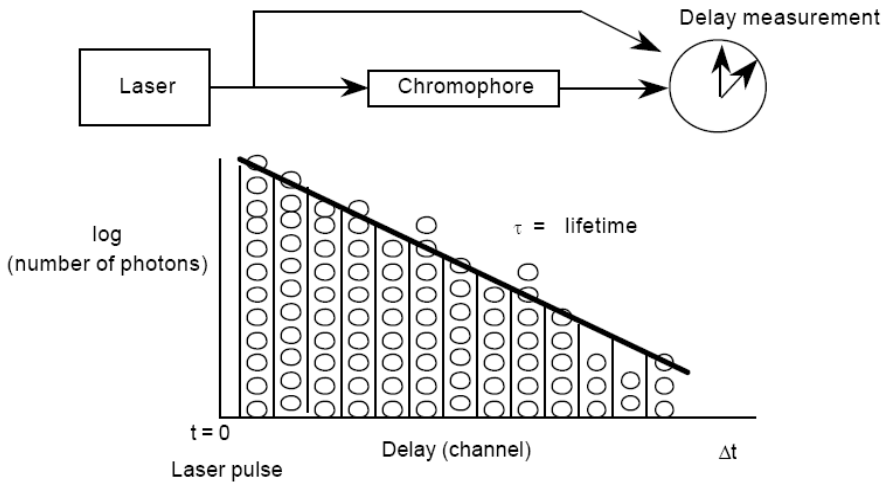


Figure 6: Principle of TCSPC.

ANNEXE 4: Autre Publication

La publication suivante est une étude menée au laboratoire, à laquelle j'ai collaboré. Elle fait partie de la thématique douleur mais ne concerne pas le récepteur $GABA_B$ et ses protéines associées. Néanmoins, j'ai trouvé intéressant de le joindre en annexe car il démontre l'aspect plurifactoriel des mécanismes de la douleur neuropathique. Cet article sera très prochainement soumis pour publication.

Integrative silencing of Cav1.2 calcium channel subunits by microRNA miR-103: involvement in chronic pain sensitization.

Alexandre Favereaux[1, 2], Olivier Thoumine[2, 3], Rabia Bouali-Benazzouz[1, 2], Virginie Roques[1, 2], Marie-Amélie Papon[1, 2], Guillaume Drutel[2, 4], André Calas[1, 2], Frédéric Nagy*[1, 2], Marc Landry*[1, 2]

1 – INSERM U862 « Physiopathologie des réseaux neuronaux médullaires », Institut François Magendie, 146 rue Léo Saignat, 33077 Bordeaux cedex, France.

2 – Université de Bordeaux, rue Léo Saignat, 33077 Bordeaux cedex, France.

3 – CNRS UMR 5091 « Physiologie cellulaire de la synapse » Institut François Magendie, 146 rue Léo Saignat, 33077 Bordeaux cedex, France.

4 – INSERM U862 « Physiopathologie de l'addiction », Institut François Magendie, 146 rue Léo Saignat, 33077 Bordeaux cedex, France.

* - Equal contribution

ABSTRACT

Up-regulation of Cav1.2 comprising L-type calcium channel (Cav1.2-LTC) in spinal dorsal horn is a key mechanism involved in chronic neuropathic pain. We show for the first time that microRNA miR-103 simultaneously inhibits the expression of the three subunits forming Cav1.2-LTC in a novel integrative regulation. Moreover, we demonstrated that miR-103 is down-regulated in neuropathic animals and that miR-103 intrathecal applications successfully relieve pain, therefore identifying microRNAs as possible therapeutic tools.

MAIN TEXT

In chronic pain states, modifications of intrinsic amplification properties of dorsal horn spinal cord neurons lead to long term sensitization[1]. These properties rely on the activation of calcium channels, including Cav1.2-LTC (Fossat P et al., in revision). Specific targeting of Cav1.2-LTC is hampered by the lack of specific blockers; an alternative might be to control Cav1.2-LTC gene expression by microRNAs (miRNAs), a newly evidenced class of translation regulators.

MiRNAs are short non-coding transcripts targeting 3' UnTranslated Region (3'UTR) of mRNA for cleavage or translation inhibition[2,3]. Because perfect matching to target sequence is not required to induce inhibition, miRNAs are likely to regulate simultaneously multiple

mRNAs[4]. We showed here for the first time that such multi-target silencing (or integrative silencing) could regulate the different subunits of a macromolecular complex, namely Cav1.2-LTC.

Neuronal Cav1.2–LTC comprises three subunits: Cav1.2-α1, α2δ1 and β1 encoded by *Cacna1c*, *Cacna2d1* and *Cacnb1* mRNAs respectively. Bioinformatics analyzes using miRanda and Targetscan algorithms[5,6] revealed that all these mRNAs are putative targets of various miRNAs (supplemental data). They also suggested that a single miRNA (miR-103) possibly binds and inhibits all 3 subunits forming Cav1.2-LTC (Fig.1a and supplemental data).

To confirm those theoretical interactions, we fused the 3'UTR of each Cav1.2-LTC subunit mRNA (containing miR-103 target sites) to the 3' terminus of a *Renilla* luciferase coding sequence to produce reporter plasmids (Fig.1b). Co-expression with a miR-103-encoding plasmid prevented luciferase expression in a dose-dependent manner (Fig.1c), whereby demonstrating miR-103 potency to inhibit translation of the three Cav1.2-LTC subunits. Interestingly, the amount of inhibition was different according to the Cav1.2-LTC subunit 3'UTR considered. *Cacna2d1* 3'UTR mediated significant inhibition at the lowest miR-103 dose tested whereas *Cacna1c* and *Cacnb1* 3'UTRs reporter activities remained unaffected. At higher miR-103 doses, the activity of all three Cav1.2-LTC subunit reporters was significantly repressed. Differences in the number and the location of miR-103 sites in 3'UTRs could explain these observations[3,7]. To confirm that inhibition was sequence-specific, we cloned into the reporter plasmid, the 3'UTR of Cav1.3, another LTC-α1 subunit that does not contain no miR-103 target site. As expected, miR-103 had no effect on Cav1.3 reporter gene translation, even at the highest amounts tested (Fig.1c). MiRNAs hybridization with mRNA depends on the "seed region" of miRNAs (residues at positions 2-8)[8-10]. To further illustrate the specificity of miR-103 targeting, we designed a miR-103 mutant (miR-103-mut) differing from the original sequence at critical nucleotide positions 2 and 3 (Fig.1d). As expected, miR-103-mut was unable to inhibit any of the Cav1.2-LTC subunit reporters, even at the highest amount tested (Fig.1c). We thus demonstrated, at the molecular level, the ability of miR-103 to silence simultaneously the three subunits of Cav1.2-LTC through binding their 3'UTR.

To assess the physiological relevance of such an integrative regulation, we conducted calcium imaging experiments on spinal cord neurons. Cultures were transfected with miR-103, miR-103-mut or empty control plasmid. Forty-eight hours later, we monitored calcium signals induced by depolarizing KCl stimulus. Upon stimulation, neurons exhibited a large increase in intracellular calcium concentration due to ion influx through several types of voltage-

dependent calcium channels including Cav1.2-LTC (Fig.1e). MiR-103 transfection significantly decreased evoked calcium signals (-58.44%, $p<0.001$), whereas miR-103-mut was much less efficient (-38.82%, $p=0.016$). To evaluate the calcium signal mediated by Cav1.2-LTC in the global calcium response, we used anti-Cav1.2 SiRNAs. As shown in Fig 1e, in presence of SiRNA, the decrease in calcium transients was equivalent to that induced by miR-103 (-55.69%, $p<0.001$). These results indicate that the integrative silencing of Cav1.2-LTC by miR-103 can dynamically regulate neuron excitability *in vitro*.

Therefore, we next addressed the role of miR-103 in neuronal sensitization *in vivo*. MiR-103 has been detected in the spinal cord with *in situ* hybridization. Endogenous mir-103 was widely expressed throughout the grey matter, with the most intense signal in motoneurons and in the superficial dorsal horn (Fig.2a). Punctiform labeling was seen in cell bodies and processes (Fig.2b). It often colocalized with the somato-dendritic marker MAP2, indicating that mir-103 was mainly expressed in neurons (Fig.2c, d). Electron microscopy confirmed this neuronal localization, both in soma and processes (Fig.2e, f). Mir-103 was found in the cytosol, but also in the vicinity of the plasma membrane, and of the nuclear envelope, the latter indicating miRNAs that were being processed and exported toward the cytoplasm. The expression of miRNA is modulated in the context of pain[11,12] but so far the mechanism involved and the physiological impact remain unexplored. We addressed this question in a rat model of chronic neuropathic pain. The neuropathy was induced by L5 and L6 spinal nerve ligation (SNL)[13] and rats were tested for pain sensitization of mechanical sensitivity. Seven days after SNL, rats showed a dramatic decrease in limb withdrawal threshold in response to paw stimulation with von Frey hairs (mechanical allodynia) (Fig.2g). Then, SNL animals were subjected to four daily intrathecal applications of miR-103, miR-103-mut or mismatch-miRNA. After the last injection, miR-103 injected rats showed a clear recovery to normal sensitivity (76.14% of the pre-SNL threshold, Fig.2g). MiR-103-mut injected animals showed a non-significant tendency to recover, whereas mismatch-miRNA injected rats showed no response to treatment. Next, using qRT-PCR we compared between sham and SNL rats, the expression of *Cacna1c*, *Cacna2d1*, *Cacnb1* mRNA and miR-103 in dorsal spinal cord tissue. In SNL, all three Cav1.2-LTC subunit mRNAs were over-expressed, while miR-103 was significantly decreased (Fig.2h). To test for a possible causal role of miR-103 down-regulation in Cav1.2-LTC subunits up-regulation, we applied intrathecally miR-103, miR-103-mut or mismatch-miRNA. As determined by qRT-PCR, miR-103 injections significantly reduced the expression of all three Cav1.2-LTC subunits (*Cacna1c* -187.56%, $p<0.001$; *Cacna2d1* -80.48%, $p<0.001$; *Cacnb1* -78.49%, $p=0.004$). In contrast, mismatch-miRNA or

miR-103-mut injections had no impact on Cav1.2-LTC subunits which was in agreement with the durable neuropathic state of these rat groups.

Previous demonstrations of a concerted control by miRNAs relate to several components of a signaling pathway[14,15]. Here, we show for the first time, that a single miRNA may exert integrative silencing of all constitutive subunits of a macromolecular complex. This novel mechanism could shed light on complex co-modulations of multiple mRNA within a cell, either in normal or pathological conditions. Therefore, our results urge for combinatorial analyzes of transcriptome and microRNAome. Moreover, we demonstrated that impairment of this miRNA-induced integrative regulation in spinal cord is a major factor of chronic pain sensitization and, thus, deserves exploration as a therapeutic target.

ACKNOWLEDGMENTS:

Authors want to thank, Claire Léger and Thierry Leste-lasserre for technical assistance. We are grateful to Dr Etienne Gontier and Sabrina Lacôme, Bordeaux Imaging Center, for technical help in electron microscopy. ARC/INCA (07/3D1616/IABC-23-7/NC-NG), ANR(ANR-07NEURO-015-01), Conseil Régional d'Aquitaine (2008/30/023).

FIGURE LEGENDS

Figure 1: *Integrative silencing of Cav1.2-LTC by miR-103*

(a) Bioinformatics analyzes revealed that all Cav1.2-LTC subunit mRNA contain a target site for miR-103. (b) Luciferase reporters consisted of a *Renilla* luciferase coding sequence under CMV promoter control that was fused on its 3' end to the 3'UTR of the different Cav1.2-LTC subunits. (c) Compared to control conditions, *Cacna2d1* 3'UTR mediated significant *Renilla* luciferase activity inhibition at the lowest miR-103 dose (150ng, -24%, $p<0.001$) whereas *Cacna1c* and *Cacnb1* 3'UTRs reporter activities were still unaffected. At higher miR-103 dose, all Cav1.2-LTC subunit reporter activities were significantly repressed: at 500ng, -40.51%, $p<0.001$, -56.45%, $p<0.001$ and -31.51%, $p<0.001$ for *Cacna1c, Cacna2d1* and *Cacnb1* respectively. At the highest miR-103 dose (750ng), inhibition reached a plateau for *Cacna1c* and *Cacna2d1* (-31.59%, $p<0.001$ and -53.94%, $p<0.001$ respectively) whereas *Cacnb1* reporter was more effectively inhibited (-53.07%, $p<0.001$). # $p<0.001$ by ANOVA, Holm-Sidak *post-hoc* test. Data are means ± s.e.m. n=6 (d) Mutation of miR-103 (miR-103-mut) at nucleotide positions 2 and 3 (original sequence GC being turned into AU, highlighted in red). In this example, hybridization to *Cacna1c* 3'UTR is impaired, yellow indicates perfect base pairing, green indicates wobble base pairing and gray indicates no match. (e) Calcium imaging was performed with Fluo4-AM and depolarization was induced by 25mM KCl stimulus. MiR-103 over-expression dramatically reduced calcium responses compared to control ($\Delta F/F_0$ = 1,921 and 4,622 respectively, $p<0.001$). As well as miR-103, anti-Cav1.2 SiRNAs application significantly reduced calcium signals compared to control ($\Delta F/F_0$ = 2,048, $p<0.001$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ by ANOVA, Holm-Sidak *post-hoc* test. Data are means ± s.e.m. n=16, 21, 46 and 44 for control, miR-103, miR-103-mut and SiRNAs experiments respectively.

Figure 2: *in vivo, miR-103 dynamically regulates all Cav1.2-LTC subunits and is involved in pain mechanisms.*

(a) MiR-103 has been detected in SNL rats by *in situ* hybridization with a double-digoxigenin labelled probe (Exiqon). MiR-103 expression is enriched in superficial laminae of the dorsal horn and in ventral motoneurons. The signal intensity is weaker in the dorsal horn ipsilateral to the peripheral nerve injury (double arrowheads). Bar: 500 µm. (b to d) Double detection of miR-103 (green) and MAP2 (red) that shows neuronal expression of the microRNA. Moreover, miR-103 is expressed as discrete clusters throughout cell bodies and dendritic processes (arrows). n = nucleus; bar = 10 µm. (e and f) Ultrastructural localization of miR-103 in dorsal horn neurons by *in situ* hybridization, probe was visualized with silver-enhanced

ultra-small gold particles. The expression of miR-103 is restricted to sub-domains of the soma (arrowheads in e). It is also present near the nuclear envelope (arrows in e). In processes, miR-103 is detected in both axons (A) and dendrites (D) (double arrowheads in e and f). N = nucleus; bar = 200 nm. (g) Rats were tested for pain sensitization using von Frey filaments: 7 days after SNL, rats showed a dramatic decrease in limb withdrawal threshold in response to paw stimulation. Four daily intrathecal applications of miR-103 (Days 7, 8, 9 and 10) resulted in a clear recovery in mechanical allodynia (76.14% of pre-SNL threshold, p=0,031). MiR-103-mut injected animals showed a tendency to recover still not significant (58.09% of pre-SNL threshold, p=0.125) and mismatch-miRNA injected rats showed no response to treatment (42.41% of pre-SNL threshold, p=0.219). * p<0.05, Wilcoxon Signed Rank test. Data are means ± s.e.m. n=4, 4, 4 and 6 for sham, miR-103, miR-103-mut and mismatch-miRNA injected rats respectively (h) In SNL animals, all the three Cav1.2 subunit mRNAs were over-expressed compared to sham (*Cacna1c* + 138.57 %, p=0.014; *Cacna2d1* + 47.09 %, p=0.003; *Cacnb1* + 84.44 %, p=0.022) while miR-103 was significantly decreased (-28.3%, p<0.00 1). † p<0.05, †† p<0.01, ††† p<0.001 by ANOVA, Holm-Sidak *post-hoc* test. Quantification after the last miR-103 intrathecal application revealed that, compared to SNL level, *Cacna1c, Cacna2d1* and *Cacnb1* expressions were significantly reduced (-187.56%, p<0.001; -80.48%, p<0.001 -78.49%, p=0.004, respectively). In contrast, miR-103-mut or mismatch miRNA had no impact on Cav1.2-LTC subunit expressions. ** p<0.01, *** p<0.001 by ANOVA, Holm-Sidak *post-hoc* test. Data are means ± s.e.m. n=6, 6, 3 and 3 for SNL, miR-103, miR-103-mut and mismatch miRNA respectively.

Supplemental Figure 3:

Target sites were determined with the miRanda algorithm[5] available online (http://www.microrna.org/) and the TargetScan algorithm (release 5.1) available online (http://www.targetscan.org/vert_50/). *Cacna1c* exhibited one target site for miR-103 at nucleotide positions 1512-1534, *Cacna2d1* one site at positions 182-204 and *Cacnb1* two sites at positions 636-658 and 1198-1220. Yellow indicates perfect base pairing, green indicates wobble base pairing and gray indicates no match. Phylogenic study revealed that these target sites were well conserved across vertebrates.

Supplemental Figure 4:

List of the miRNA target sites for the different Cav1.2-LTC subunits. Only sites that are well conserved across vertebrates are listed.

METHODS:

Plasmids, RNA and DNA oligonucleotides:

The rat *Cacna1c*, *Cacna2d1*, *Cacnb1* and *Cacna1c* 3' UTR were amplified by polymerase chain reaction (PCR) from rat brain cDNA and cloned into a modified phRL-CMV vector (Promega). For the miR-103 expression construct, a genomic sequence spanning 172bp upstream and 166bp downstream of the miR-103 sequence was PCR-amplified and cloned into pcDNA3.1 (Invitrogen). Mutation of miR-103 was achieved using the Quick Change site directed mutagenesis kit (Stratagene). For *in-situ* hybridization, we used LNA modified probes (Exiquon). For intrathecal miRNA applications, we used synthetic double-strand RNA (Eurogentec) designed as mature miR-103 sequence, mutated miR-103 or mismatch miRNA.

Cloning and mutation:

Cacna1c 3'UTR Fw: 5' GCGCGCGGTACCTCGTTTCAATGTTCCTAATGGG 3'
Cacna1c 3'UTR Bw: 5' GCGCGCGGATCCCGACACCTTTGTTCACTTTGC 3'
Cacna2d1 3'UTR Fw: 5' GCGCGCGGTACCCCCTCTAAACCCATGATCTG 3'
Cacna2d1 3'UTR Bw: 5' GCGCGCGGATCCAAACCTCCCACAGAGAATGAG 3'
Cacnb1 3'UTR Fw: 5' GCGCGCGGTACCCACCATATCCATTCCATAACC 3'
Cacnb1 3'UTR Bw: 5' GCGCGCGGATCCCAGTGCTATCTTCTAACCTG 3'
Cacna1d 3'UTR Fw: 5' GCGCGCGGTACCGTACGAGTGATTTCACGCCT 3'
Cacna1d 3'UTR Fw: 5' GCGCGCGGATCCTGCAGTTCAAATACGGTACGA 3'
miR-103 Fw: 5' GCGCGCAAGCTTTTGAATGCACAGTCTAGATCTAAATGGG 3'
miR-103 Bw: 5' GCGCGCGGATCCAAAGGGTCCTCCTGTCTCCTC 3'
miR-103-mut Fw: 5' GCCTTGTTGCATATGGATCAAATAGCATTGTACAGGGCTATG 3'
miR-103-mut Bw: 5' CATCGCCCTGTACAATGCTATTTGATCCATATGCAACAAGGC 3'

Real-time PCR:

SDHA Fw: 5' TGCGGAAGCACGGAAGGAGT 3'
SDHA Bw: 5' CTTCTGCTGGCCCTCGATGG 3'
Cacna1c Fw: 5' AGACAGCCTTGCCCTTGCAT 3'
Cacna1c Bw: 5' GGCCTGGGGAACGTGGA 3'
Cacna2d1 Fw: 5' ATGTGCTGGAGGATTATACCG 3'
Cacna2d1 Bw: 5' CCAAAGATAGACCATAAGGAAGG 3'
Cacnb1 Fw: 5' AGGGCTATGAGGTAACTGAC 3'

Cacnb1 Bw: 5' GGAAATCCTGCCATCAAACC 3’
miR-103 Fw: 5' AGCAGCATTGTACAGGGCTATGA 3’

COS cell culture and luciferase assay:

COS-1 cells were cultured in Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium. We used a dual reporter system, with an empty *Firefly* luciferase vector (pGL3, Promega) as transfection control. Normalized *Renilla* luciferase activity was expressed as a ratio of reporter to control vector activities. Cells were co-transfected with *Renilla* reporter and *Firefly* control plasmids using FuGene transfection medium (Roche). We used 150ng, 250ng, 500ng or 750ng of miR-103 plasmid, together with 50ng of Cav1.2-LTC subunit reporter plasmid and 10ng of pGL3 control plasmid (Promega). Forty-eight hours later luciferase activities were quantified with the Dual reporter system (Promega) and normalized to control experiment.

Neuron culture and calcium imaging:

Dissociated cultures were made from the lumbar spinal cord of E18 rat embryos. The embryos were delivered by caesarean section from deeply anaesthetized pregnant females. Primary spinal neurons were cultured in Neurobasal medium + 2% B-27 Serum-Free supplement + 1% GlutaMAX-I Supplement + 1% Penicillin /Streptomycin (Gibco). After one week *in vitro*, neurons were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen). MiR-103, miR-103-mut plasmids or anti Cav1.2-SiRNAs were co-transfected with a mCherry encoding plasmid to visualize transfected cells. Neurons were incubated with Fluo4-AM (5µM, Molecular Bioprobes) for 10 min, then, after 3 washes with Tyrode solution, cultures were imaged on a Nikon Ti inverted microscope coupled to HQ2 CoolSNAP digital camera (Photometrics). Neuron depolarization was induced by a 25 mM KCl stimulus.

Animal model, intrathecal injections and behavioral tests:

All experimental procedures followed the ethical guidelines of the International Association for the Study of Pain and were approved by the local ethics committee (agreement n°AP 1/4/2005). The experiments were done on adult Wistar rats (250-300g). The right L5 and L6 spinal nerves were isolated and tightly ligated with a 7.0 silk thread. After complete hemostasis, the incision was sutured. Surgery was performed on all rats under gaseous anesthesia with a mixture of halothane (5% for induction and 2% for maintenance) and a 1:1 flow ratio of air/O_2. The rats resumed normal activity within 30 minutes after termination of the gaseous anesthesia. The rats were placed in the testing cage one hour before the test for habituation. The withdrawal threshold of the leg on the operated side was determined in response to mechanical stimuli applied to the plantar surface of the foot. The limb withdrawal

threshold was measured by an electronic device (Bioseb) derived from Von Frey filaments. Synthetic miRNAs or SiRNAs (2µg) were solubilized in 10µl of i-Fect reagent (Neuromics) following Neuromics instructions and published protocol [16], and applied intrathecally.

Quantitative RT-PCR:

Total RNA was purified with the TRI Reagent (Sigma-Aldrich) according to manufacturer's instructions. For mRNAs, cDNA was synthesized from 1µg of total RNA using RevertAid H Minus first strand synthesis kit (Fermentas) and primed with oligo-dT primers. For miRNAs, cDNA was synthesized using Ncode first strand synthesis kit (Invitrogen). PCR amplification was performed on a DNA Engine Opticon2 fluorescence detection System (MJResearch/Bio-Rad) with primer pairs designed to span exon boundaries and to generate amplicons of ~70 bp. Primer sets for *Sdha*,*Cacna1c*, *Cacna2d1*, *Cacnb1* and miR-103 were tested by qRT-PCR and gel electrophoresis for the absence of primer-dimer artifacts and multiple products. Triplicate qRT-PCR reactions were done twice for each sample, using transcript-specific primers (600 nM) and cDNA (10ng) in a final volume of 10 µl. The DyNAmo^{TM} SYBR Green qPCR kit (Finnzymes) was used with the following PCR amplification cycles: initial denaturation, 95°C for 15 min; followed by 40 cycles with denaturation, 95°C for 20 sec and annealing-extension, 61°C for 35 sec. A dissociation curve was generated at the end of the 40th cycle to verify that a single product was amplified. The Ct value of each gene was normalized against that of *Sdha*. The relative level of expression was calculated using the comparative ($2^{\Delta\Delta CT}$) method[17].

REFERENCES:

1. Derjean, D. *et al. Nat Neurosci* **6**, 274-81 (2003).
2. Lee, R.C., Feinbaum, R.L. & Ambros, V. *Cell* **75**, 843-54 (1993).
3. Kertesz, M. *et al. Nat Genet* **39**, 1278-84 (2007).
4. Lim, L.P. *et al. Nature* **433**, 769-73 (2005).
5. John, B. *et al. PLoS Biol* **2**, e363 (2004).
6. Lewis, B.P., Burge, C.B. & Bartel, D.P. *Cell* **120**, 15-20 (2005).
7. Grimson, A. *et al. Mol Cell* **27**, 91-105 (2007).
8. Lewis, B.P. *et al. Cell* **115**, 787-98 (2003).
9. Stark, A., Brennecke, J., Russell, R.B. & Cohen, S.M. *PLoS Biol* **1**, E60 (2003).
10. Doench, J.G. & Sharp, P.A. *Genes Dev* **18**, 504-11 (2004).
11. Bai, G., Ambalavanar, R., Wei, D. & Dessem, D. *Mol Pain* **3**, 15 (2007).
12. Aldrich, B.F., EP; Kasuya, J; Hammond, DL; Kitamoto, T. *Neuroscience* **in press**(2009).
13. Kim, S.H. & Chung, J.M. *Pain* **50**, 355-63 (1992).
14. Ferretti, E. *et al. Embo J* **27**, 2616-27 (2008).
15. Webster, R.J. *et al. J Biol Chem* **284**, 5731-41 (2009).
16. Luo, M.C. *et al. Mol Pain* **1**, 29 (2005).
17. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. *Methods* **25**, 402-8 (2001).

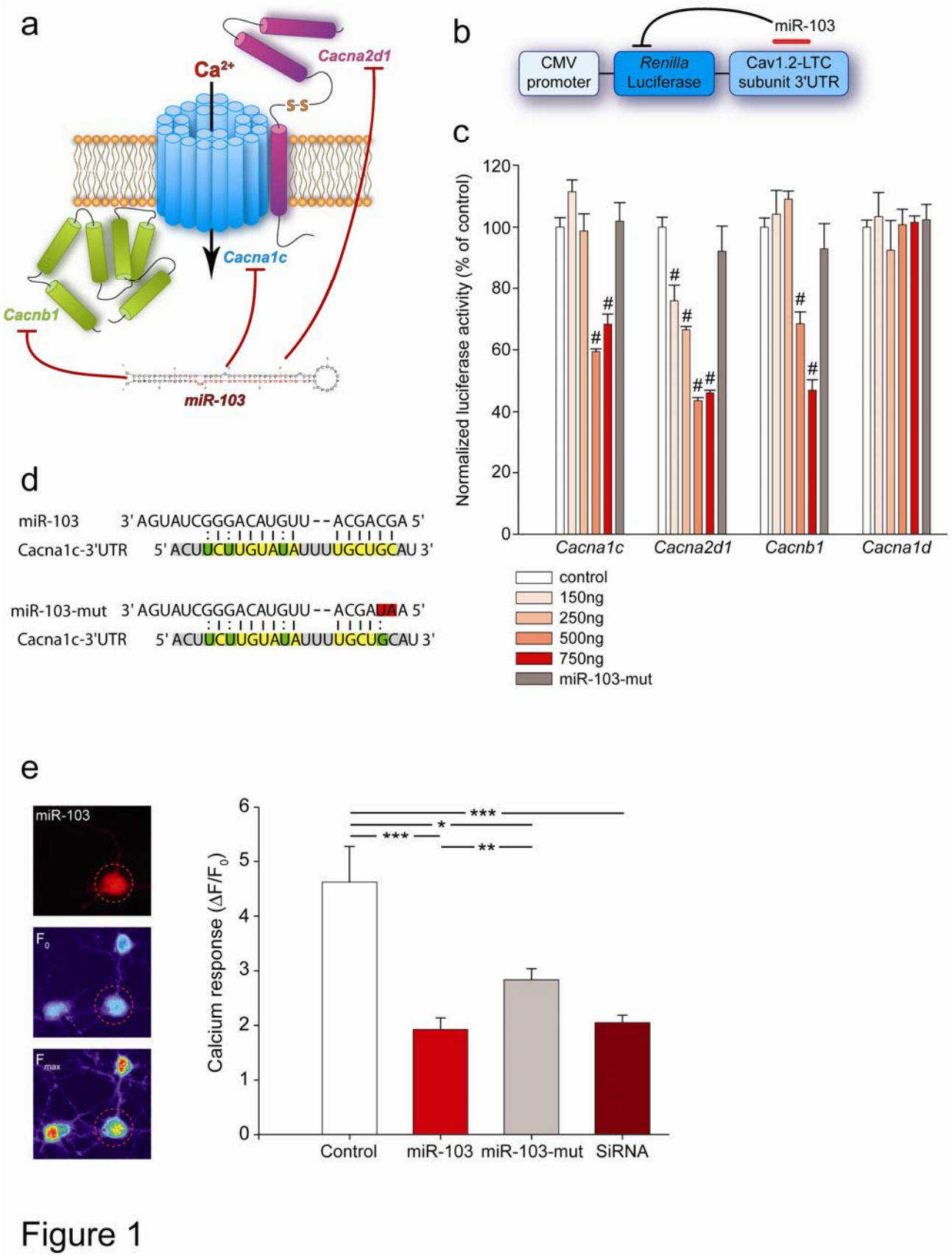

a
Ca2+
Cacna2d1
S-S
Cacna1c
Cacnb1
miR-103
b
miR-103
CMV promoter
Renilla Luciferase
Cav1.2-LTC subunit 3'UTR
c
Normalized luciferase activity (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
Cacna1c
Cacna2d1
Cacnb1
Cacna1d
control
150ng
250ng
500ng
750ng
miR-103-mut
d
miR-103 3' AGUAUCGGGACAUGUU--ACGACGA 5'
Cacna1c-3'UTR 5' ACUUCUUGUAUAUUUUGCUGCAU 3'
miR-103-mut 3' AGUAUCGGGACAUGUU--ACGAUAA 5'
Cacna1c-3'UTR 5' ACUUCUUGUAUAUUUUGCUGCAU 3'
e
miR-103
F0
Fmax
Calcium response (ΔF/F0)
6
5
4
3
2
1
0
***
*
***
**
Control
miR-103
miR-103-mut
SiRNA

Figure 1

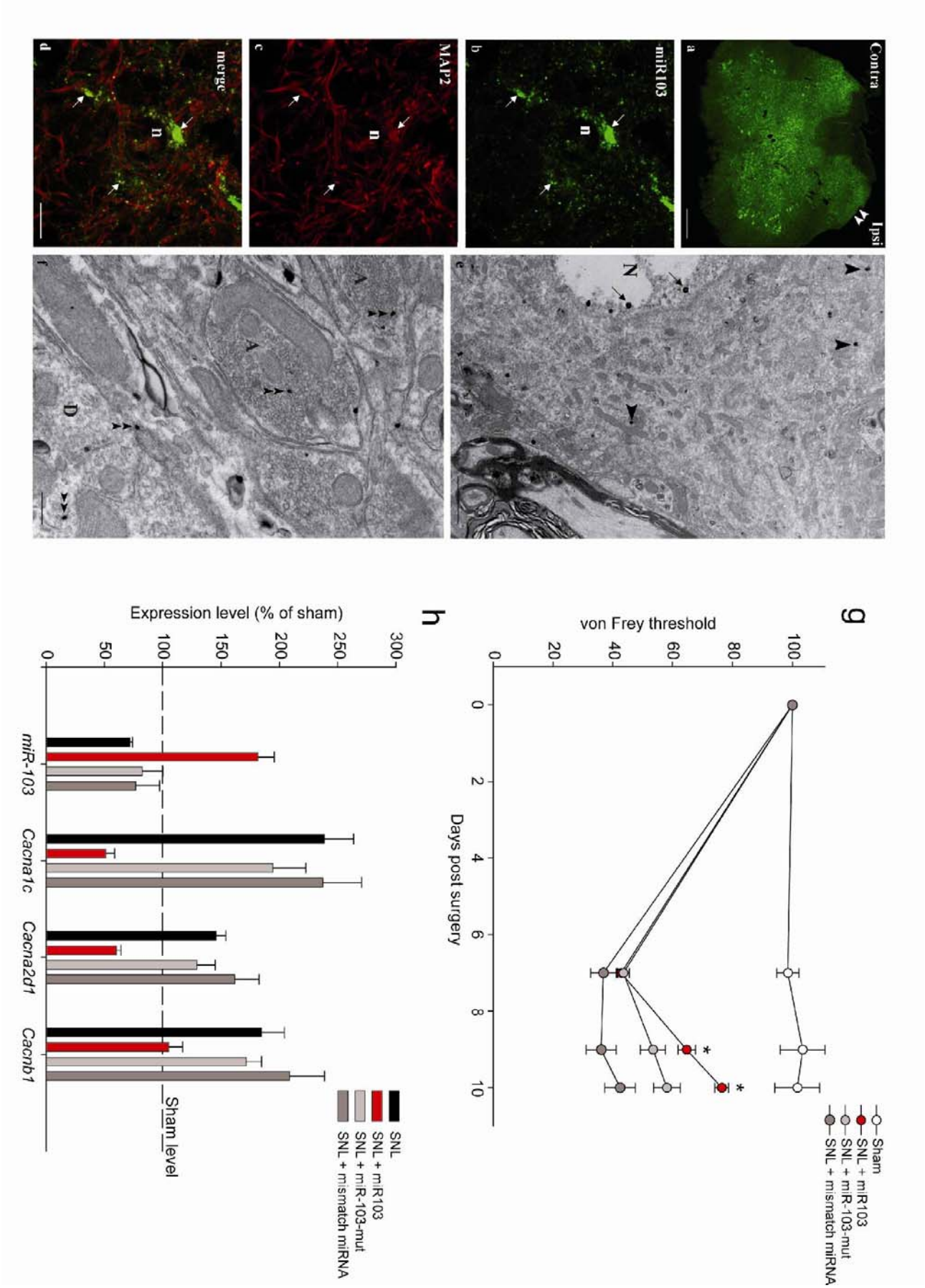

Contra
Ipsi
a
miR103
b
MAP2
c
merge
d
n
N
e
f
A
D
g
von Frey threshold
Days post surgery
Sham
SNL + miR103
SNL + miR-103-mut
SNL + mismatch miRNA
h
Expression level (% of sham)
miR-103
Cacna1c
Cacna2d1
Cacnb1
Sham level
SNL
SNL + miR103
SNL + miR-103-mut
SNL + mismatch miRNA

Figure 2

ANNEXE 5: Communications orales, Posters et Publications

COMMUNICATIONS ORALES

1) **Papon M.A.,** Laffray S., Favereaux A., Bouali-Benazzouz R., Langel U., Nagy F., Landry M. "Specificity of the interaction $GABA_B$/14-3-3ζ in the spinal cord". 2008; Strasbourg, 4th Pain symposium.

2) Laffray S., Bouali-Benazzouz R., **Papon M.A.,** Favereaux A., Le Feuvre Y., Spriet C., Langel U., Nagy F., Landry M. « Loss of $GABA_B$ inhibition in the dorsal spinal cord of neuropathic rat model ». 2008; Glasgow, International Association for the Study of Pain.

3) Laffray S., Bouali-Benazzouz R., **Papon M.A.**, Spriet C., Heliot L., Langel U., Nagy F., Landry M. « Impairment of $GABA_B$ inhibition in the spinal dorsal horn ». 2008; Grand Cayman, Spring Pain Conference.

4) Laffray S., Bouali-Benazzouz R., **Papon M.A.**, Aubert S., Spriet C., Heliot L., Langel U., Nagy F. Landry M. "Closing the gap between intrinsic neuronal properties and pain". 2007; Montpellier, 8th meeting of the French Society of Neurosciences.

POSTERS

1) **Papon M.A.,** Le Feuvre Y., Favereaux A., Barreda-Gomez G., Léger C., Rodriguez-Puertas R., Nagy F., Landry M. Extracellular matrix protein fibulin-2 limits gamma-aminobutyric acid type B-mediated inhibition of pain sensitization in the spinal cord of neuropathic rats.; 2009; **Egypt**, IMHOTEP program.

2) **Papon M.A.,** Le Feuvre Y., Favereaux A., Barreda-Gomez G., Léger C., Rodriguez-Puertas R., Nagy F., Landry M. Extracellular matrix protein fibulin-2 limits gamma-aminobutyric acid type B-mediated inhibition of pain sensitization in the spinal cord of neuropathic rats.; 2009; **Chicago**, Society for Neuroscience.

3) **Papon M.A.,** Le Feuvre Y., Favereaux A., Léger C., Nagy F., Landry M. GABAB1 binding to the extracellular matrix protein fibulin-2 impairs GABAB activation in the spinal cord of neuropathic rats; 2009; **Bordeaux**, 9th meeting of the French Society of Neurosciences.

4) **Papon M.A.,** Le Feuvre Y., Favereaux A., Léger C., Rodriguez-Puertas R., Nagy F., Landry M. GABAB1 binding to the extracellular matrix protein fibulin-2 impairs GABAB activation in the spinal cord of neuropathic rats; 2009; **Arcachon**, 9th Scientific Day of Doctoral School "Sciences de la Vie et de la Santé".

5) **Papon M.A.**, Favereaux A., Poujol C., Léger C., Le Feuvre Y., Nagy F., Landry M. GABAB1a binding to the extracellular matrix protein fibulin-2 impairs GABAB activation in the spinal cord of neuropathics rats ; 2008 ; **Bordeaux**, New Frontiers in Neurophotonics.

6) **Papon M.A.**, Laffray S., Bouali-Benazzouz R., Langel U., Nagy F., Landry M. Spinal Neuropathic pain mechanisms: perturbation of the interaction $GABA_B$/14-3-3ζ with competing peptides; 2008; **Bordeaux**, IFR of Neurosciences.

7) Laffray S., **Papon M.A.**, Bouali-Benazzouz R., Spriet C., Heliot L., Langel U., Nagy F., Landry M. Spinal Neuropathic pain mechanisms : impairment of $GABA_B$ receptor inhibition; 2007; **Quebec**, Summer School.

PUBLICATIONS

1) **Papon M.A.,** Le Feuvre Y., Favereaux A., Léger C., Nagy F., Landry M. Spinal inhibition of GABAB activation by the extracellular matrix protein Fibulin-2 in neuropathic rats. *In preparation.*

2) Laffray S., **Papon M.A.,** Bouali-Benazzouz R., Jiang Y., Holm T., Spriet C., Desbarats P., Favereaux A., Fossat P., Le Feuvre Y., Decossas M., Héliot L., Langel U., Nagy F., Landry M. De-dimerization of GABAB receptor: a novel mechanism of disinhibition triggered by up-regulation of endogenous 14-3-3ζ. *Submitted.*

3) Favereaux A., Thoumine O., Bouali-Benazzouz R., Roques V., **Papon M.A**, Drutel G., Calas A., Nagy F., Landry M. Integrative silencing of Cav1.2 calcium channel subunits by microRNA miR-103: involvement in chronic pain sensitization. *Submitted*.

BIBLIOGRAPHIE

AbdAlla, S., H. Lother, A. el Massiery and U. Quitterer (2001). "Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness." Nat Med **7**(9): 1003-9.

Ahmadi, S., S. Lippross, W. L. Neuhuber and H. U. Zeilhofer (2002). "PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons." Nat Neurosci **5**(1): 34-40.

Allison, D. P., C. S. Daw and M. C. Rorvik (1987). "The construction and operation of a simple inexpensive slam freezing device for electron microscopy." J Microsc **147**(Pt 1): 103-8.

Alloui, A., K. Zimmermann, J. Mamet, F. Duprat, J. Noel, J. Chemin, N. Guy, N. Blondeau, N. Voilley, C. Rubat-Coudert, M. Borsotto, G. Romey, C. Heurteaux, P. Reeh, A. Eschalier and M. Lazdunski (2006). "TREK-1, a K+ channel involved in polymodal pain perception." Embo J **25**(11): 2368-76.

Amir, R., J. D. Kocsis and M. Devor (2005). "Multiple interacting sites of ectopic spike electrogenesis in primary sensory neurons." J Neurosci **25**(10): 2576-85.

Anand, P. and R. Birch (2002). "Restoration of sensory function and lack of long-term chronic pain syndromes after brachial plexus injury in human neonates." Brain **125**(Pt 1): 113-22.

Angers, S. and M. Bouvier (2000). "Reply: beyond receptor dimerization." Trends Pharmacol Sci **21**(9): 326.

Ashby, M. C., K. Ibaraki and J. M. Henley (2004). "It's green outside: tracking cell surface proteins with pH-sensitive GFP." Trends Neurosci **27**(5): 257-61.

Ataka, T., E. Kumamoto, K. Shimoji and M. Yoshimura (2000). "Baclofen inhibits more effectively C-afferent than Adelta-afferent glutamatergic transmission in substantia gelatinosa neurons of adult rat spinal cord slices." Pain **86**(3): 273-82.

Attal, N., G. Cruccu, M. Haanpaa, P. Hansson, T. S. Jensen, T. Nurmikko, C. Sampaio, S. Sindrup and P. Wiffen (2006). "EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain." Eur J Neurol **13**(11): 1153-69.

Baba, H., R. R. Ji, T. Kohno, K. A. Moore, T. Ataka, A. Wakai, M. Okamoto and C. J. Woolf (2003). "Removal of GABAergic inhibition facilitates polysynaptic A fiber-mediated excitatory transmission to the superficial spinal dorsal horn." Mol Cell Neurosci **24**(3): 818-30.

Balasubramanyan, S., P. L. Stemkowski, M. J. Stebbing and P. A. Smith (2006). "Sciatic chronic constriction injury produces cell-type-specific changes in the electrophysiological properties of rat substantia gelatinosa neurons." J Neurophysiol **96**(2): 579-90.

Bannai, H., S. Levi, C. Schweizer, T. Inoue, T. Launey, V. Racine, J. B. Sibarita, K. Mikoshiba and A. Triller (2009). "Activity-dependent tuning of inhibitory neurotransmission based on GABAAR diffusion dynamics." Neuron **62**(5): 670-82.

Barth, J. L., K. M. Argraves, E. F. Roark, C. D. Little and W. S. Argraves (1998). "Identification of chicken and C. elegans fibulin-1 homologs and characterization of the C. elegans fibulin-1 gene." Matrix Biol **17**(8-9): 635-46.

Bass, J., G. Chiu, Y. Argon and D. F. Steiner (1998). "Folding of insulin receptor monomers is facilitated by the molecular chaperones calnexin and calreticulin and impaired by rapid dimerization." J Cell Biol **141**(3): 637-46.

Becker, R., E. I. Uhle, O. Alberti and H. Bertalanffy (2000). "Continuous intrathecal baclofen infusion in the management of central deafferentation pain." J Pain Symptom Manage **20**(5): 313-5.

Bee, L. A. and A. H. Dickenson (2008). "Descending facilitation from the brainstem determines behavioural and neuronal hypersensitivity following nerve injury and efficacy of pregabalin." Pain **140**(1): 209-23.

Benbouzid, M., V. Pallage, M. Rajalu, E. Waltisperger, S. Doridot, P. Poisbeau, M. J. Freund-Mercier and M. Barrot (2008). "Sciatic nerve cuffing in mice: a model of sustained neuropathic pain." Eur J Pain **12**(5): 591-9.

Benkirane, M., D. Y. Jin, R. F. Chun, R. A. Koup and K. T. Jeang (1997). "Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32." J Biol Chem **272**(49): 30603-6.

Bennett, G. J. and Y. K. Xie (1988). "A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man." Pain **33**(1): 87-107.

Bennett, M. I., B. H. Smith, N. Torrance and A. J. Lee (2006). "Can pain can be more or less neuropathic? Comparison of symptom assessment tools with ratings of certainty by clinicians." Pain **122**(3): 289-94.

Berg, D., C. Holzmann and O. Riess (2003). "14-3-3 proteins in the nervous system." Nat Rev Neurosci **4**(9): 752-62.

Bettler, B., K. Kaupmann, J. Mosbacher and M. Gassmann (2004). "Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors." Physiol Rev **84**(3): 835-67.

Bettler, B. and J. Y. Tiao (2006). "Molecular diversity, trafficking and subcellular localization of GABAB receptors." Pharmacol Ther **110**(3): 533-43.

Bhushan, R. G., S. K. Sharma, Z. Xie, D. J. Daniels and P. S. Portoghese (2004). "A bivalent ligand (KDN-21) reveals spinal delta and kappa opioid receptors are organized as heterodimers that give rise to delta(1) and kappa(2) phenotypes. Selective targeting of delta-kappa heterodimers." J Med Chem **47**(12): 2969-72.

Billinton, A., V. H. Baird, M. Thom, J. S. Duncan, N. Upton and N. G. Bowery (2001). "GABA(B) receptor autoradiography in hippocampal sclerosis associated with human temporal lobe epilepsy." Br J Pharmacol **132**(2): 475-80.

Billinton, A., N. Upton and N. G. Bowery (1999). "GABA(B) receptor isoforms GBR1a and GBR1b, appear to be associated with pre- and post-synaptic elements respectively in rat and human cerebellum." Br J Pharmacol **126**(6): 1387-92.

Bischoff, S., S. Leonhard, N. Reymann, V. Schuler, R. Shigemoto, K. Kaupmann and B. Bettler (1999). "Spatial distribution of GABA(B)R1 receptor mRNA and binding sites in the rat brain." J Comp Neurol **412**(1): 1-16.

Blackburn-Munro, G. (2004). "Pain-like behaviours in animals - how human are they?" Trends Pharmacol Sci **25**(6): 299-305.

Blein, S., R. Ginham, D. Uhrin, B. O. Smith, D. C. Soares, S. Veltel, R. A. McIlhinney, J. H. White and P. N. Barlow (2004). "Structural analysis of the complement control protein (CCP) modules of GABA(B) receptor 1a: only one of the two CCP modules is compactly folded." J Biol Chem **279**(46): 48292-306.

Bostock, H., M. Campero, J. Serra and J. L. Ochoa (2005). "Temperature-dependent double spikes in C-nociceptors of neuropathic pain patients." Brain **128**(Pt 9): 2154-63.

Bouhassira, D., N. Attal, H. Alchaar, F. Boureau, B. Brochet, J. Bruxelle, G. Cunin, J. Fermanian, P. Ginies, A. Grun-Overdyking, H. Jafari-Schluep, M. Lanteri-Minet, B. Laurent, G. Mick, A. Serrie, D. Valade and E. Vicaut (2005). "Comparison of pain syndromes associated with nervous or somatic lesions and development of a new neuropathic pain diagnostic questionnaire (DN4)." Pain **114**(1-2): 29-36.

Bouhassira, D., Z. Bing and D. Le Bars (1993). "Studies of brain structures involved in diffuse noxious inhibitory controls in the rat: the rostral ventromedial medulla." J Physiol **463**: 667-87.

Bouhassira, D., M. Lanteri-Minet, N. Attal, B. Laurent and C. Touboul (2008). "Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population." Pain **136**(3): 380-7.

Bouhassira, D., L. Villanueva, Z. Bing and D. le Bars (1992). "Involvement of the subnucleus reticularis dorsalis in diffuse noxious inhibitory controls in the rat." Brain Res **595**(2): 353-7.

Bouhassira, D. (2007) Difficultés de l'application des modèles physiopathologiques à la clinique. In :SFETD : douleurs neuropathiques. Paris La Défense.

Bourinet, E., A. Alloui, A. Monteil, C. Barrere, B. Couette, O. Poirot, A. Pages, J. McRory, T. P. Snutch, A. Eschalier and J. Nargeot (2005). "Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception." Embo J **24**(2): 315-24.

Bouschet, T. and J. M. Henley (2005). "Calcium as an extracellular signalling molecule: perspectives on the Calcium Sensing Receptor in the brain." C R Biol **328**(8): 691-700.

Bouvier, M. (2001). "Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors." Nat Rev Neurosci **2**(4): 274-86.

Bowery, N. G. (2006). "GABAB receptor: a site of therapeutic benefit." Curr Opin Pharmacol **6**(1): 37-43.

Bowery, N. G., B. Bettler, W. Froestl, J. P. Gallagher, F. Marshall, M. Raiteri, T. I. Bonner and S. J. Enna (2002). "International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function." Pharmacol Rev **54**(2): 247-64.

Braschler, U. F., A. Iannone, C. Spenger, J. Streit and H. R. Luscher (1989). "A modified roller tube technique for organotypic cocultures of embryonic rat spinal cord, sensory ganglia and skeletal muscle." J Neurosci Methods **29**(2): 121-9.

Brasseur, L., M. Chauvin, G. Guilbaud (1997) Douleurs, Maloine Edition.

Brauner-Osborne, H., P. Wellendorph and A. A. Jensen (2007). "Structure, pharmacology and therapeutic prospects of family C G-protein coupled receptors." Curr Drug Targets **8**(1): 169-84.

Braz, J. M., M. A. Nassar, J. N. Wood and A. I. Basbaum (2005). "Parallel "pain" pathways arise from subpopulations of primary afferent nociceptor." Neuron **47**(6): 787-93.

Bridges, D., S. W. Thompson and A. S. Rice (2001). "Mechanisms of neuropathic pain." Br J Anaesth **87**(1): 12-26.

Brock, C., L. Boudier, D. Maurel, J. Blahos and J. P. Pin (2005). "Assembly-dependent surface targeting of the heterodimeric GABAB Receptor is controlled by COPI but not 14-3-3." Mol Biol Cell **16**(12): 5572-8.

Brogden, R. N., T. M. Speight and G. S. Avery (1974). "Baclofen: a preliminary report of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in spasticity." Drugs **8**(1): 1-14.

Cabello, N., J. Gandia, D. C. Bertarelli, M. Watanabe, C. Lluis, R. Franco, S. Ferre, R. Lujan and F. Ciruela (2009). "Metabotropic glutamate type 5, dopamine D2 and adenosine A2a receptors form higher-order oligomers in living cells." J Neurochem **109**(5): 1497-507.

Cairns, J. S. and M. P. D'Souza (1998). "Chemokines and HIV-1 second receptors: the therapeutic connection." Nat Med **4**(5): 563-8.

Calver, A. R., M. J. Robbins, C. Cosio, S. Q. Rice, A. J. Babbs, W. D. Hirst, I. Boyfield, M. D. Wood, R. B. Russell, G. W. Price, A. Couve, S. J. Moss and M. N. Pangalos (2001). "The C-terminal domains of the GABA(b) receptor subunits mediate intracellular trafficking but are not required for receptor signaling." J Neurosci **21**(4): 1203-10.

Calvino, B. and R. M. Grilo (2006). "Central pain control." Joint Bone Spine **73**(1): 10-6.

Campbell, R. E., O. Tour, A. E. Palmer, P. A. Steinbach, G. S. Baird, D. A. Zacharias and R. Y. Tsien (2002). "A monomeric red fluorescent protein." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 7877-82.

Capogna, M., B. H. Gahwiler and S. M. Thompson (1996). "Presynaptic inhibition of calcium-dependent and -independent release elicited with ionomycin, gadolinium, and alpha-latrotoxin in the hippocampus." J Neurophysiol **75**(5): 2017-28.

Carriba, P., G. Navarro, F. Ciruela, S. Ferre, V. Casado, L. Agnati, A. Cortes, J. Mallol, K. Fuxe, E. I. Canela, C. Lluis and R. Franco (2008). "Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET." Nat Methods **5**(8): 727-33.

Carruthers, C. J., C. G. Unson, H. N. Kim and T. P. Sakmar (1994). "Synthesis and expression of a gene for the rat glucagon receptor. Replacement of an aspartic acid in the extracellular domain prevents glucagon binding." J Biol Chem **269**(46): 29321-8.

Carstens, E. and G. P. Moberg (2000). "Recognizing pain and distress in laboratory animals." Ilar J **41**(2): 62-71.

Casanova, E., N. Guetg, R. Vigot, R. Seddik, M. Julio-Pieper, N. P. Hyland, J. F. Cryan, M. Gassmann and B. Bettler (2009). "A mouse model for visualization of GABA(B) receptors." Genesis **47**(9): 595-602.

Castro-Lopes, J. M., M. Malcangio, B. H. Pan and N. G. Bowery (1995). "Complex changes of GABAA and GABAB receptor binding in the spinal cord dorsal horn following peripheral inflammation or neurectomy." Brain Res **679**(2): 289-97.

Caterina, M. J., A. Leffler, A. B. Malmberg, W. J. Martin, J. Trafton, K. R. Petersen-Zeitz, M. Koltzenburg, A. I. Basbaum and D. Julius (2000). "Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor." Science **288**(5464): 306-13.

Celio, M. R. and I. Blumcke (1994). "Perineuronal nets--a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system." Brain Res Brain Res Rev **19**(1): 128-45.

Charles, A. C., N. Mostovskaya, K. Asas, C. J. Evans, M. L. Dankovich and T. G. Hales (2003). "Coexpression of delta-opioid receptors with micro receptors in GH3 cells changes the functional response to micro agonists from inhibitory to excitatory." Mol Pharmacol **63**(1): 89-95.

Charles, K. J., M. L. Evans, M. J. Robbins, A. R. Calver, R. A. Leslie and M. N. Pangalos (2001). "Comparative immunohistochemical localisation of GABA(B1a), GABA(B1b) and GABA(B2) subunits in rat brain, spinal cord and dorsal root ganglion." Neuroscience **106**(3): 447-67.

Chelli, M. and M. Alizon (2001). "Determinants of the trans-dominant negative effect of truncated forms of the CCR5 chemokine receptor." J Biol Chem **276**(50): 46975-82.

Chen, L., J. Boyes, W. H. Yung and J. P. Bolam (2004). "Subcellular localization of GABAB receptor subunits in rat globus pallidus." J Comp Neurol **474**(3): 340-52.

Chen, S. R., K. L. Sweigart, J. M. Lakoski and H. L. Pan (2002). "Functional mu opioid receptors are reduced in the spinal cord dorsal horn of diabetic rats." Anesthesiology **97**(6): 1602-8.

Chen, Y. and C. Sommer (2006). "Nociceptin and its receptor in rat dorsal root ganglion neurons in neuropathic and inflammatory pain models: implications on pain processing." J Peripher Nerv Syst **11**(3): 232-40.

Chitour, D., A. H. Dickenson and D. Le Bars (1982). "Pharmacological evidence for the involvement of serotonergic mechanisms in diffuse noxious inhibitory controls (DNIC)." Brain Res **236**(2): 329-37.

Chizh, B. A., M. Gohring, A. Troster, G. K. Quartey, M. Schmelz and W. Koppert (2007). "Effects of oral pregabalin and aprepitant on pain and central sensitization in the electrical hyperalgesia model in human volunteers." Br J Anaesth **98**(2): 246-54.

Choi, I. S., J. H. Cho, S. G. Jeong, J. S. Hong, S. J. Kim, J. Kim, M. G. Lee, B. J. Choi and I. S. Jang (2008). "GABA(B) receptor-mediated presynaptic inhibition of glycinergic transmission onto substantia gelatinosa neurons in the rat spinal cord." Pain **138**(2): 330-42.

Christopoulos, G., K. J. Perry, M. Morfis, N. Tilakaratne, Y. Gao, N. J. Fraser, M. J. Main, S. M. Foord and P. M. Sexton (1999). "Multiple amylin receptors arise from receptor activity-modifying protein interaction with the calcitonin receptor gene product." Mol Pharmacol **56**(1): 235-42.

Chu, M. L. and T. Tsuda (2004). "Fibulins in development and heritable disease." Birth Defects Res C Embryo Today **72**(1): 25-36.

Ciruela, F., M. M. Soloviev, W. Y. Chan and R. A. McIlhinney (2000). "Homer-1c/Vesl-1L modulates the cell surface targeting of metabotropic glutamate receptor type 1alpha: evidence for an anchoring function." Mol Cell Neurosci **15**(1): 36-50.

Cluff, R. S. and M. C. Rowbotham (1998). "Pain caused by herpes zoster infection." Neurol Clin **16**(4): 813-32.

Coblitz, B., M. Wu, S. Shikano and M. Li (2006). "C-terminal binding: an expanded repertoire and function of 14-3-3 proteins." FEBS Lett **580**(6): 1531-5.

Cohen, A., R. Sagron, E. Somech, Y. Segal-Hayoun and N. Zilberberg (2009). "Pain-associated signals, acidosis and lysophosphatidic acid, modulate the neuronal K(2P)2.1 channel." Mol Cell Neurosci **40**(3): 382-9.

Colburn, R. W., M. L. Lubin, D. J. Stone, Jr., Y. Wang, D. Lawrence, M. R. D'Andrea, M. R. Brandt, Y. Liu, C. M. Flores and N. Qin (2007). "Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice." Neuron **54**(3): 379-86.

Cope, G. H. and M. A. Williams (1968). "Quantitative studies on neutral lipid preservation in electron microscopy." J R Microsc Soc **88**(2): 259-77.

Cope, G. H. and M. A. Williams (1969). "Quantitative studies on the preservation of choline and ethanolamine phosphatides during tissue preparation for electron microscopy. I. Glutaraldehyde, osmium tetroxide, Araldite methods." J Microsc **90**(1): 31-46.

Cope, G. H. and M. A. Williams (1969). "Quantitative studies on the preservation of choline and ethanolamine phosphatides during tissue preparation for electron microscopy. II. Other preparative methods." J Microsc **90**(1): 47-60.

Coull, J. A., S. Beggs, D. Boudreau, D. Boivin, M. Tsuda, K. Inoue, C. Gravel, M. W. Salter and Y. De Koninck (2005). "BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain." Nature **438**(7070): 1017-21.

Coull, J. A., D. Boudreau, K. Bachand, S. A. Prescott, F. Nault, A. Sik, P. De Koninck and Y. De Koninck (2003). "Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain." Nature **424**(6951): 938-42.

Cousins, M. S., D. C. Roberts and H. de Wit (2002). "GABA(B) receptor agonists for the treatment of drug addiction: a review of recent findings." Drug Alcohol Depend **65**(3): 209-20.

Coutaux, A., F. Adam, J. C. Willer and D. Le Bars (2005). "Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms." Joint Bone Spine **72**(5): 359-71.

Couve, A., A. K. Filippov, C. N. Connolly, B. Bettler, D. A. Brown and S. J. Moss (1998). "Intracellular retention of recombinant GABAB receptors." J Biol Chem **273**(41): 26361-7.

Couve, A., J. T. Kittler, J. M. Uren, A. R. Calver, M. N. Pangalos, F. S. Walsh and S. J. Moss (2001). "Association of GABA(B) receptors and members of the 14-3-3 family of signaling proteins." Mol Cell Neurosci **17**(2): 317-28.

Couve, A., S. Restituito, J. M. Brandon, K. J. Charles, H. Bawagan, K. B. Freeman, M. N. Pangalos, A. R. Calver and S. J. Moss (2004). "Marlin-1, a novel RNA-binding protein associates with GABA receptors." J Biol Chem **279**(14): 13934-43.

Couvineau, A., P. Gaudin, J. J. Maoret, C. Rouyer-Fessard, P. Nicole and M. Laburthe (1995). "Highly conserved aspartate 68, tryptophane 73 and glycine 109 in the N-terminal extracellular domain of the human VIP receptor are essential for its ability to bind VIP." Biochem Biophys Res Commun **206**(1): 246-52.

Cox, J. J., F. Reimann, A. K. Nicholas, G. Thornton, E. Roberts, K. Springell, G. Karbani, H. Jafri, J. Mannan, Y. Raashid, L. Al-Gazali, H. Hamamy, E. M. Valente, S. Gorman, R. Williams, D. P. McHale, J. N. Wood, F. M. Gribble and C. G. Woods (2006). "An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain." Nature **444**(7121): 894-8.

Cruccu, G., T. Z. Aziz, L. Garcia-Larrea, P. Hansson, T. S. Jensen, J. P. Lefaucheur, B. A. Simpson and R. S. Taylor (2007). "EFNS guidelines on neurostimulation therapy for neuropathic pain." Eur J Neurol **14**(9): 952-70.

Cui, J. G., B. Linderoth and B. A. Meyerson (1996). "Effects of spinal cord stimulation on touch-evoked allodynia involve GABAergic mechanisms. An experimental study in the mononeuropathic rat." Pain **66**(2-3): 287-95.

Cui, J. G., W. T. O'Connor, U. Ungerstedt, B. Linderoth and B. A. Meyerson (1997). "Spinal cord stimulation attenuates augmented dorsal horn release of excitatory amino acids in mononeuropathy via a GABAergic mechanism." Pain **73**(1): 87-95.

Daniele, C. A. and A. B. MacDermott (2009). "Low-threshold primary afferent drive onto GABAergic interneurons in the superficial dorsal horn of the mouse." J Neurosci **29**(3): 686-95.

de Vega, S., T. Iwamoto and Y. Yamada (2009). "Fibulins: Multiple roles in matrix structures and tissue functions." Cell Mol Life Sci.

Debeer, P., E. F. Schoenmakers, W. O. Twal, W. S. Argraves, L. De Smet, J. P. Fryns and W. J. Van De Ven (2002). "The fibulin-1 gene (FBLN1) is disrupted in a t(12;22) associated with a complex type of synpolydactyly." J Med Genet **39**(2): 98-104.

Decosterd, I. and C. J. Woolf (2000). "Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain." Pain **87**(2): 149-58.

Delgado, P. L. (2004). "Common pathways of depression and pain." J Clin Psychiatry **65 Suppl 12**: 16-9.

Derbyshire, S. W., M. G. Whalley, V. A. Stenger and D. A. Oakley (2004). "Cerebral activation during hypnotically induced and imagined pain." Neuroimage **23**(1): 392-401.

Derjean, D., S. Bertrand, G. Le Masson, M. Landry, V. Morisset and F. Nagy (2003). "Dynamic balance of metabotropic inputs causes dorsal horn neurons to switch functional states." Nat Neurosci **6**(3): 274-81.

Dhaka, A., A. N. Murray, J. Mathur, T. J. Earley, M. J. Petrus and A. Patapoutian (2007). "TRPM8 is required for cold sensation in mice." Neuron **54**(3): 371-8.

Dhaka, A., V. Viswanath and A. Patapoutian (2006). "Trp ion channels and temperature sensation." Annu Rev Neurosci **29**: 135-61.

Di Paolo, E., J. P. Vilardaga, H. Petry, N. Moguilevsky, A. Bollen, P. Robberecht and M. Waelbroeck (1999). "Role of charged amino acids conserved in the vasoactive intestinal polypeptide/secretin family of receptors on the secretin receptor functionality." Peptides **20**(10): 1187-93.

Dieleman, J. P., J. Kerklaan, F. J. Huygen, P. A. Bouma and M. C. Sturkenboom (2008). "Incidence rates and treatment of neuropathic pain conditions in the general population." Pain **137**(3): 681-8.

Dietz, G. P. and M. Bahr (2004). "Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach." Mol Cell Neurosci **27**(2): 85-131.

Djouhri, L., S. Koutsikou, X. Fang, S. McMullan and S. N. Lawson (2006). "Spontaneous pain, both neuropathic and inflammatory, is related to frequency of spontaneous firing in intact C-fiber nociceptors." J Neurosci **26**(4): 1281-92.

D'Mello, R. and A. H. Dickenson (2008). "Spinal cord mechanisms of pain." Br J Anaesth **101**(1): 8-16.

Drew, G. M., P. J. Siddall and A. W. Duggan (2004). "Mechanical allodynia following contusion injury of the rat spinal cord is associated with loss of GABAergic inhibition in the dorsal horn." Pain **109**(3): 379-88.

Dubochet, J. (2007). "The physics of rapid cooling and its implications for cryoimmobilization of cells." Methods Cell Biol **79**: 7-21.

Dubochet, J., M. Adrian, J. J. Chang, J. C. Homo, J. Lepault, A. W. McDowall and P. Schultz (1988). "Cryo-electron microscopy of vitrified specimens." Q Rev Biophys **21**(2): 129-228.

Duggan, A. W. and C. R. Morton (1988). "Tonic descending inhibition and spinal nociceptive transmission." Prog Brain Res **77**: 193-211.

Duthey, B., S. Caudron, J. Perroy, B. Bettler, L. Fagni, J. P. Pin and L. Prezeau (2002). "A single subunit (GB2) is required for G-protein activation by the heterodimeric GABA(B) receptor." J Biol Chem **277**(5): 3236-41.

Dworkin, R. H., A. B. O'Connor, M. Backonja, J. T. Farrar, N. B. Finnerup, T. S. Jensen, E. A. Kalso, J. D. Loeser, C. Miaskowski, T. J. Nurmikko, R. K. Portenoy, A. S. Rice, B. R. Stacey, R. D. Treede, D. C. Turk and M. S. Wallace (2007). "Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations." Pain **132**(3): 237-51.

El Far, O. and H. Betz (2002). "G-protein-coupled receptors for neurotransmitter amino acids: C-terminal tails, crowded signalosomes." Biochem J **365**(Pt 2): 329-36.

El-Andaloussi, S., T. Holm and U. Langel (2005). "Cell-penetrating peptides: mechanisms and applications." Curr Pharm Des **11**(28): 3597-611.

Elmquist, A., M. Hansen and U. Langel (2006). "Structure-activity relationship study of the cell-penetrating peptide pVEC." Biochim Biophys Acta **1758**(6): 721-9.

Elmquist, A., M. Lindgren, T. Bartfai and U. Langel (2001). "VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions." Exp Cell Res **269**(2): 237-44.

Engle, M. P., M. Gassman, K. T. Sykes, B. Bettler and D. L. Hammond (2006). "Spinal nerve ligation does not alter the expression or function of GABA(B) receptors in spinal cord and dorsal root ganglia of the rat." Neuroscience **138**(4): 1277-87.

Ericsson, M., W. S. Poston, J. Linder, J. E. Taylor, C. K. Haddock and J. P. Foreyt (2002). "Depression predicts disability in long-term chronic pain patients." Disabil Rehabil **24**(6): 334-40.

Faigle, J. W. and H. Keberle (1972). "The chemistry and kinetics of Lioresal." Postgrad Med J **48**: Suppl 5:9-13.

Fairfax, B. P., J. A. Pitcher, M. G. Scott, A. R. Calver, M. N. Pangalos, S. J. Moss and A. Couve (2004). "Phosphorylation and chronic agonist treatment atypically modulate GABAB receptor cell surface stability." J Biol Chem **279**(13): 12565-73.

Ferre, S., R. Baler, M. Bouvier, M. G. Caron, L. A. Devi, T. Durroux, K. Fuxe, S. R. George, J. A. Javitch, M. J. Lohse, K. Mackie, G. Milligan, K. D. Pfleger, J. P. Pin, N. D. Volkow, M. Waldhoer, A. S. Woods and R. Franco (2009). "Building a new conceptual framework for receptor heteromers." Nat Chem Biol **5**(3): 131-4.

Ferre, S., F. Ciruela, A. S. Woods, C. Lluis and R. Franco (2007). "Functional relevance of neurotransmitter receptor heteromers in the central nervous system." Trends Neurosci **30**(9): 440-6.

Fiala, J. C., S. A. Kirov, M. D. Feinberg, L. J. Petrak, P. George, C. A. Goddard and K. M. Harris (2003). "Timing of neuronal and glial ultrastructure disruption during brain slice preparation and recovery in vitro." J Comp Neurol **465**(1): 90-103.

Finnerup, N. B., M. Otto, H. J. McQuay, T. S. Jensen and S. H. Sindrup (2005). "Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal." Pain **118**(3): 289-305.

Fleetwood-Walker, S. M., J. P. Quinn, C. Wallace, G. Blackburn-Munro, B. G. Kelly, C. E. Fiskerstrand, A. A. Nash and R. G. Dalziel (1999). "Behavioural changes in the rat following infection with varicella-zoster virus." J Gen Virol **80 (Pt 9)**: 2433-6.

Foord, S. M. and F. H. Marshall (1999). "RAMPs: accessory proteins for seven transmembrane domain receptors." Trends Pharmacol Sci **20**(5): 184-7.

Foord, S. M., A. Wise, J. Brown, M. J. Main and N. J. Fraser (1999). "The N-terminus of RAMPs is a critical determinant of the glycosylation state and ligand binding of calcitonin receptor-like receptor." Biochem Soc Trans **27**(4): 535-9.

Fotiadis, D., Y. Liang, S. Filipek, D. A. Saperstein, A. Engel and K. Palczewski (2003). "Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes." Nature **421**(6919): 127-8.

Franek, M., S. Vaculin and R. Rokyta (2004). "GABA(B) receptor agonist baclofen has non-specific antinociceptive effect in the model of peripheral neuropathy in the rat." Physiol Res **53**(3): 351-5.

Frank, J. (1992). Electron Tomography : Three-Dimensional Imaging with the Transmission Electron Microscope. Plenum Press, New-York.

Fraser, N. J., A. Wise, J. Brown, L. M. McLatchie, M. J. Main and S. M. Foord (1999). "The amino terminus of receptor activity modifying proteins is a critical determinant of glycosylation state and ligand binding of calcitonin receptor-like receptor." Mol Pharmacol **55**(6): 1054-9.

Frischknecht, R., M. Heine, D. Perrais, C. I. Seidenbecher, D. Choquet and E. D. Gundelfinger (2009). "Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity." Nat Neurosci **12**(7): 897-904.

Fritschy, J. M., V. Meskenaite, O. Weinmann, M. Honer, D. Benke and H. Mohler (1999). "GABAB-receptor splice variants GB1a and GB1b in rat brain: developmental regulation, cellular distribution and extrasynaptic localization." Eur J Neurosci **11**(3): 761-8.

Froestl, W., M. Gallagher, H. Jenkins, A. Madrid, T. Melcher, S. Teichman, C. G. Mondadori and R. Pearlman (2004). "SGS742: the first GABA(B) receptor antagonist in clinical trials." Biochem Pharmacol **68**(8): 1479-87.

Frotscher, M., S. Zhao, W. Graber, A. Drakew and D. Studer (2007). "New ways of looking at synapses." Histochem Cell Biol **128**(2): 91-6.

Fu, H., R. R. Subramanian and S. C. Masters (2000). "14-3-3 proteins: structure, function, and regulation." Annu Rev Pharmacol Toxicol **40**: 617-47.

Fukuoka, T., K. Kobayashi, H. Yamanaka, K. Obata, Y. Dai and K. Noguchi (2008). "Comparative study of the distribution of the alpha-subunits of voltage-gated sodium channels in normal and axotomized rat dorsal root ganglion neurons." J Comp Neurol **510**(2): 188-206.

Gaida, W., K. Klinder, K. Arndt and T. Weiser (2005). "Ambroxol, a Nav1.8-preferring Na(+) channel blocker, effectively suppresses pain symptoms in animal models of chronic, neuropathic and inflammatory pain." Neuropharmacology **49**(8): 1220-7.

Galvez, T., B. Duthey, J. Kniazeff, J. Blahos, G. Rovelli, B. Bettler, L. Prezeau and J. P. Pin (2001). "Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function." Embo J **20**(9): 2152-9.

Galvez, T., M. L. Parmentier, C. Joly, B. Malitschek, K. Kaupmann, R. Kuhn, H. Bittiger, W. Froestl, B. Bettler and J. P. Pin (1999). "Mutagenesis and modeling of the GABAB receptor extracellular domain support a venus flytrap mechanism for ligand binding." J Biol Chem **274**(19): 13362-9.

Galvez, T., L. Prezeau, G. Milioti, M. Franek, C. Joly, W. Froestl, B. Bettler, H. O. Bertrand, J. Blahos and J. P. Pin (2000). "Mapping the agonist-binding site of GABAB type 1 subunit sheds light on the activation process of GABAB receptors." J Biol Chem **275**(52): 41166-74.

Galway, M. E., J. W. Heckman, Jr., G. J. Hyde and L. C. Fowke (1995). "Advances in high-pressure and plunge-freeze fixation." Methods Cell Biol **49**: 3-19.

Gandia, J., J. Galino, O. B. Amaral, A. Soriano, C. Lluis, R. Franco and F. Ciruela (2008). "Detection of higher-order G protein-coupled receptor oligomers by a combined BRET-BiFC technique." FEBS Lett **582**(20): 2979-84.

Ganguly, S., J. L. Weller, A. Ho, P. Chemineau, B. Malpaux and D. C. Klein (2005). "Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine N-acetyltransferase mediated by phosphoserine-205." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(4): 1222-7.

Garcia-Anoveros, J. and D. P. Corey (1997). "The molecules of mechanosensation." Annu Rev Neurosci **20**: 567-94.

Gaudin, P., A. Couvineau, J. J. Maoret, C. Rouyer-Fessard and M. Laburthe (1995). "Mutational analysis of cysteine residues within the extracellular domains of the human vasoactive intestinal peptide (VIP) 1 receptor identifies seven mutants that are defective in VIP binding." Biochem Biophys Res Commun **211**(3): 901-8.

Genzen, J. R. and D. S. McGehee (2003). "Short- and long-term enhancement of excitatory transmission in the spinal cord dorsal horn by nicotinic acetylcholine receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(11): 6807-12.

George, S. R., T. Fan, Z. Xie, R. Tse, V. Tam, G. Varghese and B. F. O'Dowd (2000). "Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties." J Biol Chem **275**(34): 26128-35.

George, S. R. and B. F. O'Dowd (2007). "A novel dopamine receptor signaling unit in brain: heterooligomers of D1 and D2 dopamine receptors." ScientificWorldJournal **7**: 58-63.

George, S. R., B. F. O'Dowd and S. P. Lee (2002). "G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery." Nat Rev Drug Discov **1**(10): 808-20.

Giltay, R., R. Timpl and G. Kostka (1999). "Sequence, recombinant expression and tissue localization of two novel extracellular matrix proteins, fibulin-3 and fibulin-4." Matrix Biol **18**(5): 469-80.

Gitler, D., Y. Takagishi, J. Feng, Y. Ren, R. M. Rodriguiz, W. C. Wetsel, P. Greengard and G. J. Augustine (2004). "Different presynaptic roles of synapsins at excitatory and inhibitory synapses." J Neurosci **24**(50): 11368-80.

Glaum, S. R., R. J. Miller and D. L. Hammond (1994). "Inhibitory actions of delta 1-, delta 2-, and mu-opioid receptor agonists on excitatory transmission in lamina II neurons of adult rat spinal cord." J Neurosci **14**(8): 4965-71.

Godyna, S., D. M. Mann and W. S. Argraves (1995). "A quantitative analysis of the incorporation of fibulin-1 into extracellular matrix indicates that fibronectin assembly is required." Matrix Biol **14**(6): 467-77.

Gomes, I., B. A. Jordan, A. Gupta, N. Trapaidze, V. Nagy and L. A. Devi (2000). "Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy." J Neurosci **20**(22): RC110.

Gonzalez-Maeso, J., R. L. Ang, T. Yuen, P. Chan, N. V. Weisstaub, J. F. Lopez-Gimenez, M. Zhou, Y. Okawa, L. F. Callado, G. Milligan, J. A. Gingrich, M. Filizola, J. J. Meana and S. C. Sealfon (2008). "Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis." Nature **452**(7183): 93-7.

Gonzalez-Maeso, J., A. Wise, A. Green and J. A. Koenig (2003). "Agonist-induced desensitization and endocytosis of heterodimeric GABAB receptors in CHO-K1 cells." Eur J Pharmacol **481**(1): 15-23.

Goudet, C., F. Gaven, J. Kniazeff, C. Vol, J. Liu, M. Cohen-Gonsaud, F. Acher, L. Prezeau and J. P. Pin (2004). "Heptahelical domain of metabotropic glutamate receptor 5 behaves like rhodopsin-like receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(1): 378-83.

Goudet, C., J. Kniazeff, V. Hlavackova, F. Malhaire, D. Maurel, F. Acher, J. Blahos, L. Prezeau and J. P. Pin (2005). "Asymmetric functioning of dimeric metabotropic glutamate receptors disclosed by positive allosteric modulators." J Biol Chem **280**(26): 24380-5.

Groc, L., D. Choquet, F. A. Stephenson, D. Verrier, O. J. Manzoni and P. Chavis (2007). "NMDA receptor surface trafficking and synaptic subunit composition are developmentally regulated by the extracellular matrix protein Reelin." J Neurosci **27**(38): 10165-75.

Groc, L., M. Lafourcade, M. Heine, M. Renner, V. Racine, J. B. Sibarita, B. Lounis, D. Choquet and L. Cognet (2007). "Surface trafficking of neurotransmitter receptor: comparison between single-molecule/quantum dot strategies." J Neurosci **27**(46): 12433-7.

Guirimand, F. and D. Le Bars (1996). "[Physiology of nociception]." Ann Fr Anesth Reanim **15**(7): 1048-79.

Gulley, R. L. and T. S. Reese (1981). "Cytoskeletal organization at the postsynaptic complex." J Cell Biol **91**(1): 298-302.

Guo, W., E. Urizar, M. Kralikova, J. C. Mobarec, L. Shi, M. Filizola and J. A. Javitch (2008). "Dopamine D2 receptors form higher order oligomers at physiological expression levels." Embo J **27**(17): 2293-304.

Gwak, Y. S., H. Y. Tan, T. S. Nam, K. S. Paik, C. E. Hulsebosch and J. W. Leem (2006). "Activation of spinal GABA receptors attenuates chronic central neuropathic pain after spinal cord injury." J Neurotrauma **23**(7): 1111-24.

Hague, C., R. A. Hall and K. P. Minneman (2004). "Olfactory receptor localization and function: an emerging role for GPCR heterodimerization." Mol Interv **4**(6): 321-2.

Hague, C., M. A. Uberti, Z. Chen, R. A. Hall and K. P. Minneman (2004). "Cell surface expression of alpha1D-adrenergic receptors is controlled by heterodimerization with alpha1B-adrenergic receptors." J Biol Chem **279**(15): 15541-9.

Hains, B. C., J. P. Klein, C. Y. Saab, M. J. Craner, J. A. Black and S. G. Waxman (2003). "Upregulation of sodium channel Nav1.3 and functional involvement in neuronal hyperexcitability associated with central neuropathic pain after spinal cord injury." J Neurosci **23**(26): 8881-92.

Hains, B. C. and S. G. Waxman (2007). "Sodium channel expression and the molecular pathophysiology of pain after SCI." Prog Brain Res **161**: 195-203.

Hammond, D. L. and E. J. Drower (1984). "Effects of intrathecally administered THIP, baclofen and muscimol on nociceptive threshold." Eur J Pharmacol **103**(1-2): 121-5.

Hao, J. X., X. J. Xu and Z. Wiesenfeld-Hallin (1994). "Intrathecal gamma-aminobutyric acidB (GABAB) receptor antagonist CGP 35348 induces hypersensitivity to mechanical stimuli in the rat." Neurosci Lett **182**(2): 299-302.

Harikumar, K. G., M. M. Morfis, P. M. Sexton and L. J. Miller (2008). "Pattern of intra-family hetero-oligomerization involving the G-protein-coupled secretin receptor." J Mol Neurosci **36**(1-3): 279-85.

Harris, J. A., M. Corsi, M. Quartaroli, R. Arban and M. Bentivoglio (1996). "Upregulation of spinal glutamate receptors in chronic pain." Neuroscience **74**(1): 7-12.

Harvey, R. J., U. B. Depner, H. Wassle, S. Ahmadi, C. Heindl, H. Reinold, T. G. Smart, K. Harvey, B. Schutz, O. M. Abo-Salem, A. Zimmer, P. Poisbeau, H. Welzl, D. P. Wolfer, H. Betz, H. U. Zeilhofer and U. Muller (2004). "GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization." Science **304**(5672): 884-7.

Hawrot, E., Y. Xiao, Q. L. Shi, D. Norman, M. Kirkitadze and P. N. Barlow (1998). "Demonstration of a tandem pair of complement protein modules in GABA(B) receptor 1a." FEBS Lett **432**(3): 103-8.

Hay, D. L., D. R. Poyner and P. M. Sexton (2006). "GPCR modulation by RAMPs." Pharmacol Ther **109**(1-2): 173-97.

Hayat, M. (1982). Fixation for Electron Microscopy. Academic Press, New-York.

Hayat, M.A. (2000). Principles and techniques of electron microscopy: biological applications, 4th edn. Cambridge University Press, Cambridge.

Heinke, B., R. Ruscheweyh, L. Forsthuber, G. Wunderbaldinger and J. Sandkuhler (2004). "Physiological, neurochemical and morphological properties of a subgroup of GABAergic spinal lamina II neurones identified by expression of green fluorescent protein in mice." J Physiol **560**(Pt 1): 249-66.

Hendrich, J., A. T. Van Minh, F. Heblich, M. Nieto-Rostro, K. Watschinger, J. Striessnig, J. Wratten, A. Davies and A. C. Dolphin (2008). "Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the alpha2delta ligand gabapentin." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(9): 3628-33.

Hevers, W. and H. Luddens (1998). "The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes." Mol Neurobiol **18**(1): 35-86.

Hill, D. R. and N. G. Bowery (1981). "3H-baclofen and 3H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA B sites in rat brain." Nature **290**(5802): 149-52.

Hillion, J., M. Canals, M. Torvinen, V. Casado, R. Scott, A. Terasmaa, A. Hansson, S. Watson, M. E. Olah, J. Mallol, E. I. Canela, M. Zoli, L. F. Agnati, C. F. Ibanez, C. Lluis, R. Franco, S. Ferre and K. Fuxe (2002). "Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors." J Biol Chem **277**(20): 18091-7.

Hillman, P. and P. D. Wall (1969). "Inhibitory and excitatory factors influencing the receptive fields of lamina 5 spinal cord cells." Exp Brain Res **9**(4): 284-306.

Hlavackova, V., C. Goudet, J. Kniazeff, A. Zikova, D. Maurel, C. Vol, J. Trojanova, L. Prezeau, J. P. Pin and J. Blahos (2005). "Evidence for a single heptahelical domain being turned on upon activation of a dimeric GPCR." Embo J **24**(3): 499-509.

Hokfelt, T., Z. Wiesenfeld-Hallin, M. Villar and T. Melander (1987). "Increase of galanin-like immunoreactivity in rat dorsal root ganglion cells after peripheral axotomy." Neurosci Lett **83**(3): 217-20.

Holm, T., H. Johansson, P. Lundberg, M. Pooga, M. Lindgren and U. Langel (2006). "Studying the uptake of cell-penetrating peptides." Nat Protoc **1**(2): 1001-5.

Hong, Y., Y. Liu, J. G. Chabot, A. Fournier and R. Quirion (2009). "Upregulation of adrenomedullin in the spinal cord and dorsal root ganglia in the early phase of CFA-induced inflammation in rats." Pain.

Hoyer, J., C. Kraus, G. Hammersen, J. P. Geppert and A. Rauch (2009). "Lethal cutis laxa with contractural arachnodactyly, overgrowth and soft tissue bleeding due to a novel homozygous fibulin-4 gene mutation." Clin Genet **76**(3): 276-81.

Hu, J., N. Milenkovic and G. R. Lewin (2006). "The high threshold mechanotransducer: a status report." Pain **120**(1-2): 3-7.

Hunt, S. P. and P. W. Mantyh (2001). "The molecular dynamics of pain control." Nat Rev Neurosci **2**(2): 83-91.

Hwang, J. H. and T. L. Yaksh (1997). "The effect of spinal GABA receptor agonists on tactile allodynia in a surgically-induced neuropathic pain model in the rat." Pain **70**(1): 15-22.

Idanpaan-Heikkila, J. J. and G. Guilbaud (1999). "Pharmacological studies on a rat model of trigeminal neuropathic pain: baclofen, but not carbamazepine, morphine or tricyclic antidepressants, attenuates the allodynia-like behaviour." Pain **79**(2-3): 281-90.

Igawa-Silva, W., S. Wu and R. Harrigan (2007). "Music and cancer pain management." Hawaii Med J **66**(11): 292-5.

Iwata, H., T. Takasusuki, S. Yamaguchi and Y. Hori (2007). "NMDA receptor 2B subunit-mediated synaptic transmission in the superficial dorsal horn of peripheral nerve-injured neuropathic mice." Brain Res **1135**(1): 92-101.

Iyadomi, M., I. Iyadomi, E. Kumamoto, K. Tomokuni and M. Yoshimura (2000). "Presynaptic inhibition by baclofen of miniature EPSCs and IPSCs in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal dorsal horn." Pain **85**(3): 385-93.

Jacobson, L. H., P. H. Kelly, B. Bettler, K. Kaupmann and J. F. Cryan (2006). "GABA(B(1)) receptor isoforms differentially mediate the acquisition and extinction of aversive taste memories." J Neurosci **26**(34): 8800-3.

Jacobson, L. H., P. H. Kelly, B. Bettler, K. Kaupmann and J. F. Cryan (2007). "Specific roles of GABA(B(1)) receptor isoforms in cognition." Behav Brain Res **181**(1): 158-62.

Jaskolski, F. and J. M. Henley (2009). "Synaptic receptor trafficking: the lateral point of view." Neuroscience **158**(1): 19-24.

Jasmin, L. and P. T. Ohara (2001). "Long-term intrathecal catheterization in the rat." J Neurosci Methods **110**(1-2): 81-9.

Jastrzebska, B., D. Fotiadis, G. F. Jang, R. E. Stenkamp, A. Engel and K. Palczewski (2006). "Functional and structural characterization of rhodopsin oligomers." J Biol Chem **281**(17): 11917-22.

John, N., H. Krugel, R. Frischknecht, K. H. Smalla, C. Schultz, M. R. Kreutz, E. D. Gundelfinger and C. I. Seidenbecher (2006). "Brevican-containing perineuronal nets

of extracellular matrix in dissociated hippocampal primary cultures." Mol Cell Neurosci **31**(4): 774-84.
Johnston, G. A. (1996). "GABAc receptors: relatively simple transmitter -gated ion channels?" Trends Pharmacol Sci **17**(9): 319-23.
Jones, K. A., B. Borowsky, J. A. Tamm, D. A. Craig, M. M. Durkin, M. Dai, W. J. Yao, M. Johnson, C. Gunwaldsen, L. Y. Huang, C. Tang, Q. Shen, J. A. Salon, K. Morse, T. Laz, K. E. Smith, D. Nagarathnam, S. A. Noble, T. A. Branchek and C. Gerald (1998). "GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2." Nature **396**(6712): 674-9.
Jones, L. S. (1996). "Integrins: possible functions in the adult CNS." Trends Neurosci **19**(2): 68-72.
Jones, T. L., S. M. Sweitzer, M. C. Peters, S. P. Wilson and D. C. Yeomans (2005). "GABAB receptors on central terminals of C-afferents mediate intersegmental Adelta-afferent evoked hypoalgesia." Eur J Pain **9**(3): 233-42.
Jordan, B. A. and L. A. Devi (1999). "G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function." Nature **399**(6737): 697-700.
Jordan, B. A., N. Trapaidze, I. Gomes, R. Nivarthi and L. A. Devi (2001). "Oligomerization of opioid receptors with beta 2-adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(1): 343-8.
Jorum, E., T. Warncke and A. Stubhaug (2003). "Cold allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: the effect of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist ketamine--a double-blind, cross-over comparison with alfentanil and placebo." Pain **101**(3): 229-35.
Julien, N., P. Goffaux, P. Arsenault and S. Marchand (2005). "Widespread pain in fibromyalgia is related to a deficit of endogenous pain inhibition." Pain **114**(1-2): 295-302.
Julius, D. and A. I. Basbaum (2001). "Molecular mechanisms of nociception." Nature **413**(6852): 203-10.
Kalliomaki, M. L., J. Meyerson, U. Gunnarsson, T. Gordh and G. Sandblom (2008). "Long-term pain after inguinal hernia repair in a population-based cohort; risk factors and interference with daily activities." Eur J Pain **12**(2): 214-25.
Kalmar, B., L. Greensmith, M. Malcangio, S. B. McMahon, P. Csermely and G. Burnstock (2003). "The effect of treatment with BRX-220, a co-inducer of heat shock proteins, on sensory fibers of the rat following peripheral nerve injury." Exp Neurol **184**(2): 636-47.
Kammerer, R. A., S. Frank, T. Schulthess, R. Landwehr, A. Lustig and J. Engel (1999). "Heterodimerization of a functional GABAB receptor is mediated by parallel coiled-coil alpha-helices." Biochemistry **38**(40): 13263-9.
Kangrga, I., M. C. Jiang and M. Randic (1991). "Actions of (-)-baclofen on rat dorsal horn neurons." Brain Res **562**(2): 265-75.
Karpa, K. D., R. Lin, N. Kabbani and R. Levenson (2000). "The dopamine D3 receptor interacts with itself and the truncated D3 splice variant d3nf: D3-D3nf interaction causes mislocalization of D3 receptors." Mol Pharmacol **58**(4): 677-83.
Kato, G., T. Yasaka, T. Katafuchi, H. Furue, M. Mizuno, Y. Iwamoto and M. Yoshimura (2006). "Direct GABAergic and glycinergic inhibition of the substantia gelatinosa from the rostral ventromedial medulla revealed by in vivo patch-clamp analysis in rats." J Neurosci **26**(6): 1787-94.
Katz, N. (2000). "Neuropathic pain in cancer and AIDS." Clin J Pain **16**(2 Suppl): S41-8.
Kaupmann, K., J. F. Cryan, P. Wellendorph, C. Mombereau, G. Sansig, K. Klebs, M. Schmutz, W. Froestl, H. van der Putten, J. Mosbacher, H. Brauner-Osborne, P. Waldmeier and B. Bettler (2003). "Specific gamma-hydroxybutyrate-binding sites but loss of pharmacological effects of gamma-hydroxybutyrate in GABA(B)(1)-deficient mice." Eur J Neurosci **18**(10): 2722-30.

Kaupmann, K., K. Huggel, J. Heid, P. J. Flor, S. Bischoff, S. J. Mickel, G. McMaster, C. Angst, H. Bittiger, W. Froestl and B. Bettler (1997). "Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors." Nature **386**(6622): 239-46.

Kaupmann, K., B. Malitschek, V. Schuler, J. Heid, W. Froestl, P. Beck, J. Mosbacher, S. Bischoff, A. Kulik, R. Shigemoto, A. Karschin and B. Bettler (1998). "GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes." Nature **396**(6712): 683-7.

Kawasaki, Y., T. Kohno, Z. Y. Zhuang, G. J. Brenner, H. Wang, C. Van Der Meer, K. Befort, C. J. Woolf and R. R. Ji (2004). "Ionotropic and metabotropic receptors, protein kinase A, protein kinase C, and Src contribute to C-fiber-induced ERK activation and cAMP response element-binding protein phosphorylation in dorsal horn neurons, leading to central sensitization." J Neurosci **24**(38): 8310-21.

Kellenberger, E., R. Johansen, M. Maeder, B. Bohrmann, E. Stauffer and W. Villiger (1992). "Artefacts and morphological changes during chemical fixation." J Microsc **168**(Pt 2): 181-201.

Keller, A. F., S. Beggs, M. W. Salter and Y. De Koninck (2007). "Transformation of the output of spinal lamina I neurons after nerve injury and microglia stimulation underlying neuropathic pain." Mol Pain **3**: 27.

Kerr, D. I. and J. Ong (1995). "GABAB receptors." Pharmacol Ther **67**(2): 187-246.

Ketz, A. K. (2008). "Pain management in the traumatic amputee." Crit Care Nurs Clin North Am **20**(1): 51-7, vi.

Kim, J., J. H. Kim, Y. Kim, H. Y. Cho, S. K. Hong and Y. W. Yoon (2009). "Role of spinal cholecystokinin in neuropathic pain after spinal cord hemisection in rats." Neurosci Lett **462**(3): 303-7.

Kim, K. J., Y. W. Yoon and J. M. Chung (1997). "Comparison of three rodent neuropathic pain models." Exp Brain Res **113**(2): 200-6.

Kim, S. H. and J. M. Chung (1992). "An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat." Pain **50**(3): 355-63.

Kitamura, Y., Y. Matsuka, I. Spigelman, Y. Ishihara, Y. Yamamoto, W. Sonoyama, H. Kamioka, T. Yamashiro, T. Kuboki and K. Oguma (2009). "Botulinum toxin type a (150 kDa) decreases exaggerated neurotransmitter release from trigeminal ganglion neurons and relieves neuropathy behaviors induced by infraorbital nerve constriction." Neuroscience **159**(4): 1422-9.

Klepstad, P., P. Borchgrevink, B. Hval, S. Flaat and S. Kaasa (2001). "Long-term treatment with ketamine in a 12-year-old girl with severe neuropathic pain caused by a cervical spinal tumor." J Pediatr Hematol Oncol **23**(9): 616-9.

Kniazeff, J., T. Galvez, G. Labesse and J. P. Pin (2002). "No ligand binding in the GB2 subunit of the GABA(B) receptor is required for activation and allosteric interaction between the subunits." J Neurosci **22**(17): 7352-61.

Kniazeff, J., P. P. Saintot, C. Goudet, J. Liu, A. Charnet, G. Guillon and J. P. Pin (2004). "Locking the dimeric GABA(B) G-protein-coupled receptor in its active state." J Neurosci **24**(2): 370-7.

Ko, S. H., N. Jochnowitz, P. W. Lenkowski, T. W. Batts, G. C. Davis, W. J. Martin, M. L. Brown and M. K. Patel (2006). "Reversal of neuropathic pain by alpha-hydroxyphenylamide: a novel sodium channel antagonist." Neuropharmacology **50**(7): 865-73.

Kohno, T., R. R. Ji, N. Ito, A. J. Allchorne, K. Befort, L. A. Karchewski and C. J. Woolf (2005). "Peripheral axonal injury results in reduced mu opioid receptor pre- and post-synaptic action in the spinal cord." Pain **117**(1-2): 77-87.

Kohno, T., K. A. Moore, H. Baba and C. J. Woolf (2003). "Peripheral nerve injury alters excitatory synaptic transmission in lamina II of the rat dorsal horn." J Physiol **548**(Pt 1): 131-8.

Koppe, G., G. Bruckner, K. Brauer, W. Hartig and V. Bigl (1997). "Developmental patterns of proteoglycan-containing extracellular matrix in perineuronal nets and neuropil of the postnatal rat brain." Cell Tissue Res **288**(1): 33-41.

Kremer, J. R., D. N. Mastronarde and J. R. McIntosh (1996). "Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD." J Struct Biol **116**(1): 71-6.

Kulik, A., I. Vida, R. Lujan, C. A. Haas, G. Lopez-Bendito, R. Shigemoto and M. Frotscher (2003). "Subcellular localization of metabotropic GABA(B) receptor subunits GABA(B1a/b) and GABA(B2) in the rat hippocampus." J Neurosci **23**(35): 11026-35.

Kuner, R., G. Kohr, S. Grunewald, G. Eisenhardt, A. Bach and H. C. Kornau (1999). "Role of heteromer formation in GABAB receptor function." Science **283**(5398): 74-7.

Kunishima, N., Y. Shimada, Y. Tsuji, T. Sato, M. Yamamoto, T. Kumasaka, S. Nakanishi, H. Jingami and K. Morikawa (2000). "Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor." Nature **407**(6807): 971-7.

Kupers, R., W. Yu, J. K. Persson, X. J. Xu and Z. Wiesenfeld-Hallin (1998). "Photochemically-induced ischemia of the rat sciatic nerve produces a dose-dependent and highly reproducible mechanical, heat and cold allodynia, and signs of spontaneous pain." Pain **76**(1-2): 45-59.

Labrakakis, C., L. E. Lorenzo, C. Bories, A. Ribeiro-da-Silva and Y. De Koninck (2009). "Inhibitory coupling between inhibitory interneurons in the spinal cord dorsal horn." Mol Pain **5**(1): 24.

Laffray, S., K. Tan, J. Dulluc, R. Bouali-Benazzouz, A. R. Calver, F. Nagy and M. Landry (2007). "Dissociation and trafficking of rat GABAB receptor heterodimer upon chronic capsaicin stimulation." Eur J Neurosci **25**(5): 1402-16.

Lai, J., M. S. Gold, C. S. Kim, D. Bian, M. H. Ossipov, J. C. Hunter and F. Porreca (2002). "Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, NaV1.8." Pain **95**(1-2): 143-52.

Lancelotta, M. P., R. N. Sheth, R. A. Meyer, A. J. Belzberg, J. W. Griffin and J. N. Campbell (2003). "Severity and duration of hyperalgesia in rat varies with type of nerve lesion." Neurosurgery **53**(5): 1200-8; discussion 1208-9.

Landis, D. M., A. K. Hall, L. A. Weinstein and T. S. Reese (1988). "The organization of cytoplasm at the presynaptic active zone of a central nervous system synapse." Neuron **1**(3): 201-9.

Lang, J., M. Fukuda, H. Zhang, K. Mikoshiba and C. B. Wollheim (1997). "The first C2 domain of synaptotagmin is required for exocytosis of insulin from pancreatic beta-cells: action of synaptotagmin at low micromolar calcium." Embo J **16**(19): 5837-46.

Lapirot, O., R. Chebbi, L. Monconduit, A. Artola, R. Dallel and P. Luccarini (2009). "NK1 receptor-expressing spinoparabrachial neurons trigger diffuse noxious inhibitory controls through lateral parabrachial activation in the male rat." Pain **142**(3): 245-54.

Latarjet, J. (2002). "[The pain from burns]." Pathol Biol (Paris) **50**(2): 127-33.

Lavoie, C., J. F. Mercier, A. Salahpour, D. Umapathy, A. Breit, L. R. Villeneuve, W. Z. Zhu, R. P. Xiao, E. G. Lakatta, M. Bouvier and T. E. Hebert (2002). "Beta 1/beta 2-adrenergic receptor heterodimerization regulates beta 2-adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy." J Biol Chem **277**(38): 35402-10.

Le Bars, D., D. Chitour, E. Kraus, A. M. Clot, A. H. Dickenson and J. M. Besson (1981). "The effect of systemic morphine upon diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in the rat: evidence for a lifting of certain descending inhibitory controls of dorsal horn convergent neurones." Brain Res **215**(1-2): 257-74.

Le Bars, D., A. H. Dickenson and J. M. Besson (1979). "Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat." Pain **6**(3): 283-304.

Le Bars, D., A. H. Dickenson and J. M. Besson (1979). "Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). II. Lack of effect on non-convergent neurones, supraspinal involvement and theoretical implications." Pain **6**(3): 305-27.

Lee, B. H., R. Won, E. J. Baik, S. H. Lee and C. H. Moon (2000). "An animal model of neuropathic pain employing injury to the sciatic nerve branches." Neuroreport **11**(4): 657-61.

Lehmann, A., J. P. Mattsson, A. Edlund, T. Johansson and A. J. Ekstrand (2003). "Effects of repeated administration of baclofen to rats on GABAB receptor binding sites and subunit expression in the brain." Neurochem Res **28**(2): 387-93.

Lehtinen, M. J., S. Meri and T. S. Jokiranta (2004). "Interdomain contact regions and angles between adjacent short consensus repeat domains." J Mol Biol **344**(5): 1385-96.

Lever, I., J. Cunningham, J. Grist, P. K. Yip and M. Malcangio (2003). "Release of BDNF and GABA in the dorsal horn of neuropathic rats." Eur J Neurosci **18**(5): 1169-74.

Li, C. Y., Y. H. Song, E. S. Higuera and Z. D. Luo (2004). "Spinal dorsal horn calcium channel alpha2delta-1 subunit upregulation contributes to peripheral nerve injury-induced tactile allodynia." J Neurosci **24**(39): 8494-9.

Lind, G., B. A. Meyerson, J. Winter and B. Linderoth (2004). "Intrathecal baclofen as adjuvant therapy to enhance the effect of spinal cord stimulation in neuropathic pain: a pilot study." Eur J Pain **8**(4): 377-83.

Lindenlaub, T. and C. Sommer (2000). "Partial sciatic nerve transection as a model of neuropathic pain: a qualitative and quantitative neuropathological study." Pain **89**(1): 97-106.

Lindsay, T. H., B. M. Jonas, M. A. Sevcik, K. Kubota, K. G. Halvorson, J. R. Ghilardi, M. A. Kuskowski, E. B. Stelow, P. Mukherjee, S. J. Gendler, G. Y. Wong and P. W. Mantyh (2005). "Pancreatic cancer pain and its correlation with changes in tumor vasculature, macrophage infiltration, neuronal innervation, body weight and disease progression." Pain **119**(1-3): 233-46.

Lingenhoehl, K., R. Brom, J. Heid, P. Beck, W. Froestl, K. Kaupmann, B. Bettler and J. Mosbacher (1999). "Gamma-hydroxybutyrate is a weak agonist at recombinant GABA(B) receptors." Neuropharmacology **38**(11): 1667-73.

Lingueglia, E. (2007). "Acid-sensing ion channels in sensory perception." J Biol Chem **282**(24): 17325-9.

Lippincott-Schwartz, J., E. Snapp and A. Kenworthy (2001). "Studying protein dynamics in living cells." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(6): 444-56.

Liu, H. X. and T. Hokfelt (2002). "The participation of galanin in pain processing at the spinal level." Trends Pharmacol Sci **23**(10): 468-74.

Liu, X. J., J. R. Gingrich, M. Vargas-Caballero, Y. N. Dong, A. Sengar, S. Beggs, S. H. Wang, H. K. Ding, P. W. Frankland and M. W. Salter (2008). "Treatment of inflammatory and neuropathic pain by uncoupling Src from the NMDA receptor complex." Nat Med **14**(12): 1325-32.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-8.

Loubser, P. G. and N. M. Akman (1996). "Effects of intrathecal baclofen on chronic spinal cord injury pain." J Pain Symptom Manage **12**(4): 241-7.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-75.

Lucic, V., A. Leis and W. Baumeister (2008). "Cryo-electron tomography of cells: connecting structure and function." Histochem Cell Biol **130**(2): 185-96.

Lujan, R. (2007). "Subcellular regulation of metabotropic GABA receptors in the developing cerebellum." Cerebellum **6**(2): 123-9.

Lujan, R. and R. Shigemoto (2006). "Localization of metabotropic GABA receptor subunits GABAB1 and GABAB2 relative to synaptic sites in the rat developing cerebellum." Eur J Neurosci **23**(6): 1479-90.

Lujan, R., R. Shigemoto, A. Kulik and J. M. Juiz (2004). "Localization of the GABAB receptor 1a/b subunit relative to glutamatergic synapses in the dorsal cochlear nucleus of the rat." J Comp Neurol **475**(1): 36-46.

Lundberg, M. and M. Johansson (2002). "Positively charged DNA-binding proteins cause apparent cell membrane translocation." Biochem Biophys Res Commun **291**(2): 367-71.

Luo, D. and W. M. Saltzman (2000). "Synthetic DNA delivery systems." Nat Biotechnol **18**(1): 33-7.

Luscher, C., L. Y. Jan, M. Stoffel, R. C. Malenka and R. A. Nicoll (1997). "G protein-coupled inwardly rectifying K+ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons." Neuron **19**(3): 687-95.

Lushnikova, I. V., I. R. Nikonenko, O. H. Nikonenko and H. H. Skibo (2008). "[Spatial distribution of synaptic vesicles in CA1 hippocampal synapses under conditions of induced long-term potentiation in vitro]." Fiziol Zh **54**(1): 35-44.

Mackintosh, C. (2004). "Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes." Biochem J **381**(Pt 2): 329-42.

Maggio, R., P. Barbier, A. Colelli, F. Salvadori, G. Demontis and G. U. Corsini (1999). "G protein-linked receptors: pharmacological evidence for the formation of heterodimers." J Pharmacol Exp Ther **291**(1): 251-7.

Maggio, R., F. Novi, M. Scarselli and G. U. Corsini (2005). "The impact of G-protein-coupled receptor hetero-oligomerization on function and pharmacology." Febs J **272**(12): 2939-46.

Magnaghi, V., M. Ballabio, F. Camozzi, M. Colleoni, A. Consoli, M. Gassmann, G. Lauria, M. Motta, P. Procacci, A. E. Trovato and B. Bettler (2008). "Altered peripheral myelination in mice lacking GABAB receptors." Mol Cell Neurosci **37**(3): 599-609.

Maguire, M. F., A. Ravenscroft, D. Beggs and J. P. Duffy (2006). "A questionnaire study investigating the prevalence of the neuropathic component of chronic pain after thoracic surgery." Eur J Cardiothorac Surg **29**(5): 800-5.

Malcangio, M. and N. G. Bowery (1996). "GABA and its receptors in the spinal cord." Trends Pharmacol Sci **17**(12): 457-62.

Malcangio, M. and D. R. Tomlinson (1998). "A pharmacologic analysis of mechanical hyperalgesia in streptozotocin/diabetic rats." Pain **76**(1-2): 151-7.

Malitschek, B., C. Schweizer, M. Keir, J. Heid, W. Froestl, J. Mosbacher, R. Kuhn, J. Henley, C. Joly, J. P. Pin, K. Kaupmann and B. Bettler (1999). "The N-terminal domain of gamma-aminobutyric Acid(B) receptors is sufficient to specify agonist and antagonist binding." Mol Pharmacol **56**(2): 448-54.

Manning, J. P., D. A. Richards and N. G. Bowery (2003). "Pharmacology of absence epilepsy." Trends Pharmacol Sci **24**(10): 542-9.

Margeta-Mitrovic, M., Y. N. Jan and L. Y. Jan (2000). "A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization." Neuron **27**(1): 97-106.

Markman, J. D. and R. H. Dworkin (2006). "Ion channel targets and treatment efficacy in neuropathic pain." J Pain **7**(1 Suppl 1): S38-47.

Marshall, F. H., J. White, M. Main, A. Green and A. Wise (1999). "GABA(B) receptors function as heterodimers." Biochem Soc Trans **27**(4): 530-5.

Marshall, O. J. (2004). "PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR." Bioinformatics **20**(15): 2471-2.

Matsuzawa-Yanagida, K., M. Narita, M. Nakajima, N. Kuzumaki, K. Niikura, H. Nozaki, T. Takagi, E. Tamai, N. Hareyama, M. Terada, M. Yamazaki and T. Suzuki (2008). "Usefulness of antidepressants for improving the neuropathic pain-like state and pain-induced anxiety through actions at different brain sites." Neuropsychopharmacology **33**(8): 1952-65.

Maurel, D., L. Comps-Agrar, C. Brock, M. L. Rives, E. Bourrier, M. A. Ayoub, H. Bazin, N. Tinel, T. Durroux, L. Prezeau, E. Trinquet and J. P. Pin (2008). "Cell-surface protein-

protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization." Nat Methods **5**(6): 561-7.
McCormick, D. A. (1989). "GABA as an inhibitory neurotransmitter in human cerebral cortex." J Neurophysiol **62**(5): 1018-27.
McGivern, J. G. (2006). "Targeting N-type and T-type calcium channels for the treatment of pain." Drug Discov Today **11**(5-6): 245-53.
McGraw, D. W., K. A. Mihlbachler, M. R. Schwarb, F. F. Rahman, K. M. Small, K. F. Almoosa and S. B. Liggett (2006). "Airway smooth muscle prostaglandin-EP1 receptors directly modulate beta2-adrenergic receptors within a unique heterodimeric complex." J Clin Invest **116**(5): 1400-9.
McLatchie, L. M., N. J. Fraser, M. J. Main, A. Wise, J. Brown, N. Thompson, R. Solari, M. G. Lee and S. M. Foord (1998). "RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor." Nature **393**(6683): 333-9.
McQuay, H. J., M. Tramer, B. A. Nye, D. Carroll, P. J. Wiffen and R. A. Moore (1996). "A systematic review of antidepressants in neuropathic pain." Pain **68**(2-3): 217-27.
Medhurst, S. J., K. Walker, M. Bowes, B. L. Kidd, M. Glatt, M. Muller, M. Hattenberger, J. Vaxelaire, T. O'Reilly, G. Wotherspoon, J. Winter, J. Green and L. Urban (2002). "A rat model of bone cancer pain." Pain **96**(1-2): 129-40.
Mellado, M., J. M. Rodriguez-Frade, A. J. Vila-Coro, S. Fernandez, A. Martin de Ana, D. R. Jones, J. L. Toran and A. C. Martinez (2001). "Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways." Embo J **20**(10): 2497-507.
Melzack, R. and P. D. Wall (1965). "Pain mechanisms: a new theory." Science **150**(699): 971-9.
Mendell, L. M. and P. D. Wall (1965). "Responses of Single Dorsal Cord Cells to Peripheral Cutaneous Unmyelinated Fibres." Nature **206**: 97-9.
Meryman, H. T. (2007). "Cryopreservation of living cells: principles and practice." Transfusion **47**(5): 935-45.
Mhawech, P. (2005). "14-3-3 proteins--an update." Cell Res **15**(4): 228-36.
Michaelides, M., S. A. Jenkins, M. A. Brantley, Jr., R. M. Andrews, N. Waseem, V. Luong, K. Gregory-Evans, S. S. Bhattacharya, F. W. Fitzke and A. R. Webster (2006). "Maculopathy due to the R345W substitution in fibulin-3: distinct clinical features, disease variability, and extent of retinal dysfunction." Invest Ophthalmol Vis Sci **47**(7): 3085-97.
Mico, J. A., D. Ardid, E. Berrocoso and A. Eschalier (2006). "Antidepressants and pain." Trends Pharmacol Sci **27**(7): 348-54.
Miesenbock, G., D. A. De Angelis and J. E. Rothman (1998). "Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins." Nature **394**(6689): 192-5.
Mikasova, L., L. Groc, D. Choquet and O. J. Manzoni (2008). "Altered surface trafficking of presynaptic cannabinoid type 1 receptor in and out synaptic terminals parallels receptor desensitization." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(47): 18596-601.
Miller, D. G., M. A. Adam and A. D. Miller (1990). "Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection." Mol Cell Biol **10**(8): 4239-42.
Milligan, E. D. and L. R. Watkins (2009). "Pathological and protective roles of glia in chronic pain." Nat Rev Neurosci **10**(1): 23-36.
Milligan, G. and M. Bouvier (2005). "Methods to monitor the quaternary structure of G protein-coupled receptors." Febs J **272**(12): 2914-25.
Milligan, G., M. Canals, J. D. Pediani, J. Ellis and J. F. Lopez-Gimenez (2006). "The role of GPCR dimerisation/oligomerisation in receptor signalling." Ernst Schering Found Symp Proc(2): 145-61.
Miraucourt, L. S., R. Dallel and D. L. Voisin (2007). "Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through PKCgamma interneurons." PLoS One **2**(11): e1116.

Miraucourt, L. S., X. Moisset, R. Dallel and D. L. Voisin (2009). "Glycine inhibitory dysfunction induces a selectively dynamic, morphine-resistant, and neurokinin 1 receptor- independent mechanical allodynia." J Neurosci **29**(8): 2519-27.
Mogil, J. S. (2009). "Animal models of pain: progress and challenges." Nat Rev Neurosci **10**(4): 283-94.
Mogil, J. S. and S. E. Crager (2004). "What should we be measuring in behavioral studies of chronic pain in animals?" Pain **112**(1-2): 12-5.
Mombereau, C., K. Kaupmann, M. Gassmann, B. Bettler, H. van der Putten and J. F. Cryan (2005). "Altered anxiety and depression-related behaviour in mice lacking GABAB(2) receptor subunits." Neuroreport **16**(3): 307-10.
Montagne-Clavel, J. and J. L. Oliveras (1996). "The "plantar test" apparatus (Ugo Basile Biological Apparatus), a controlled infrared noxious radiant heat stimulus for precise withdrawal latency measurement in the rat, as a tool for humans?" Somatosens Mot Res **13**(3-4): 215-23.
Moor, H., G. Bellin, C. Sandri and K. Akert (1980). "The influence of high pressure freezing on mammalian nerve tissue." Cell Tissue Res **209**(2): 201-16.
Moore, K. A., H. Baba and C. J. Woolf (2000). "Synaptic transmission and plasticity in the superficial dorsal horn." Prog Brain Res **129**: 63-80.
Moore, K. A., T. Kohno, L. A. Karchewski, J. Scholz, H. Baba and C. J. Woolf (2002). "Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord." J Neurosci **22**(15): 6724-31.
Moore, B., VJ. Perez (1967). In: Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration (Carlson FD, ed), pp 343-359. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
Morisset, V. and F. Nagy (1999). "Ionic basis for plateau potentials in deep dorsal horn neurons of the rat spinal cord." J Neurosci **19**(17): 7309-16.
Morisset, V. and F. Nagy (2000). "Plateau potential-dependent windup of the response to primary afferent stimuli in rat dorsal horn neurons." Eur J Neurosci **12**(9): 3087-95.
Muff, R., N. Buhlmann, J. A. Fischer and W. Born (1999). "An amylin receptor is revealed following co-transfection of a calcitonin receptor with receptor activity modifying proteins-1 or -3." Endocrinology **140**(6): 2924-7.
Narsinghani, U. and K. J. Anand (2000). "Developmental Neurobiology of Pain in Neonatal Rats." Lab Anim (NY) **29**(9): 27-39.
Nassar, M. A., M. D. Baker, A. Levato, R. Ingram, G. Mallucci, S. B. McMahon and J. N. Wood (2006). "Nerve injury induces robust allodynia and ectopic discharges in Nav1.3 null mutant mice." Mol Pain **2**: 33.
Nasu-Tada, K., S. Koizumi, M. Tsuda, E. Kunifusa and K. Inoue (2006). "Possible involvement of increase in spinal fibronectin following peripheral nerve injury in upregulation of microglial P2X4, a key molecule for mechanical allodynia." Glia **53**(7): 769-75.
Navarro, X., M. Vivo and A. Valero-Cabre (2007). "Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration." Prog Neurobiol **82**(4): 163-201.
Nelson, G., J. Chandrashekar, M. A. Hoon, L. Feng, G. Zhao, N. J. Ryba and C. S. Zuker (2002). "An amino-acid taste receptor." Nature **416**(6877): 199-202.
Nelson, G., M. A. Hoon, J. Chandrashekar, Y. Zhang, N. J. Ryba and C. S. Zuker (2001). "Mammalian sweet taste receptors." Cell **106**(3): 381-90.
Neubig, R. R., M. Spedding, T. Kenakin and A. Christopoulos (2003). "International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology." Pharmacol Rev **55**(4): 597-606.
Neumann, S., J. M. Braz, K. Skinner, I. J. Llewellyn-Smith and A. I. Basbaum (2008). "Innocuous, not noxious, input activates PKCgamma interneurons of the spinal dorsal horn via myelinated afferent fibers." J Neurosci **28**(32): 7936-44.

Nguyen, D., P. Deng, E. A. Matthews, D. S. Kim, G. Feng, A. H. Dickenson, Z. C. Xu and Z. D. Luo (2009). "Enhanced pre-synaptic glutamate release in deep-dorsal horn contributes to calcium channel alpha-2-delta-1 protein-mediated spinal sensitization and behavioral hypersensitivity." Mol Pain **5**: 6.

Noguchi, H. and S. Matsumoto (2006). "Protein transduction technology: a novel therapeutic perspective." Acta Med Okayama **60**(1): 1-11.

Noordenbos, W. (1959) Pain. Amsterdam: Elsevier.

Obata, H., S. Saito, M. Sasaki and F. Goto (2003). "Interactions of 5-HT2 receptor agonists with acetylcholine in spinal analgesic mechanisms in rats with neuropathic pain." Brain Res **965**(1-2): 114-20.

Olson, G. A., R. D. Olson and A. J. Kastin (1995). "Endogenous opiates: 1994." Peptides **16**(8): 1517-55.

Oyadomari, S., A. Koizumi, K. Takeda, T. Gotoh, S. Akira, E. Araki and M. Mori (2002). "Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes." J Clin Invest **109**(4): 525-32.

Oyadomari, S. and M. Mori (2004). "Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress." Cell Death Differ **11**(4): 381-9.

Pagano, A., G. Rovelli, J. Mosbacher, T. Lohmann, B. Duthey, D. Stauffer, D. Ristig, V. Schuler, I. Meigel, C. Lampert, T. Stein, L. Prezeau, J. Blahos, J. Pin, W. Froestl, R. Kuhn, J. Heid, K. Kaupmann and B. Bettler (2001). "C-terminal interaction is essential for surface trafficking but not for heteromeric assembly of GABA(b) receptors." J Neurosci **21**(4): 1189-202.

Palade, G. E. and K. R. Porter (1954). "Studies on the endoplasmic reticulum. I. Its identification in cells in situ." J Exp Med **100**(6): 641-56.

Pan, H. L., Z. Z. Wu, H. Y. Zhou, S. R. Chen, H. M. Zhang and D. P. Li (2008). "Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors." Pharmacol Ther **117**(1): 141-61.

Papazian, D. M. (1999). "Potassium channels: some assembly required." Neuron **23**(1): 7-10.

Parthier, C., M. Kleinschmidt, P. Neumann, R. Rudolph, S. Manhart, D. Schlenzig, J. Fanghanel, J. U. Rahfeld, H. U. Demuth and M. T. Stubbs (2007). "Crystal structure of the incretin-bound extracellular domain of a G protein-coupled receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(35): 13942-7.

Patel, S., S. Naeem, A. Kesingland, W. Froestl, M. Capogna, L. Urban and A. Fox (2001). "The effects of GABA(B) agonists and gabapentin on mechanical hyperalgesia in models of neuropathic and inflammatory pain in the rat." Pain **90**(3): 217-26.

Pease, D. C. and K. R. Porter (1981). "Electron microscopy and ultramicrotomy." J Cell Biol **91**(3 Pt 2): 287s-292s.

Perez, D. M. and S. S. Karnik (2005). "Multiple signaling states of G-protein-coupled receptors." Pharmacol Rev **57**(2): 147-61.

Perez-Garci, E., M. Gassmann, B. Bettler and M. E. Larkum (2006). "The GABAB1b isoform mediates long-lasting inhibition of dendritic Ca2+ spikes in layer 5 somatosensory pyramidal neurons." Neuron **50**(4): 603-16.

Pernia-Andrade, A. J., A. Kato, R. Witschi, R. Nyilas, I. Katona, T. F. Freund, M. Watanabe, J. Filitz, W. Koppert, J. Schuttler, G. Ji, V. Neugebauer, G. Marsicano, B. Lutz, H. Vanegas and H. U. Zeilhofer (2009). "Spinal endocannabinoids and CB1 receptors mediate C-fiber-induced heterosynaptic pain sensitization." Science **325**(5941): 760-4.

Perroy, J., L. Adam, R. Qanbar, S. Chenier and M. Bouvier (2003). "Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4." Embo J **22**(15): 3816-24.

Petaja-Repo, U. E., M. Hogue, A. Laperriere, P. Walker and M. Bouvier (2000). "Export from the endoplasmic reticulum represents the limiting step in the maturation and cell surface expression of the human delta opioid receptor." J Biol Chem **275**(18): 13727-36.

Pfeiffer, M., T. Koch, H. Schroder, M. Laugsch, V. Hollt and S. Schulz (2002). "Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization." J Biol Chem **277**(22): 19762-72.

Pfleger, K. D., J. R. Dromey, M. B. Dalrymple, E. M. Lim, W. G. Thomas and K. A. Eidne (2006). "Extended bioluminescence resonance energy transfer (eBRET) for monitoring prolonged protein-protein interactions in live cells." Cell Signal **18**(10): 1664-70.

Pfleger, K. D. and K. A. Eidne (2005). "Monitoring the formation of dynamic G-protein-coupled receptor-protein complexes in living cells." Biochem J **385**(Pt 3): 625-37.

Pfleger, K. D., R. M. Seeber and K. A. Eidne (2006). "Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the real-time detection of protein-protein interactions." Nat Protoc **1**(1): 337-45.

Pin, J. P., L. Comps-Agrar, D. Maurel, M. L. Rives, E. Trinquet, J. Kniazeff, P. Rondard and L. Prezeau (2009). "GPCR oligomers: two or more for what? Lessons from mGlu and GABAB receptors." J Physiol.

Pin, J. P., J. Kniazeff, V. Binet, J. Liu, D. Maurel, T. Galvez, B. Duthey, M. Havlickova, J. Blahos, L. Prezeau and P. Rondard (2004). "Activation mechanism of the heterodimeric GABA(B) receptor." Biochem Pharmacol **68**(8): 1565-72.

Pin, J. P., J. Kniazeff, C. Goudet, A. S. Bessis, J. Liu, T. Galvez, F. Acher, P. Rondard and L. Prezeau (2004). "The activation mechanism of class-C G-protein coupled receptors." Biol Cell **96**(5): 335-42.

Pin, J. P. and L. Prezeau (2007). "Allosteric Modulators of GABA(B) Receptors: Mechanism of Action and Therapeutic Perspective." Curr Neuropharmacol **5**(3): 195-201.

Piscaglia, F., J. Dudas, T. Knittel, P. Di Rocco, D. Kobold, B. Saile, M. A. Zocco, R. Timpl and G. Ramadori (2009). "Expression of ECM proteins fibulin-1 and -2 in acute and chronic liver disease and in cultured rat liver cells." Cell Tissue Res **337**(3): 449-62.

Pizzorusso, T., P. Medini, N. Berardi, S. Chierzi, J. W. Fawcett and L. Maffei (2002). "Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex." Science **298**(5596): 1248-51.

Polgar, E., J. H. Fowler, M. M. McGill and A. J. Todd (1999). "The types of neuron which contain protein kinase C gamma in rat spinal cord." Brain Res **833**(1): 71-80.

Polgar, E., D. I. Hughes, A. Z. Arham and A. J. Todd (2005). "Loss of neurons from laminas I-III of the spinal dorsal horn is not required for development of tactile allodynia in the spared nerve injury model of neuropathic pain." J Neurosci **25**(28): 6658-66.

Polgar, E., D. I. Hughes, J. S. Riddell, D. J. Maxwell, Z. Puskar and A. J. Todd (2003). "Selective loss of spinal GABAergic or glycinergic neurons is not necessary for development of thermal hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain." Pain **104**(1-2): 229-39.

Polgar, E. and A. J. Todd (2008). "Tactile allodynia can occur in the spared nerve injury model in the rat without selective loss of GABA or GABA(A) receptors from synapses in laminae I-II of the ipsilateral spinal dorsal horn." Neuroscience **156**(1): 193-202.

Pooga, M. and U. Langel (2005). "Synthesis of cell-penetrating peptides for cargo delivery." Methods Mol Biol **298**: 77-89.

Pooler, A. M., A. G. Gray and R. A. McIlhinney (2009). "Identification of a novel region of the GABA(B2) C-terminus that regulates surface expression and neuronal targeting of the GABA(B) receptor." Eur J Neurosci **29**(5): 869-78.

Pooler, A. M. and R. A. McIlhinney (2007). "Lateral diffusion of the GABAB receptor is regulated by the GABAB2 C terminus." J Biol Chem **282**(35): 25349-56.

Poyner, D. R., P. M. Sexton, I. Marshall, D. M. Smith, R. Quirion, W. Born, R. Muff, J. A. Fischer and S. M. Foord (2002). "International Union of Pharmacology. XXXII. The

mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors." Pharmacol Rev **54**(2): 233-46.
Pozuelo Rubio, M., K. M. Geraghty, B. H. Wong, N. T. Wood, D. G. Campbell, N. Morrice and C. Mackintosh (2004). "14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking." Biochem J **379**(Pt 2): 395-408.
Price, D. D. (2000). "Psychological and neural mechanisms of the affective dimension of pain." Science **288**(5472): 1769-72.
Price, D. D., J. D. Greenspan and R. Dubner (2003). "Neurons involved in the exteroceptive function of pain." Pain **106**(3): 215-9.
Price, G. W., G. P. Wilkin, M. J. Turnbull and N. G. Bowery (1984). "Are baclofen-sensitive GABAB receptors present on primary afferent terminals of the spinal cord?" Nature **307**(5946): 71-4.
Price, M. P., S. L. McIlwrath, J. Xie, C. Cheng, J. Qiao, D. E. Tarr, K. A. Sluka, T. J. Brennan, G. R. Lewin and M. J. Welsh (2001). "The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice." Neuron **32**(6): 1071-83.
Priestley, J. V. (2007). "Promoting anatomical plasticity and recovery of function after traumatic injury to the central or peripheral nervous system." Brain **130**(Pt 4): 895-7.
Qi, T., G. Christopoulos, R. J. Bailey, A. Christopoulos, P. M. Sexton and D. L. Hay (2008). "Identification of N-terminal receptor activity-modifying protein residues important for calcitonin gene-related peptide, adrenomedullin, and amylin receptor function." Mol Pharmacol **74**(4): 1059-71.
Rahman, W., R. D'Mello and A. H. Dickenson (2008). "Peripheral nerve injury-induced changes in spinal alpha(2)-adrenoceptor-mediated modulation of mechanically evoked dorsal horn neuronal responses." J Pain **9**(4): 350-9.
Raij, T. T., J. Numminen, S. Narvanen, J. Hiltunen and R. Hari (2005). "Brain correlates of subjective reality of physically and psychologically induced pain." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(6): 2147-51.
Rajan, S., R. Preisig-Muller, E. Wischmeyer, R. Nehring, P. J. Hanley, V. Renigunta, B. Musset, G. Schlichthorl, C. Derst, A. Karschin and J. Daut (2002). "Interaction with 14-3-3 proteins promotes functional expression of the potassium channels TASK-1 and TASK-3." J Physiol **545**(Pt 1): 13-26.
Ramji, D. P. and P. Foka (2002). "CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation." Biochem J **365**(Pt 3): 561-75.
Rashid, A. J., C. H. So, M. M. Kong, T. Furtak, M. El-Ghundi, R. Cheng, B. F. O'Dowd and S. R. George (2007). "D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(2): 654-9.
Rashid, M. H., H. Furue, M. Yoshimura and H. Ueda (2006). "Tonic inhibitory role of alpha4beta2 subtype of nicotinic acetylcholine receptors on nociceptive transmission in the spinal cord in mice." Pain **125**(1-2): 125-35.
Reddy, P. S. and R. B. Corley (1998). "Assembly, sorting, and exit of oligomeric proteins from the endoplasmic reticulum." Bioessays **20**(7): 546-54.
Reinhardt, D. P., T. Sasaki, B. J. Dzamba, D. R. Keene, M. L. Chu, W. Gohring, R. Timpl and L. Y. Sakai (1996). "Fibrillin-1 and fibulin-2 interact and are colocalized in some tissues." J Biol Chem **271**(32): 19489-96.
Reinold, H., S. Ahmadi, U. B. Depner, B. Layh, C. Heindl, M. Hamza, A. Pahl, K. Brune, S. Narumiya, U. Muller and H. U. Zeilhofer (2005). "Spinal inflammatory hyperalgesia is mediated by prostaglandin E receptors of the EP2 subtype." J Clin Invest **115**(3): 673-9.
Reisner, L. (2003). "Antidepressants for chronic neuropathic pain." Curr Pain Headache Rep **7**(1): 24-33.

Rexed, B. (1952). "The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat." J Comp Neurol **96**(3): 414-95.

Ribeiro-da-Silva, A. (2004) Substantia gelatinosa of the spinal cord. In *The rat nervous system. 3rd edition* (Paxinos, G., ed.), pp. 129-148, Elsevier Acad Press.

Richard, J. P., K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M. J. Gait, L. V. Chernomordik and B. Lebleu (2003). "Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake." J Biol Chem **278**(1): 585-90.

Richter, T., S. S. Biel, M. Sattler, H. Wenck, K. P. Wittern, R. Wiesendanger and R. Wepf (2007). "Pros and cons: cryo-electron microscopic evaluation of block faces versus cryo-sections from frozen-hydrated skin specimens prepared by different techniques." J Microsc **225**(Pt 2): 201-7.

Rielhle, U., M. Hoechli (1973). The theory and technique of high pressure freezing. In: Benedetti EL, Favard P (eds) Freeze etching techniques and applications. Société Française de Microscopie Electronique, Paris, pp 31-61.

Riley, R. C., J. A. Trafton, S. I. Chi and A. I. Basbaum (2001). "Presynaptic regulation of spinal cord tachykinin signaling via GABA(B) but not GABA(A) receptor activation." Neuroscience **103**(3): 725-37.

Rizzoli, S. O. and W. J. Betz (2004). "The structural organization of the readily releasable pool of synaptic vesicles." Science **303**(5666): 2037-9.

Roark, E. F., D. R. Keene, C. C. Haudenschild, S. Godyna, C. D. Little and W. S. Argraves (1995). "The association of human fibulin-1 with elastic fibers: an immunohistological, ultrastructural, and RNA study." J Histochem Cytochem **43**(4): 401-11.

Rocheville, M., D. C. Lange, U. Kumar, S. C. Patel, R. C. Patel and Y. C. Patel (2000). "Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity." Science **288**(5463): 154-7.

Rocheville, M., D. C. Lange, U. Kumar, R. Sasi, R. C. Patel and Y. C. Patel (2000). "Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers." J Biol Chem **275**(11): 7862-9.

Rosenberg, J. M., C. Harrell, H. Ristic, R. A. Werner and A. M. de Rosayro (1997). "The effect of gabapentin on neuropathic pain." Clin J Pain **13**(3): 251-5.

Rostaing, P., E. Real, L. Siksou, J. P. Lechaire, T. Boudier, T. M. Boeckers, F. Gertler, E. D. Gundelfinger, A. Triller and S. Marty (2006). "Analysis of synaptic ultrastructure without fixative using high-pressure freezing and tomography." Eur J Neurosci **24**(12): 3463-74.

Saegusa, H., T. Kurihara, S. Zong, A. Kazuno, Y. Matsuda, T. Nonaka, W. Han, H. Toriyama and T. Tanabe (2001). "Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca2+ channel." Embo J **20**(10): 2349-56.

Saghatelyan, A. K., M. Snapyan, S. Gorissen, I. Meigel, J. Mosbacher, K. Kaupmann, B. Bettler, A. V. Kornilov, N. E. Nifantiev, V. Sakanyan, M. Schachner and A. Dityatev (2003). "Recognition molecule associated carbohydrate inhibits postsynaptic GABA(B) receptors: a mechanism for homeostatic regulation of GABA release in perisomatic synapses." Mol Cell Neurosci **24**(2): 271-82.

Saito, G., J. A. Swanson and K. D. Lee (2003). "Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities." Adv Drug Deliv Rev **55**(2): 199-215.

Salahpour, A., S. Angers, J. F. Mercier, M. Lagace, S. Marullo and M. Bouvier (2004). "Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting." J Biol Chem **279**(32): 33390-7.

Sandkuhler, J. (2009). "Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia." Physiol Rev **89**(2): 707-58.

Sasaki, T., K. Mann, H. Wiedemann, W. Gohring, A. Lustig, J. Engel, M. L. Chu and R. Timpl (1997). "Dimer model for the microfibrillar protein fibulin-2 and identification of the connecting disulfide bridge." Embo J **16**(11): 3035-43.

Sasaki, T., H. Wiedemann, M. Matzner, M. L. Chu and R. Timpl (1996). "Expression of fibulin-2 by fibroblasts and deposition with fibronectin into a fibrillar matrix." J Cell Sci **109 (Pt 12)**: 2895-904.

Satoh, J., Y. Nanri and T. Yamamura (2006). "Rapid identification of 14-3-3-binding proteins by protein microarray analysis." J Neurosci Methods **152**(1-2): 278-88.

Sauter, K., T. Grampp, J. M. Fritschy, K. Kaupmann, B. Bettler, H. Mohler and D. Benke (2005). "Subtype-selective interaction with the transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) homologous protein (CHOP) regulates cell surface expression of GABA(B) receptors." J Biol Chem **280**(39): 33566-72.

Sawynok, J. and C. Dickson (1985). "D-Baclofen is an antagonist at baclofen receptors mediating antinociception in the spinal cord." Pharmacology **31**(5): 248-59.

Schmidtko, A., D. Del Turco, O. Coste, C. Ehnert, E. Niederberger, P. Ruth, T. Deller, G. Geisslinger and I. Tegeder (2005). "Essential role of the synaptic vesicle protein synapsin II in formalin-induced hyperalgesia and glutamate release in the spinal cord." Pain **115**(1-2): 171-81.

Schmidtko, A., C. Luo, W. Gao, G. Geisslinger, R. Kuner and I. Tegeder (2008). "Genetic deletion of synapsin II reduces neuropathic pain due to reduced glutamate but increased GABA in the spinal cord dorsal horn." Pain **139**(3): 632-43.

Schoffnegger, D., R. Ruscheweyh and J. Sandkuhler (2008). "Spread of excitation across modality borders in spinal dorsal horn of neuropathic rats." Pain **135**(3): 300-10.

Scholz, J., D. C. Broom, D. H. Youn, C. D. Mills, T. Kohno, M. R. Suter, K. A. Moore, I. Decosterd, R. E. Coggeshall and C. J. Woolf (2005). "Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury." J Neurosci **25**(32): 7317-23.

Scholz, J. and C. J. Woolf (2002). "Can we conquer pain?" Nat Neurosci **5 Suppl**: 1062-7.

Scholz, J. and C. J. Woolf (2007). "The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia." Nat Neurosci **10**(11): 1361-8.

Schon, L. C., C. D. Anderson, M. E. Easley, P. W. Lam, H. J. Trnka, D. B. Lumsden, G. Levin and J. Shanker (2001). "Surgical treatment of chronic lower extremity neuropathic pain." Clin Orthop Relat Res(389): 156-64.

Selak, I. (2001). "Pregabalin (Pfizer)." Curr Opin Investig Drugs **2**(6): 828-34.

Seltzer, Z., R. Dubner and Y. Shir (1990). "A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury." Pain **43**(2): 205-18.

Serge, A., L. Fourgeaud, A. Hemar and D. Choquet (2002). "Receptor activation and homer differentially control the lateral mobility of metabotropic glutamate receptor 5 in the neuronal membrane." J Neurosci **22**(10): 3910-20.

Sheets, P. L., C. Heers, T. Stoehr and T. R. Cummins (2008). "Differential block of sensory neuronal voltage-gated sodium channels by lacosamide [(2R)-2-(acetylamino)-N-benzyl-3-methoxypropanamide], lidocaine, and carbamazepine." J Pharmacol Exp Ther **326**(1): 89-99.

Sherrington, C. S. (1906). "Observations on the scratch-reflex in the spinal dog." J Physiol **34**(1-2): 1-50.

Shimoyama, M., K. Tanaka, F. Hasue and N. Shimoyama (2002). "A mouse model of neuropathic cancer pain." Pain **99**(1-2): 167-74.

Sicot, F. X., T. Tsuda, D. Markova, J. F. Klement, M. Arita, R. Z. Zhang, T. C. Pan, R. P. Mecham, D. E. Birk and M. L. Chu (2008). "Fibulin-2 is dispensable for mouse development and elastic fiber formation." Mol Cell Biol **28**(3): 1061-7.

Siksou, L., P. Rostaing, J. P. Lechaire, T. Boudier, T. Ohtsuka, A. Fejtova, H. T. Kao, P. Greengard, E. D. Gundelfinger, A. Triller and S. Marty (2007). "Three-dimensional architecture of presynaptic terminal cytomatrix." J Neurosci **27**(26): 6868-77.

Sindrup, S. H. (1991). "Tricyclic antidepressants in "central pain"." Acta Neurol Scand **84**(2): 171-2.
Sindrup, S. H., M. Otto, N. B. Finnerup and T. S. Jensen (2005). "Antidepressants in the treatment of neuropathic pain." Basic Clin Pharmacol Toxicol **96**(6): 399-409.
Singer, T., B. Seymour, J. O'Doherty, H. Kaube, R. J. Dolan and C. D. Frith (2004). "Empathy for pain involves the affective but not sensory components of pain." Science **303**(5661): 1157-62.
Sivilotti, L. and C. J. Woolf (1994). "The contribution of GABAA and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord." J Neurophysiol **72**(1): 169-79.
Slattery, D. A., S. Desrayaud and J. F. Cryan (2005). "GABAB receptor antagonist-mediated antidepressant-like behavior is serotonin-dependent." J Pharmacol Exp Ther **312**(1): 290-6.
Slonimski, M., S. E. Abram and R. E. Zuniga (2004). "Intrathecal baclofen in pain management." Reg Anesth Pain Med **29**(3): 269-76.
Sokal, D. M. and V. Chapman (2001). "Spinal GABA(B)-receptor antagonism increases nociceptive transmission in vivo." Neuroreport **12**(15): 3247-50.
Soma, L. R. (1987). "Assessment of animal pain in experimental animals." Lab Anim Sci **37 Spec No**: 71-4.
Spafford, J. D. and G. W. Zamponi (2003). "Functional interactions between presynaptic calcium channels and the neurotransmitter release machinery." Curr Opin Neurobiol **13**(3): 308-14.
Spike, R. C., Z. Puskar, D. Andrew and A. J. Todd (2003). "A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord." Eur J Neurosci **18**(9): 2433-48.
Stanasila, L., J. B. Perez, H. Vogel and S. Cotecchia (2003). "Oligomerization of the alpha 1a- and alpha 1b-adrenergic receptor subtypes. Potential implications in receptor internalization." J Biol Chem **278**(41): 40239-51.
Stanton, P. K., J. Winterer, X. L. Zhang and W. Muller (2005). "Imaging LTP of presynaptic release of FM1-43 from the rapidly recycling vesicle pool of Schaffer collateral-CA1 synapses in rat hippocampal slices." Eur J Neurosci **22**(10): 2451-61.
Strock, J. and M. A. Diverse-Pierluissi (2004). "Ca2+ channels as integrators of G protein-mediated signaling in neurons." Mol Pharmacol **66**(5): 1071-6.
Studer, D., B. M. Humbel and M. Chiquet (2008). "Electron microscopy of high pressure frozen samples: bridging the gap between cellular ultrastructure and atomic resolution." Histochem Cell Biol **130**(5): 877-89.
Studer, D., M. Michel and M. Muller (1989). "High pressure freezing comes of age." Scanning Microsc Suppl **3**: 253-68; discussion 268-9.
Sullivan, M. (1998). "The problem of pain in the clinicopathological method." Clin J Pain **14**(3): 197-201.
Sumpton, J. E. and D. E. Moulin (2001). "Treatment of neuropathic pain with venlafaxine." Ann Pharmacother **35**(5): 557-9.
Sun, C., D. Song, R. A. Davis-Taber, L. W. Barrett, V. E. Scott, P. L. Richardson, A. Pereda-Lopez, M. E. Uchic, L. R. Solomon, M. R. Lake, K. A. Walter, P. J. Hajduk and E. T. Olejniczak (2007). "Solution structure and mutational analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide binding to the extracellular domain of PAC1-RS." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(19): 7875-80.
Suzuki, R., W. Rahman, L. J. Rygh, M. Webber, S. P. Hunt and A. H. Dickenson (2005). "Spinal-supraspinal serotonergic circuits regulating neuropathic pain and its treatment with gabapentin." Pain **117**(3): 292-303.
Takeda, D., T. Nakatsuka, J. G. Gu and M. Yoshida (2007). "The activation of nicotinic acetylcholine receptors enhances the inhibitory synaptic transmission in the deep dorsal horn neurons of the adult rat spinal cord." Mol Pain **3**: 26.

Tateyama, M., H. Abe, H. Nakata, O. Saito and Y. Kubo (2004). "Ligand-induced rearrangement of the dimeric metabotropic glutamate receptor 1alpha." Nat Struct Mol Biol **11**(7): 637-42.

Tatsuoka, H. and T. S. Reese (1989). "New structural features of synapses in the anteroventral cochlear nucleus prepared by direct freezing and freeze-substitution." J Comp Neurol **290**(3): 343-57.

Thomas, P., M. Mortensen, A. M. Hosie and T. G. Smart (2005). "Dynamic mobility of functional GABAA receptors at inhibitory synapses." Nat Neurosci **8**(7): 889-97.

Thompson, S. W., A. E. King and C. J. Woolf (1990). "Activity-Dependent Changes in Rat Ventral Horn Neurons in vitro; Summation of Prolonged Afferent Evoked Postsynaptic Depolarizations Produce a d-2-Amino-5-Phosphonovaleric Acid Sensitive Windup." Eur J Neurosci **2**(7): 638-649.

Thoumine, O., H. Ewers, M. Heine, L. Groc, R. Frischknecht, G. Giannone, C. Poujol, P. Legros, B. Lounis, L. Cognet and D. Choquet (2008). "Probing the dynamics of protein-protein interactions at neuronal contacts by optical imaging." Chem Rev **108**(5): 1565-87.

Tiao, J. Y., A. Bradaia, B. Biermann, K. Kaupmann, M. Metz, C. Haller, A. G. Rolink, E. Pless, P. N. Barlow, M. Gassmann and B. Bettler (2008). "The sushi domains of secreted GABA(B1) isoforms selectively impair GABA(B) heteroreceptor function." J Biol Chem **283**(45): 31005-11.

Todd, A. J. and R. C. Spike (1993). "The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal horn." Prog Neurobiol **41**(5): 609-45.

Todd, A. J. and A. C. Sullivan (1990). "Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat." J Comp Neurol **296**(3): 496-505.

Todd, A.J. and Koerber, R.H. (2006) Neuroanatomical substrates of spinal nociception. In *Wall and Melzack's textbook of pain. 5th edition* (McMahon, S.B. and Koltzenburg, M., eds.), pp. 73-90, Elsevier limited

Todd, A.J. (2006) Anatomy and neurochemistry of the dorsal horn. In *Handbook of clinical neurology* (Vol. 81) (Cervero, F. and Jensen, T.S., eds.), pp. 61-76, Elsevier Science Publisher

Tomiyama, M., K. Furusawa, M. Kamijo, T. Kimura, M. Matsunaga and M. Baba (2005). "Upregulation of mRNAs coding for AMPA and NMDA receptor subunits and metabotropic glutamate receptors in the dorsal horn of the spinal cord in a rat model of diabetes mellitus." Brain Res Mol Brain Res **136**(1-2): 275-81.

Torsney, C. and A. B. MacDermott (2006). "Disinhibition opens the gate to pathological pain signaling in superficial neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord." J Neurosci **26**(6): 1833-43.

Towers, S., A. Princivalle, A. Billinton, M. Edmunds, B. Bettler, L. Urban, J. Castro-Lopes and N. G. Bowery (2000). "GABAB receptor protein and mRNA distribution in rat spinal cord and dorsal root ganglia." Eur J Neurosci **12**(9): 3201-10.

Toyoda, H., M. G. Zhao and M. Zhuo (2009). "Enhanced quantal release of excitatory transmitter in anterior cingulate cortex of adult mice with chronic pain." Mol Pain **5**: 4.

Tracey, I. and P. W. Mantyh (2007). "The cerebral signature for pain perception and its modulation." Neuron **55**(3): 377-91.

Triller, A. and D. Choquet (2003). "Synaptic structure and diffusion dynamics of synaptic receptors." Biol Cell **95**(7): 465-76.

Truong, A. B., S. C. Masters, H. Yang and H. Fu (2002). "Role of the 14-3-3 C-terminal loop in ligand interaction." Proteins **49**(3): 321-5.

Tsuda, M., K. Inoue and M. W. Salter (2005). "Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia." Trends Neurosci **28**(2): 101-7.

Tsuda, M., Y. Shigemoto-Mogami, S. Koizumi, A. Mizokoshi, S. Kohsaka, M. W. Salter and K. Inoue (2003). "P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury." Nature **424**(6950): 778-83.

Tsuda, M., E. Toyomitsu, T. Komatsu, T. Masuda, E. Kunifusa, K. Nasu-Tada, S. Koizumi, K. Yamamoto, J. Ando and K. Inoue (2008). "Fibronectin/integrin system is involved in P2X(4) receptor upregulation in the spinal cord and neuropathic pain after nerve injury." Glia **56**(5): 579-85.

Tsuda, M., H. Tozaki-Saitoh, T. Masuda, E. Toyomitsu, T. Tezuka, T. Yamamoto and K. Inoue (2008). "Lyn tyrosine kinase is required for P2X(4) receptor upregulation and neuropathic pain after peripheral nerve injury." Glia **56**(1): 50-8.

Turk, D. C. (2003). "Cognitive-behavioral approach to the treatment of chronic pain patients." Reg Anesth Pain Med **28**(6): 573-9.

Uberti, M. A., R. A. Hall and K. P. Minneman (2003). "Subtype-specific dimerization of alpha 1-adrenoceptors: effects on receptor expression and pharmacological properties." Mol Pharmacol **64**(6): 1379-90.

Ulmann, L., J. P. Hatcher, J. P. Hughes, S. Chaumont, P. J. Green, F. Conquet, G. N. Buell, A. J. Reeve, I. P. Chessell and F. Rassendren (2008). "Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain." J Neurosci **28**(44): 11263-8.

Ulrich, D. and B. Bettler (2007). "GABA(B) receptors: synaptic functions and mechanisms of diversity." Curr Opin Neurobiol **17**(3): 298-303.

Ultenius, C., B. Linderoth, B. A. Meyerson and J. Wallin (2006). "Spinal NMDA receptor phosphorylation correlates with the presence of neuropathic signs following peripheral nerve injury in the rat." Neurosci Lett **399**(1-2): 85-90.

Urban, J. D., W. P. Clarke, M. von Zastrow, D. E. Nichols, B. Kobilka, H. Weinstein, J. A. Javitch, B. L. Roth, A. Christopoulos, P. M. Sexton, K. J. Miller, M. Spedding and R. B. Mailman (2007). "Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology." J Pharmacol Exp Ther **320**(1): 1-13.

Urwyler, S., J. Mosbacher, K. Lingenhoehl, J. Heid, K. Hofstetter, W. Froestl, B. Bettler and K. Kaupmann (2001). "Positive allosteric modulation of native and recombinant gamma-aminobutyric acid(B) receptors by 2,6-Di-tert-butyl-4-(3-hydroxy-2,2-dimethyl-propyl)-phenol (CGP7930) and its aldehyde analog CGP13501." Mol Pharmacol **60**(5): 963-71.

Urwyler, S., M. F. Pozza, K. Lingenhoehl, J. Mosbacher, C. Lampert, W. Froestl, M. Koller and K. Kaupmann (2003). "N,N'-Dicyclopentyl-2-methylsulfanyl-5-nitro-pyrimidine-4,6-diamine (GS39783) and structurally related compounds: novel allosteric enhancers of gamma-aminobutyric acidB receptor function." J Pharmacol Exp Ther **307**(1): 322-30.

van Hemert, M. J., H. Y. Steensma and G. P. van Heusden (2001). "14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis." Bioessays **23**(10): 936-46.

Vanegas, H. and H. G. Schaible (2004). "Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory?" Brain Res Brain Res Rev **46**(3): 295-309.

Vauquelin, G. and I. Van Liefde (2005). "G protein-coupled receptors: a count of 1001 conformations." Fundam Clin Pharmacol **19**(1): 45-56.

Verpoorten, N., P. De Jonghe and V. Timmerman (2006). "Disease mechanisms in hereditary sensory and autonomic neuropathies." Neurobiol Dis **21**(2): 247-55.

Vidal, R. L., O. A. Ramirez, L. Sandoval, R. Koenig-Robert, S. Hartel and A. Couve (2007). "Marlin-1 and conventional kinesin link GABAB receptors to the cytoskeleton and regulate receptor transport." Mol Cell Neurosci **35**(3): 501-12.

Vigot, R., S. Barbieri, H. Brauner-Osborne, R. Turecek, R. Shigemoto, Y. P. Zhang, R. Lujan, L. H. Jacobson, B. Biermann, J. M. Fritschy, C. M. Vacher, M. Muller, G. Sansig, N. Guetg, J. F. Cryan, K. Kaupmann, M. Gassmann, T. G. Oertner and B. Bettler (2006).

"Differential compartmentalization and distinct functions of GABAB receptor variants." Neuron **50**(4): 589-601.
Vilardaga, J. P., M. Bunemann, C. Krasel, M. Castro and M. J. Lohse (2003). "Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells." Nat Biotechnol **21**(7): 807-12.
Vilardaga, J. P., M. Frank, C. Krasel, C. Dees, R. A. Nissenson and M. J. Lohse (2001). "Differential conformational requirements for activation of G proteins and the regulatory proteins arrestin and G protein-coupled receptor kinase in the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein." J Biol Chem **276**(36): 33435-43.
Vilardaga, J. P., R. Steinmeyer, G. S. Harms and M. J. Lohse (2005). "Molecular basis of inverse agonism in a G protein-coupled receptor." Nat Chem Biol **1**(1): 25-8.
Villanueva, L., D. Bouhassira and D. Le Bars (1996). "The medullary subnucleus reticularis dorsalis (SRD) as a key link in both the transmission and modulation of pain signals." Pain **67**(2-3): 231-40.
Villar, M. J., R. Cortes, E. Theodorsson, Z. Wiesenfeld-Hallin, M. Schalling, J. Fahrenkrug, P. C. Emson and T. Hokfelt (1989). "Neuropeptide expression in rat dorsal root ganglion cells and spinal cord after peripheral nerve injury with special reference to galanin." Neuroscience **33**(3): 587-604.
Vissers, K., H. Adriaensen, R. De Coster, C. De Deyne and T. F. Meert (2003). "A chronic-constriction injury of the sciatic nerve reduces bilaterally the responsiveness to formalin in rats: a behavioral and hormonal evaluation." Anesth Analg **97**(2): 520-5, table of contents.
Vives, E. (2005). "Present and future of cell-penetrating peptide mediated delivery systems: "is the Trojan horse too wild to go only to Troy?"" J Control Release **109**(1-3): 77-85.
Voisin, D. L. and F. Nagy (2001). "Sustained L-type calcium currents in dissociated deep dorsal horn neurons of the rat: characteristics and modulation." Neuroscience **102**(2): 461-72.
Waldhoer, M., J. Fong, R. M. Jones, M. M. Lunzer, S. K. Sharma, E. Kostenis, P. S. Portoghese and J. L. Whistler (2005). "A heterodimer-selective agonist shows in vivo relevance of G protein-coupled receptor dimers." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(25): 9050-5.
Waldmann, R., G. Champigny, F. Bassilana, C. Heurteaux and M. Lazdunski (1997). "A proton-gated cation channel involved in acid-sensing." Nature **386**(6621): 173-7.
Waldmann, R., N. Voilley, M. G. Mattei and M. Lazdunski (1996). "The human degenerin MDEG, an amiloride-sensitive neuronal cation channel, is localized on chromosome 17q11.2-17q12 close to the microsatellite D17S798." Genomics **37**(2): 269-70.
Waldmeier, P. C., K. Kaupmann and S. Urwyler (2008). "Roles of GABAB receptor subtypes in presynaptic auto- and heteroreceptor function regulating GABA and glutamate release." J Neural Transm **115**(10): 1401-11.
Wall, P. D., M. Devor, R. Inbal, J. W. Scadding, D. Schonfeld, Z. Seltzer and M. M. Tomkiewicz (1979). "Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa." Pain **7**(2): 103-11.
Wang, X. L., H. M. Zhang, S. R. Chen and H. L. Pan (2007). "Altered synaptic input and GABAB receptor function in spinal superficial dorsal horn neurons in rats with diabetic neuropathy." J Physiol **579**(Pt 3): 849-61.
Wearley, L. L. (1991). "Recent progress in protein and peptide delivery by noninvasive routes." Crit Rev Ther Drug Carrier Syst **8**(4): 331-94.
Weimer, R. M. (2006). "Preservation of C. elegans tissue via high-pressure freezing and freeze-substitution for ultrastructural analysis and immunocytochemistry." Methods Mol Biol **351**: 203-21.
Wender, P. A., D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman and J. B. Rothbard (2000). "The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance

cellular uptake: peptoid molecular transporters." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(24): 13003-8.

White, J. F., J. Grodnitzky, J. M. Louis, L. B. Trinh, J. Shiloach, J. Gutierrez, J. K. Northup and R. Grisshammer (2007). "Dimerization of the class A G protein-coupled neurotensin receptor NTS1 alters G protein interaction." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(29): 12199-204.

White, J. H., A. Wise, M. J. Main, A. Green, N. J. Fraser, G. H. Disney, A. A. Barnes, P. Emson, S. M. Foord and F. H. Marshall (1998). "Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor." Nature **396**(6712): 679-82.

Wiesenfeld-Hallin, Z. and X. J. Xu (2001). "Neuropeptides in neuropathic and inflammatory pain with special emphasis on cholecystokinin and galanin." Eur J Pharmacol **429**(1-3): 49-59.

Wiesenfeld-Hallin, Z., X. J. Xu, J. N. Crawley and T. Hokfelt (2005). "Galanin and spinal nociceptive mechanisms: recent results from transgenic and knock-out models." Neuropeptides **39**(3): 207-10.

Willoughby, S. G., B. J. Hailey, S. Mulkana and J. Rowe (2002). "The effect of laboratory-induced depressed mood state on responses to pain." Behav Med **28**(1): 23-31.

Wood, JN (2000). II. Genetic approaches to pain therapy. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 278:G507-512.

Woolf, C. J. (2000). "Pain." Neurobiol Dis **7**(5): 504-10.

Woolf, C. J. and Q. Ma (2007). "Nociceptors--noxious stimulus detectors." Neuron **55**(3): 353-64.

Woolf, C. J. and R. J. Mannion (1999). "Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management." Lancet **353**(9168): 1959-64.

Woolf, C. J. and M. W. Salter (2000). "Neuronal plasticity: increasing the gain in pain." Science **288**(5472): 1765-9.

Wu, G., M. Ringkamp, B. B. Murinson, E. M. Pogatzki, T. V. Hartke, H. M. Weerahandi, J. N. Campbell, J. W. Griffin and R. A. Meyer (2002). "Degeneration of myelinated efferent fibers induces spontaneous activity in uninjured C-fiber afferents." J Neurosci **22**(17): 7746-53.

Wu, L. G. and P. Saggau (1997). "Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release." Trends Neurosci **20**(5): 204-12.

Xu, J., J. He, A. M. Castleberry, S. Balasubramanian, A. G. Lau and R. A. Hall (2003). "Heterodimerization of alpha 2A- and beta 1-adrenergic receptors." J Biol Chem **278**(12): 10770-7.

Xu, X. J., J. X. Hao, H. Aldskogius, A. Seiger and Z. Wiesenfeld-Hallin (1992). "Chronic pain-related syndrome in rats after ischemic spinal cord lesion: a possible animal model for pain in patients with spinal cord injury." Pain **48**(2): 279-90.

Xu, X. J., T. Hokfelt and Z. Wiesenfeld-Hallin (2008). "Galanin and spinal pain mechanisms: where do we stand in 2008?" Cell Mol Life Sci **65**(12): 1813-9.

Yaksh, T. L. (1989). "Behavioral and autonomic correlates of the tactile evoked allodynia produced by spinal glycine inhibition: effects of modulatory receptor systems and excitatory amino acid antagonists." Pain **37**(1): 111-23.

Yang, L., F. X. Zhang, F. Huang, Y. J. Lu, G. D. Li, L. Bao, H. S. Xiao and X. Zhang (2004). "Peripheral nerve injury induces trans-synaptic modification of channels, receptors and signal pathways in rat dorsal spinal cord." Eur J Neurosci **19**(4): 871-83.

Yasaka, T., G. Kato, H. Furue, M. H. Rashid, M. Sonohata, A. Tamae, Y. Murata, S. Masuko and M. Yoshimura (2007). "Cell-type-specific excitatory and inhibitory circuits involving primary afferents in the substantia gelatinosa of the rat spinal dorsal horn in vitro." J Physiol **581**(Pt 2): 603-18.

Yeh, J. C., L. A. Otte and J. A. Frangos (2008). "Regulation of G protein-coupled receptor activities by the platelet-endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1." Biochemistry **47**(34): 9029-39.

Yi, C. H., D. J. Smith, W. W. West and M. A. Hollingsworth (2007). "Loss of fibulin-2 expression is associated with breast cancer progression." Am J Pathol **170**(5): 1535-45.

Yoshimura, M. and N. Yonehara (2006). "Alteration in sensitivity of ionotropic glutamate receptors and tachykinin receptors in spinal cord contribute to development and maintenance of nerve injury-evoked neuropathic pain." Neurosci Res **56**(1): 21-8.

Zerangue, N., B. Schwappach, Y. N. Jan and L. Y. Jan (1999). "A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels." Neuron **22**(3): 537-48.

Zhang, H. M., S. R. Chen and H. L. Pan (2009). "Effects of activation of group III metabotropic glutamate receptors on spinal synaptic transmission in a rat model of neuropathic pain." Neuroscience **158**(2): 875-84.

Zhang, H. Y., R. Timpl, T. Sasaki, M. L. Chu and P. Ekblom (1996). "Fibulin-1 and fibulin-2 expression during organogenesis in the developing mouse embryo." Dev Dyn **205**(3): 348-64.

Zhang, X., V. M. Verge, Z. Wiesenfeld-Hallin, F. Piehl and T. Hokfelt (1993). "Expression of neuropeptides and neuropeptide mRNAs in spinal cord after axotomy in the rat, with special reference to motoneurons and galanin." Exp Brain Res **93**(3): 450-61.

Zhang, X., Z. O. Xu, T. J. Shi, M. Landry, K. Holmberg, G. Ju, Y. G. Tong, L. Bao, X. P. Cheng, Z. Wiesenfeld-Hallin, A. Lozano, J. Dostrovsky and T. Hokfelt (1998). "Regulation of expression of galanin and galanin receptors in dorsal root ganglia and spinal cord after axotomy and inflammation." Ann N Y Acad Sci **863**: 402-13.

Zhang, Z., M. Artelt, M. Burnet, K. Trautmann and H. J. Schluesener (2006). "Lesional accumulation of P2X4 receptor+ monocytes following experimental traumatic brain injury." Exp Neurol **197**(1): 252-7.

Zhao, G. Q., Y. Zhang, M. A. Hoon, J. Chandrashekar, I. Erlenbach, N. J. Ryba and C. S. Zuker (2003). "The receptors for mammalian sweet and umami taste." Cell **115**(3): 255-66.

Zhu, X. and J. Wess (1998). "Truncated V2 vasopressin receptors as negative regulators of wild-type V2 receptor function." Biochemistry **37**(45): 15773-84.

Zuber, B., I. Nikonenko, P. Klauser, D. Muller and J. Dubochet (2005). "The mammalian central nervous synaptic cleft contains a high density of periodically organized complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(52): 19192-7.

Zuniga, R. E., S. Perera and S. E. Abram (2002). "Intrathecal baclofen: a useful agent in the treatment of well-established complex regional pain syndrome." Reg Anesth Pain Med **27**(1): 90-3.

Zuniga, R. E., C. R. Schlicht and S. E. Abram (2000). "Intrathecal baclofen is analgesic in patients with chronic pain." Anesthesiology **92**(3): 876-80.