

ILLUSTRATION DE L'UTILISATION DE LA TECHNIQUE D'HYBRIDATION *IN SITU* POUR LA CARACTÉRISATION DES DIFFÉRENTS SOUS-TYPES DE NEURONES SENSORIELS DANS LE GANGLION RACHIDIEN DE SOURIS

Ventéo S.

*Inserm U1051, Institut des Neurosciences de Montpellier, Hôpital St Eloi,
80 rue Augustin Fliche, 34091 Montpellier cedex 5
venteo@univ-montp2.fr*

RÉSUMÉ

Le système somatosensoriel permet le traitement de diverses modalités sensorielles telles que la mécanoeception, la proprioception, la nociception et la thermoception. Au niveau du tronc, la perception de ces diverses sensations met en jeu des récepteurs neuronaux périphériques spécialisés dont les corps cellulaires sont localisés dans les ganglions rachidiens ou ganglions de la racine dorsale (GRDs). Par différentes approches transcriptomiques, nous avons identifié plusieurs acteurs moléculaires impliqués dans la mise en place et/ou le fonctionnement de ce système en conditions normales et pathologiques. Cet article illustre comment la technique d'hybridation *in situ* a permis la validation

des gènes candidats issus de ces criblages en établissant leur profil d'expression au sein des GRDs. La caractérisation fine des populations de neurones sensoriels dans lesquelles ils sont exprimés a été réalisée grâce à des marquages en double hybridation *in situ* et/ou en hybridation *in situ* couplée à une immunohistochimie. Ainsi, ces études nous ont permis d'identifier et de caractériser : 1) des marqueurs spécifiques de populations de neurones sensitifs au sein des GRDs ; 2) une population fine de neurones impliquée dans la perception du toucher ; 3) un nouvel acteur de la régénération des nerfs périphériques après lésion ; et 4) une nouvelle cible thérapeutique potentielle pour le traitement des douleurs neuropathiques chroniques.

The somatosensory system processes several sensory modalities including mechanoreception, proprioception, nociception and thermoception. At trunk levels, the perception of these diverse sensations involves highly specialized peripheral neuronal receptors whose cell bodies are located in the dorsal root ganglia (DRGs). Through various transcriptomic approaches, we have identified new molecular determinants involved in the development and/or functioning of the somatosensory system in normal and pathological conditions. This article illustrates how the *in situ* hybridization technique allowed the validation of candidate genes issued from these screens by establishing their expression profiles in the DRGs. To precisely characterize the sensory neuron subtypes in which they are expressed, we performed double *in situ* hybridization analyses and/or *in situ* hybridization coupled with immunostaining. Altogether these studies have allowed us to identify and characterize: 1) several molecular markers expressed in specific DRG sensory neuron subtypes; 2) a discrete population of mechanoreceptive neurons involved in touch sensations; 3) a new molecular actor involved in peripheral nerve regeneration after lesion; and 4) a new potential therapeutic target for chronic neuropathic pain treatment.

INTRODUCTION

La technique d'hybridation *in situ* (HIS), mise au point en 1969 pour la localisation chromosomique des gènes (1), a été ensuite adaptée afin d'étudier la localisation des ARN messagers d'un gène donné dans un tissu biologique, avec une

résolution cellulaire. Elle permet une analyse spatiale et temporelle de l'expression génique et représente une méthode alternative ou complémentaire de l'immunohistochimie. Cet article a pour but de présenter comment la technique d'HIS a constitué une méthode de choix pour nos études du système somatosensoriel.

Le système somatosensoriel est la composante du système nerveux qui nous fait prendre conscience de l'état de notre corps dans l'espace et des stimuli qu'il subit de la part de l'environnement. Il regroupe les mécanismes nerveux chargés de détecter les sensations du corps, communément appelées «sensations somatiques», et de les transmettre vers le système nerveux central où elles seront traitées de façon à engendrer une réponse adaptative adéquate. La somesthésie regroupe 4 grandes modalités que sont la mécanoreception, la proprioception, la nociception et la thermoception. La nociception englobe les mécanismes qui permettent la perception des stimuli douloureux détectés en périphérie. La thermoception est le sens qui permet la perception de la chaleur (entre 30 et 45 °C) et du froid (entre 10 et 30 °C). La mécanoreception désigne les mécanismes nerveux mis en jeu afin de percevoir les sensations du toucher correspondant à des stimuli mécaniques non douloureux. La proprioception représente le sens qui nous permet de connaître à tout instant la position et les mouvements de chaque partie de notre corps dans l'espace de sorte à ajuster les contractions musculaires et ainsi d'assurer des mouvements coordonnés et fluides. La perception de ces diverses sensations met en jeu des

récepteurs neuronaux périphériques spécialisés dont les corps cellulaires se localisent dans les ganglions de la racine dorsale (GRDs) au niveau du tronc. Les GRDs sont localisés dans l'espace péri-dural de la colonne vertébrale, contre la paroi osseuse. Ils forment deux chaînes situées de part et d'autre de la moelle épinière et sont situés sur le trajet de la racine dorsale des nerfs spinaux entrant dans la moelle au niveau de chaque métamère.

Afin d'étendre nos connaissances sur la mise en place et le fonctionnement du système somatosensoriel en conditions normales et pathologiques, nous avons entrepris le criblage différentiel de différentes banques SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) générées à partir 1) de GRDs à différents stades du développement (prélevés au jour embryonnaire 13 (E13), à la naissance (P0) et au stade adulte) ; 2) de GRDs dépourvus de neurones thermoceptifs (prélevés à partir de souris mutantes pour le gène *TrkA* codant pour le récepteur du Nerve Growth Factor) ou 3) de GRDs prélevés en condition traumatique après lésion du nerf sciatique (2) (3). Notre choix s'est porté sur la technologie SAGE car elle présentait l'avantage de fournir une analyse globale et quantitative de l'expression génique dans un tissu donné à un stade donné, mais aussi d'appartenir aux stratégies qualifiées d'«open system» c'est à dire permettant l'identification de gènes encore inconnus (4) (5). Les résultats issus de ces analyses transcriptomiques ont été dans un premier temps validés par PCR quantitative en temps réel. Dans un deuxième temps, l'expression des ARN mes-

sagers des gènes d'intérêt a été étudiée au niveau cellulaire par la technique d'HIS.

Les neurones sensoriels du GRD forment une population hétérogène et sont distinguables sur la base de critères anatomiques (taille de leur soma, diamètre et degré de myélinisation de leur axone, morphologie de leur terminaison axonale à la périphérie et le site de leur projection au sein du système nerveux central), fonctionnels (vitesse de conduction des potentiels d'action) et moléculaires (expression de marqueurs moléculaires appartenant à diverse familles : facteurs de transcription, récepteurs membranaires, canaux ioniques, neuropeptides). Une classification simplifiée des différents sous-types de neurones sensoriels des ganglions spinaux chez la souris adulte est présentée dans le Tableau I. De nombreux travaux se sont attachés à identifier des gènes exprimés dans les diverses sous-populations neuronales au sein des GRDs. Cependant le nombre de ces marqueurs, même s'il est en constante augmentation, reste encore relativement limité. La mise au point d'un protocole fiable, rapide et économique d'identification histologique des différents sous-types de neurones sensoriels dans le GRD, a été essentielle pour nos travaux. En particulier, par la technique d'HIS en double marquages ou couplée à un marquage immunohistochimique, nous avons pu déterminer précisément sur coupe de tissus dans quelles populations de neurones sensoriels étaient exprimés les gènes candidats révélés par le criblage des différentes banques SAGE.

	Nociceptifs	Mécanosensitifs	Proprioceptifs
Taille soma (μm)	20-30	30-40	40-50
Type de fibre principale	Ad, C	Ab, Ad	Aa
Diamètre de la fibre (μm)	1-5	6-12	13-20
Vitesse de conduction (m/s)	5-30	35-75	80-120
Terminaisons périphériques	<ul style="list-style-type: none"> • Terminaisons libres 	<ul style="list-style-type: none"> • Disques de Merkel • Corpuscules de Meissner • Terminaisons de Ruffini • Corpuscules de Pacini • Follicule pileux 	<ul style="list-style-type: none"> • Fuseau neuromusculaire • Organes tendineux de Golgi • Récepteurs articulaires
Terminaisons centrales	Lamina I et II-III	Lamina III et IV	Lamina VI-VII et IX
Récepteurs aux facteurs neurotrophiques	<ul style="list-style-type: none"> • Récepteur TrkA pour le NGF (P) • Récepteur Ret (NP), GFR-α1 et α2 pour le GDNF et la neurturine 	<ul style="list-style-type: none"> • Récepteur TrkB pour le BDNF et la NT4/5 • Récepteur Ret pour le GDNF et la neurturine 	<ul style="list-style-type: none"> • Récepteur TrkC pour la NT3
Récepteurs couplés aux protéines G	<ul style="list-style-type: none"> • récepteurs au NPY • PARs • récepteur à la bradykinine • récepteurs à la prostaglandine • récepteurs aux opioïdes • Mrgprs 		
Marqueurs structuraux	Périphérine (NM)	NF200 (M)	NF200 (M)
Neuropeptides	<ul style="list-style-type: none"> • Neuropeptide Y (P) • Substance P (P) • CGRP (P) • Cholécystokinine (P) • Somatostatine (P) 		
Protéines liant le calcium		<ul style="list-style-type: none"> • Calbindine 	<ul style="list-style-type: none"> • Calbindine • Calrétinine • Parvalbumine
Glycoprotéines	se lie à l'IB4 (NP)		
Enzymes	<ul style="list-style-type: none"> • Phosphatase acide, FRAP • TMP 		<ul style="list-style-type: none"> • Anhydrase carbonique
Facteurs de transcription	Runx1 (TrkA-/IB4+/Ret+)	c-Maf, MafA	ER81, Runx3
Canaux ioniques	<ul style="list-style-type: none"> • Nav1.7, Nav1.8 et Nav1.9 • Canaux calciques de type T bas seuil (TrkA-/IB4-) • aKv1.4 (NP) • TREK1 • TRPV1 • ASIC1, ASIC2 et ASIC3 • P2X3 (NP et IB4+) 	<ul style="list-style-type: none"> • Nav1.1 et Nav1.6 • Kv1.1 et Kv1.2 • TRPV2 • Cav3.2 	<ul style="list-style-type: none"> • Nav1.1 et Nav1.6 • Kv1.1 et Kv1.2 • TRPV2

Tableau I : Classification simplifiée des neurones sensoriels des ganglions spinaux de souris adultes.
P : Peptidergique ; NP : Non Peptidergique ; M : Myélinisé ; NM : Non Myélinisé

Ainsi, l'ensemble de cette étude nous a permis d'identifier et de caractériser : 1) des marqueurs spécifiques de populations de neurones sensitifs au sein des GRDs ; 2) une population fine de neurones impliquée dans la perception du toucher ; 3) un nouvel acteur de la régénération des nerfs périphériques après lésion ; et 4) une nouvelle cible thérapeutique potentielle pour le traitement des douleurs neuropathiques chroniques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Animaux et chirurgie

Toutes les expériences ont été approuvées par la direction départementale des services vétérinaires de l'Hérault (autorisation d'expérimentation animale n°34-376, 17 février 2009) et réalisées selon les directives de l'Association Internationale pour l'Etude de la Douleur (IASP).

Des souris issues de la lignée C57BL/6 et âgées de 8 semaines sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane (induction 4-5 %, maintien 1,5-2 %) pendant la chirurgie d'axotomie. La patte arrière gauche de l'animal est immobilisée en position latérale. La peau est incisée à mi-cuisse et les couches de muscle sont séparées afin d'atteindre le nerf sciatique. Une portion de 2 à 4 mm de nerf est sectionnée et retirée. Afin de visualiser les neurones lésés par l'axotomie dans le GRD, l'extrémité de la portion proximale du nerf sectionné est immergée dans une goutte de solution de traceur rétrograde (Fluorogold à 1%). Les couches de muscle sont ensuite délicatement repositionnées et la plaie est refermée par un point de suture. Une injection

sous-cutanée de NaCl 0,9% (10 ml/kg) est réalisée afin d'éviter la déshydratation de l'animal.

Préparation des tissus

Les souris sont préalablement anesthésiées (Ketamine à 100mg/kg et Xylasine à 10 mg/kg) puis euthanasiées par dislocation cérébrale. La colonne vertébrale est disséquée puis coupée en deux dans le sens de la longueur. Après avoir retiré la moelle épinière, les GRDs lombaires 4 à 6 logés contre la paroi osseuse sont prélevés dans du PBS stérile. Les ganglions sont ensuite fixés dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4 % pendant 1 h à température ambiante (TA) et cryopréservés dans une solution de sucrose à 25 % pendant une nuit à 4 °C avant d'être inclus dans un milieu d'enrobage (OCT compound, Tissue-Tek). Des coupes de 14 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un cryostat et sont collectées sur des lames Super Frost Plus (Fisher Scientific) et conservées à -80 °C.

Synthèse des ribosomes

Les ARN totaux extraits de GRDs de souris sont rétro transcrits par RT-PCR. Les séquences d'ADNc sont amplifiées par PCR à l'aide des couples d'oligonucléotides spécifiques des séquences nucléotidiques à visualiser et correspondant aux gènes recherchés. Les fragments amplifiés ainsi obtenus sont clonés sur le principe du «TA cloning» dans le vecteur pGEM-T easy en utilisant le «pGEM-T Easy Vector System I» (réf. A1360, Promega). Le «TA cloning» est une méthode de clonage simple et rapide. Le principe de cette méthode repose sur le fait que les ADN

polymérase dépourvues d'activité exonucléasique de 3' vers 5', comme la Taq polymérase, ajoutent préférentiellement une Adénine (A) supplémentaire en 3' en fin d'élongation. Par le biais d'un vecteur de clonage linéarisé avec une Thymine (T) sortante à chaque extrémité 3'OH (comme le vecteur pGEM-T fournis dans le kit), l'insertion du fragment d'intérêt sera facilitée grâce à la complémentarité des bases. Les ribosondes, d'une taille de 400 à 600 nucléotides et marquées à la Digoxigénine (DIG) ou à la Fluorescéine, sont synthétisées à l'aide des «DIG- ou Fluorescein RNA labeling kit» (réf. 11175025910 et 11685619910 respectivement, Roche) selon les instructions du fabricant. Notre protocole utilise des ribosondes antisens dont la séquence est complémentaire de celle de l'ARNm que l'on veut détecter ainsi que deux types de témoins. Sur les mêmes tissus d'intérêt, une ribosonde sens est utilisée comme témoin négatif puisqu'elle ne peut pas s'hybrider avec l'ARNm ciblé. De plus, un témoin positif est réalisé avec la ribosonde antisens sur d'autres tissus connus pour exprimer fortement le gène étudié. En fin de synthèse, les ribosondes marquées à la DIG ou à la Fluorescéine sont purifiées par chromatographie d'exclusion diffusion sur colonne G-50 (réf. 27-5330-01, GE Healthcare).

Hybridation in situ en simple marquage sur coupes congelées de GRDs

Les lames obtenues précédemment sont hybridées pendant une nuit à 65 °C avec la ribosonde diluée dans du tampon d'hybridation (formamide 50%, sulfate de dextran 10%, yeast tRNA 1 mg/ml,

denhardt's 1X), lavées deux fois pendant 30 min à 65 °C avec du tampon SSC 1X, 50% formamide et 0,1 % Tween-20, deux fois pendant 30 min à TA avec du tampon MABT (acide maléique 0,1 M, NaCl 0,15 M, 0,1 % Tween-20, pH 7,5) puis saturées pendant 2 h à TA avec une solution de blocage (MABT, 20% de sérum de mouton désactivé et 2 % de « Blocking reagent » (réf. 11096176001, Roche)). Les lames sont ensuite incubées une nuit à 4 °C avec l'anticorps anti DIG couplé à la phosphatase alcaline (Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments, réf. 11093274910, Roche) dilué au 1/2000 dans la solution de blocage et révélées après lavages avec la solution de révélation NBT/BCIP (réf. 11383213001 et 11383221001 respectivement, Roche). La révélation est arrêtée avec deux lavages à l'eau.

Double hybridation in situ sur coupes congelées de GRDs

Les doubles hybridation *in situ* sont réalisées sur coupes congelées de 14 µm d'épaisseur préparées comme indiqué au-dessus. Les ribosondes marquées à la DIG et Fluorescéine sont diluées et mélangées dans le tampon d'hybridation puis déposées sur les coupes de tissu. Après hybridation pendant une nuit à 65 °C, les lames sont lavées deux fois pendant 30 min à 65 °C avec du tampon SSC 1X, 50% formamide et 0,1 % Tween-20, deux fois pendant 30 min à TA avec du tampon MABT puis saturées pendant 2 h à TA avec une solution de blocage (MABT, 20% de sérum de mouton désactivé et 2 % de « Blocking reagent » (Roche)). Les lames sont ensuite incubées une nuit à 4 °C avec l'anticorps

anti Fluorescéine couplé à la phosphatase alcaline (Anti-Fluorescein-AP, Fab fragments, réf. 11426338910, Roche) dilué au 1/2000 dans la solution de blocage. Après lavages, la ribosonde marquée à la Fluorescéine est visualisée par réaction enzymatique en utilisant les tablettes Fast Red (réf. 11496549001, Roche) selon les instructions du fabricant. La réaction colorée est arrêtée avec deux lavages à l'eau et les lames sont montées temporairement avec une solution de glycérol à 90 %, Tris 0,1 M, pH 8,2. Les images de la révélation sont acquises sur un microscope optique.

Après lavage pendant 15 min à TA avec une solution de Tris 0,1M à pH 8,2, l'activité de la phosphatase alcaline est inhibée pendant 30 min avec une solution de glycine à 100 mM, 0,1% Tween-20, pH 2,2. Les lames sont ensuite lavées deux fois pendant 15 min dans du PBS, 0,1% Tween-20, post-fixées dans du PFA 4% pendant 10 min à TA, lavées pendant 20 min à TA dans du PBS, 0,1% Tween-20 puis deux fois pendant 30 min dans du tampon MABT. Les lames sont à nouveau saturées avec la solution de blocage pendant 2h à TA et incubées la nuit à 4°C avec l'Ac anti DIG-PA dilué au 1/2000. Les lames sont lavées comme précédemment et incubées cette fois avec la solution de révélation NBT/BCIP selon les instructions du fabricant. La réaction colorée est arrêtée avec deux lavages à l'eau.

Les précipités colorés obtenus avec la révélation Fast Red sont décolorés en incubant les lames dans des concentrations croissantes d'éthanol et deux incubations

finales dans de l'éthanol 100% pendant 10 min. Les marquages obtenus avec la révélation NBT/BCIP sont photographiés au microscope afin de les comparer à ceux obtenus avec la révélation Fast Red sur les mêmes coupes. Les signaux obtenus avec la révélation Fast Red sont alors transformés, grâce au logiciel Adobe Photoshop, en fausse couleur fluorescente rouge et les signaux obtenus avec la révélation NBT/BCIP sont eux transformés en fausse couleur fluorescente verte. Les marquages ainsi convertis en fausse couleur peuvent alors être superposés et les co-localisations apparaissent en jaune. Cette approche séquentielle permet l'identification claire de co-localisation au niveau d'une seule cellule.

Hybridation in situ combinée à un immunomarquage

Pour une hybridation *in situ* combinée à un immunomarquage, les lames sont d'abord hybridées avec la ribosonde marquée à la DIG. Les lames sont ensuite saturées avec une solution de blocage (PBS, BSA 1%, Triton 0,1%) pendant 1h à TA puis incubées avec la solution d'anticorps primaire suivie de la solution d'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. Après acquisition au microscope des marquages fluorescents, les lames sont saturées avec 20% de sérum de mouton, incubées avec l'Ac anti DIG-PA et révélées avec la solution NBT/BCIP comme indiqué précédemment. Les signaux obtenus en hybridation *in situ* sont alors photographiés au microscope puis convertis en fausse couleur fluorescente et peuvent être alors superposés aux marquages im-

munohistochimiques fluorescents acquis à l'étape précédente. La co-localisation au niveau d'une seule cellule peut alors être identifiée.

RÉSULTATS

Identification de gènes marqueurs de sous-populations neuronales du GRD

L'analyse par criblage différentiel des banques SAGE de GRDs sauvages versus GRDs dépourvus de neurones thermo-nociceptifs (à partir des souris mutantes *TrkA^{-/-}*) a permis de mettre en évidence l'expression différentielle de 240 gènes entre les deux conditions. Parmi eux, des marqueurs connus de sous-populations de neurones sensoriels comme CGRP ou *Scn10a*, exprimés dans les neurones nociceptifs, ont été retrouvés dans cette liste validant ainsi la méthodologie employée.

Les gènes *Crip2*, *Dok4* et *Grik1* dont l'expression semblait être restreinte à une sous-population de neurones sensoriels ont pu être révélés par cette analyse (3). *Crip2* (Cysteine-rich intestinal protein 2) est une protéine adaptatrice intracellulaire qui pourrait interagir avec l'actine du cytosquelette (6). *Dok4* (Downstream of tyrosine kinase/Docking proteins) est connue pour son rôle dans la voie de signalisation des récepteurs tyrosine kinase (7). *Grik1*, alias *GluR5* (Glutamate receptor, ionotropic, kainate 1), est un récepteur du glutamate dont l'expression a été associée à celle des canaux *P2X3* dans les neurones nociceptifs non-peptidergiques des GRDs (8) et joue un rôle dans la nociception (9). Ces données issues de l'analyse des banques SAGE ont été dans un premier temps validées par

l'utilisation de la technique de PCR quantitative. Dans un deuxième temps, les profils d'expression de ces gènes établis par HIS sur des coupes de GRDs « sauvages » et *TrkA^{-/-}* à P0 ainsi qu'à l'âge adulte ont permis de mettre en évidence leur expression restreinte dans ces structures. (Figure 1 A-R). Un travail essentiel à cette étape a été de pouvoir déterminer précisément et aisément dans quelle(s) sous-population(s) fonctionnelle(s) de neurones sensoriels étaient exprimés ces 3 gènes d'intérêt. Pour cela la mise au point d'un protocole fiable, rapide et économique d'identification histologique des différents sous-types de neurones sensoriels dans le GRD (nociceptifs, mécanocéptifs et proprioceptifs) a été indispensable. Dans cette optique, des techniques de doubles marquages ont été développées : double HIS et HIS suivie d'un immunomarquage sur coupes de GRDs en utilisant des marqueurs de référence pour chacune des populations de neurones. Parmi ces marqueurs de référence, plusieurs récepteurs tyrosine kinase des facteurs neurotrophiques appartenant à différentes familles (*Trk* et *Ret*) ont notamment été utilisés : *TrkA* pour identifier la population de neurones nociceptifs dits « peptidergiques », *TrkB* pour les neurones mécanocéptifs, *TrkC* pour les neurones proprioceptifs et *Ret* pour une population de neurones mécanocéptifs de gros diamètre mais aussi pour l'ensemble des neurones nociceptifs dits « non-peptidergiques » de petite taille. Il est à noter que cette dernière population est également identifiable histologiquement sur la base des propriétés biochimiques de sa membrane et notamment la présence de glycoprotéines

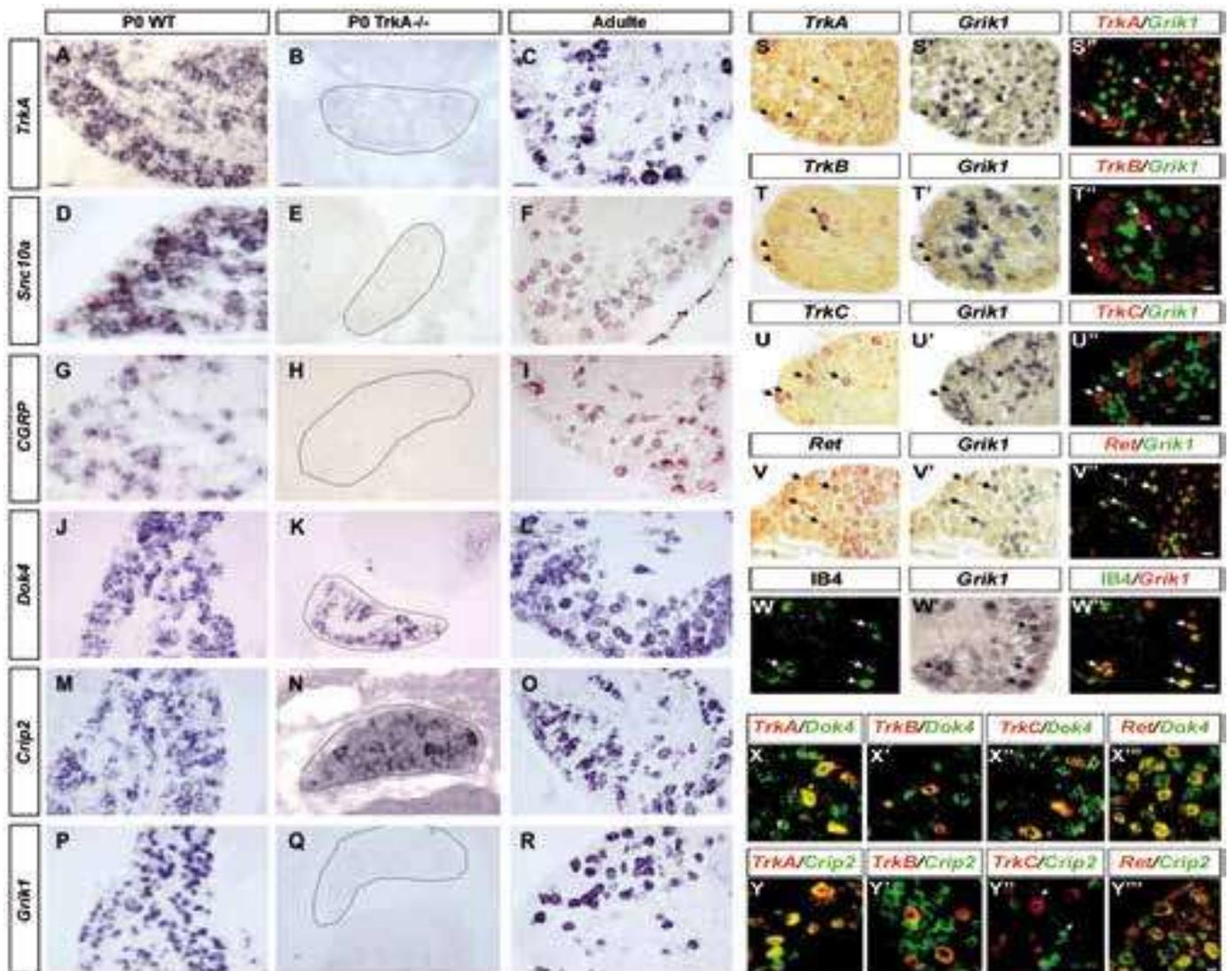


Figure 1 : Profils d'expression et co-localisation des gènes *Grik1*, *Dok4* et *Crip2* avec les marqueurs de référence des sous populations de neurones sensitifs. D'après (3).

HIS sur coupes de GRDs P0 sauvages (P0 WT) (A, D, G, J, M et P), P0 *TrkA* mutant (P0 *TrkA*^{-/-}) (B, E, H, K, N et Q) et adultes (C, F, I, L, O et R) avec les ribosomes marqués à la DIG spécifiques de *TrkA* (A, B et C) ; *Scn10a* (D, E et F) ; *CGRP* (G, H et I) ; *Dok4* (J, K et L) ; *Crip2* (M, N et O) et *Grik1* (P, Q et R). Les GRDs *TrkA* mutants sont entourés en B, E, H, K, N et Q. Les résultats montrent que *Dok4* est exprimé dans la majorité des neurones et quelques cellules négatives ont été observées. *Crip2* est largement exprimé bien qu'un nombre substantiel de cellules négatives ait été noté. *Grik1* est exprimé dans une sous-population de neurones et est complètement absent dans le GRD *TrkA* mutant.

Des doubles HIS ont été réalisées sur des coupes de GRDs adultes en utilisant le système de détection Fluorescein/Fast Red pour *TrkA* (S, X et Y), *TrkB* (T, X' et Y'), *TrkC* (U, X'' et Y'') et *Ret* (V, X''' et Y''') et la détection immunohistochimique pour l'isolectine B4 (W). L'ARNm des gènes *Grik1* (S', T', U', V' et W'), *Dok4* (X-X''') et *Crip2* (Y-Y''') a été par la suite révélé en utilisant le système de détection DIG/NBT-BCIP. Les marquages obtenus en HIS ont été convertis en couleurs pseudo fluorescentes afin de les superposer pour révéler les co-localisations cellulaires. *Grik1* est exclu de la population *TrkA*⁺ (S''), *TrkB*⁺ (T'') et *TrkC*⁺ (U'') mais co-localise avec les populations *Ret*⁺ (V'') et IB4⁺ (W''). *Dok4* co-localise avec tous les sous-types neuronaux majeurs du GRD (X-X'''). *Crip2* est spécifiquement exclu de la population *TrkC*⁺ (Y'').

particulières capables de fixer l'isolectine B4. La co-détection ou l'exclusion de ces différents marqueurs et de nos gènes candidats a permis d'établir leur localisation précise au sein des GRDs. Le gène *Grik1/GluR5* est en effet exprimé spécifiquement dans l'ensemble de la population des neurones nociceptifs non-peptidergiques *Ret+/IB4+* (Figure 1 S-W''), confirmant et étendant les données de la littérature (8). Le gène *Dok4* quant à lui est exprimé de manière restreinte dans le GRD, mais dans tous les sous-types de neurones sensoriels (Figure 1 X-X''). Enfin, le gène *Crip2* est exprimé dans des sous-populations de neurones nociceptifs et mécanoceptifs mais est totalement exclu des neurones proprioceptifs (Figure 1 Y-Y''). Ces marqueurs de sous-populations ont permis d'étendre nos connaissances de la diversité moléculaire des différents types de neurones sensitifs dans le GRD pour une meilleure compréhension de leurs spécificités fonctionnelles.

D'autre part, la présence dans les GRDs du gène *MafA* qui code pour un facteur de transcription à domaine leucine zipper a pu être également révélée par l'analyse comparative des banques SAGE à différents stades du développement et chez adulte. Le profil d'expression du gène *MafA* a dans un premier temps été établi par simple marquage en utilisant la technique d'HIS. Ceci nous a permis de déterminer que *MafA* est exprimé dans une sous-population très discrète de neurones du GRD de grande taille dès le stade embryonnaire 11,5 jours (E11,5) jusqu'à la naissance (Figure 2 A-F). Une fois encore, afin de caractériser

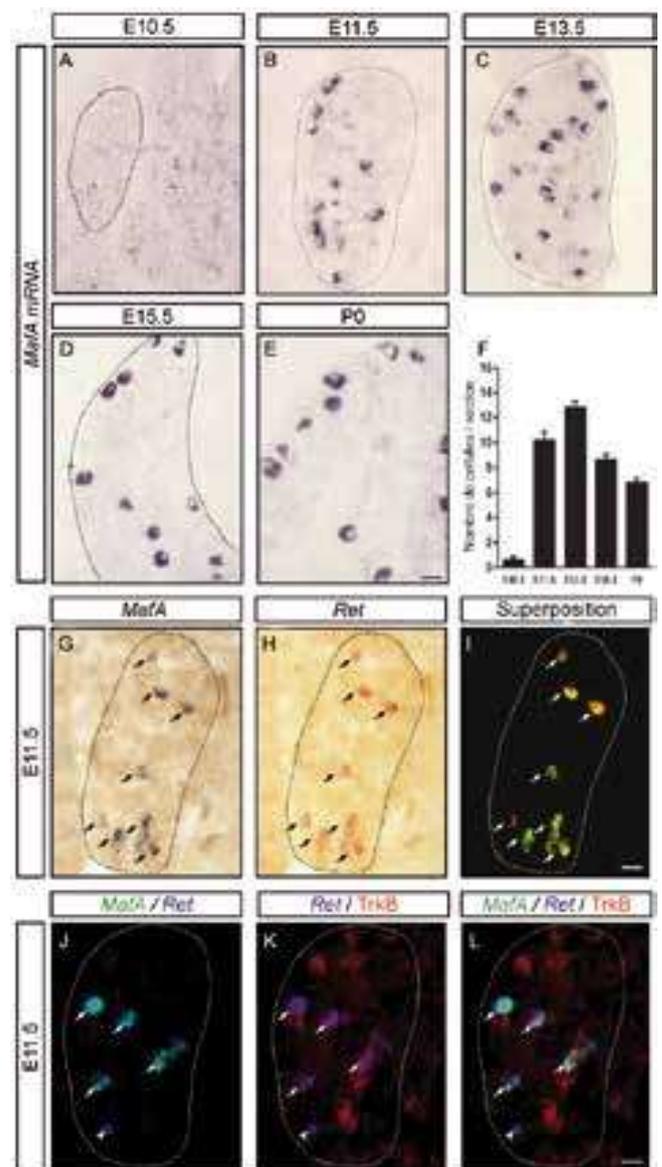


Figure 2 : Profil d'expression du facteur de transcription *MafA* au cours du développement du GRD. D'après (11).

Analyse de l'expression de l'ARNm de *MafA* par HIS sur coupes de GRDs aux stades E10,5, E11,5, E13,5, E15,5 et P0 (A-E). Des cellules exprimant *MafA* apparaissent au stade E11,5 et sont retrouvées à tous les autres stades. Quantification du nombre de cellules exprimant *MafA* aux différents stades de développement du GRD (F).

Double HIS pour *MafA* (G) et *Ret* (H) et superposition des images converties en couleur pseudo-fluorescente (I). Tous les neurones exprimant *MafA* au stade E11,5 expriment le récepteur *Ret*.

Triple marquage pour *MafA*, *Ret* et *TrkB* (J-L), double HIS pour *MafA* et *Ret* (J), HIS pour *Ret* combinée à un immunomarquage pour *TrkB* (K) et superposition des images converties en couleur pseudo fluorescente (L). Les neurones exprimant *MafA* co-expriment partiellement *TrkB*.

les sous-populations du GRD l'exprimant, la mise au point de la technique de doubles marquages utilisant les marqueurs de référence Trk et Ret a été mise à profit. Nous avons pu ainsi quantifier le nombre de cellules MafA+ et MafA+/Ret+ et démontrer que toutes les cellules MafA expriment le récepteur Ret à E11,5 (Figure 2 G-I), stade auquel les petits neurones nociceptifs Ret+ ne sont pas présents. Par ailleurs, cette population n'exprime ni TrkA ni TrkB (10) démontrant ainsi que ce ne sont ni des neurones nociceptifs ni des proprioceptifs. De plus, au stade E11,5, la quantification des doubles marquages obtenus avec MafA et TrkB nous a permis de déterminer que 80 % des neurones MafA+ co-expriment TrkB (Figure 2 J-L). Cette analyse du profil spatio-temporel d'expression du gène MafA ainsi que sa co-expression et/ou exclusion avec plusieurs marqueurs de références ont permis d'associer le facteur de transcription MafA à une population précoce de gros neurones mécanosensitifs Ret+ (11).

Identification de gènes régulés après lésion périphérique

L'analyse des transcriptomes de GRDs de souris au stade adulte et après lésion du nerf sciatique a permis de révéler des gènes connus et déjà décrits dans la littérature comme étant régulés après axotomie ; c'est le cas par exemple de Atf3 (Activating Transcription Factor 3), Gadd45a (Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha), Sprr1a (Small proline-rich protein 1a), Hsp27 (Heat shock protein 1) ou encore le Neuropeptide Y (NPY) (12) (13) (14) (15) (16). Il était important de

retrouver de tels gènes dans nos banques puisqu'ils représentent un critère de validation de la méthodologie utilisée. Cette analyse présentait un intérêt tout particulier dans l'étude de la réponse des neurones de GRDs à une lésion périphérique et notamment d'identifier de nouveaux acteurs potentiellement impliqués dans les processus de pousse régénérative.

Parmi les gènes révélés par cette analyse, une protéine kinase a particulièrement retenu notre attention : CaMKIa (Calcium-Calmodulin dependant Kinase I alpha). L'expression de cette kinase n'ayant jusque-là jamais été décrite dans le système nerveux périphérique, son induction dans les GRDs après un traumatisme du nerf était une donnée inédite. Par ailleurs CaMKIa est connue dans le système nerveux central pour intervenir dans le développement neuronal et la synaptogenèse (17). La confirmation de son profil d'expression dans les GRDs par PCR quantitative (Figure 3 A-C) et ces données bibliographiques en ont fait un excellent candidat pour l'étude des événements moléculaires nécessaires à la régénération post-lésionnelle des neurones périphériques. La caractérisation précise de son profil d'expression dans différents tissus (Figure 3 D et E) et après plusieurs types de traumatismes périphériques a été établie par la technique d'HIS. Les résultats obtenus ont validé l'induction de l'expression de *CaMKIa* dans les neurones de GRDs 3 jours après une axotomie (Figure 3 F-K). De manière intéressante, cette induction ne concerne pas tous les neurones lésés, mais préférentiellement des neurones de

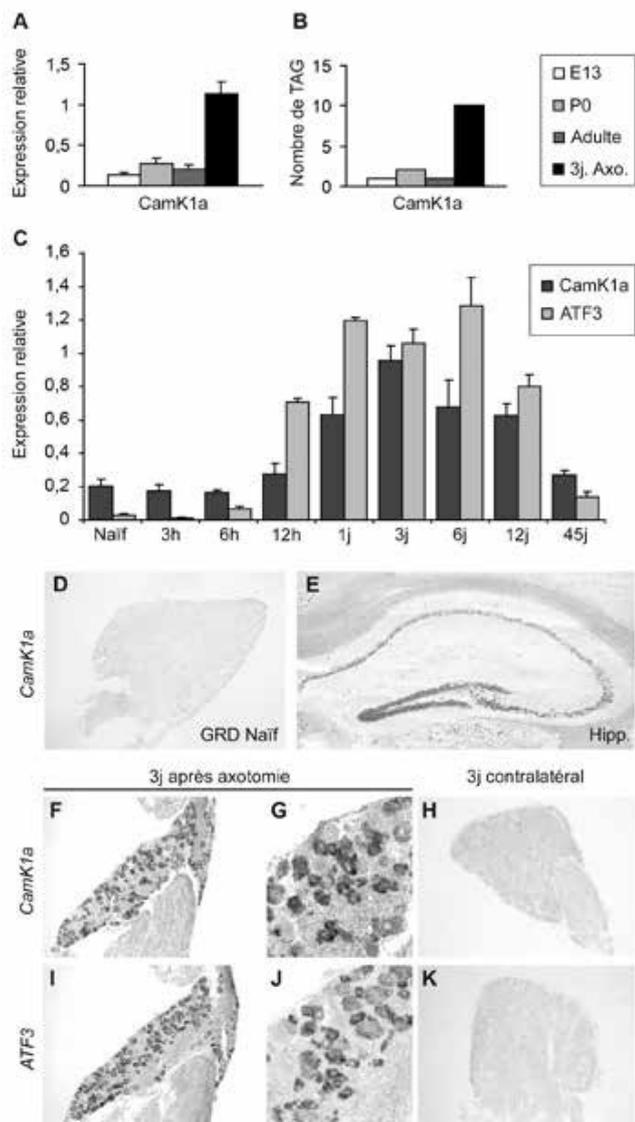


Figure 3 : L'expression du gène *CaMK1a* est induite après axotomie du nerf sciatique. D'après (18).

Analyse de l'expression de l'ARNm de *CaMK1a* à différents stades de développement du GRD (E13, P0 et Adulte) et trois jours après axotomie (3j. Axo.) par RT-PCR quantitative (A) et la technologie SAGE (B). Une forte augmentation de l'expression de *CaMK1a* est observée après section de nerf sciatique en comparaison des niveaux de base pendant le développement et au stade adulte du GRD. La cinétique d'expression des gènes *CaMK1a* et *ATF3* réalisée en RT-PCR quantitative montre une augmentation de l'expression de *CaMK1a* dès 12h après axotomie, un pic d'expression entre 1 à 12 jours et un retour proche du niveau basal à 45 jours. *ATF3* présente un profil similaire sauf que l'induction de son expression commence plusieurs heures avant *CaMK1a* (C).

L'HIS utilisant la ribosonde *CaMK1a* montre une absence d'expression sur les coupes de GRDs adultes naïfs (D) et une expression dans les couches neuronales de l'hippocampe (E).

L'HIS sur des coupes de GRDs prélevés 3 jours après axotomie du nerf sciatique révèle que le gène *CaMK1a* est détecté dans les neurones des GRDs ipsilatéraux (F et G) mais est absent dans les GRDs contralatéraux (H). Nous avons utilisé comme contrôle positif le gène *ATF3* qui est connu pour être induit après axotomie. Comme attendu, *ATF3* est exprimé dans les neurones des GRDs ipsilatéraux (I et J) mais pas dans les GRDs contralatéraux (K).

moyenne et grande tailles. La localisation subcellulaire de *CaMK1a* étudiée par immunofluorescence, dans le cytoplasme et les axones au niveau du nerf sciatique, suggère un transport de la kinase vers le site de lésion, et donc un rôle potentiel de cette protéine dans la pousse axonale post-traumatique. Des études *in vitro* d'inhibition pharmacologique de la voie *CaMKK/CaMK1a* et d'extinction de *CaMK1a* par siRNA ont appuyé cette hypothèse, révélant une baisse significative de la vitesse de pousse des neurones de GRDs lésés. Ces données indiquent donc que la voie *CaMKK/CaMK1a* contribue à la capacité intrinsèque des neurones périphériques à repousser à la suite d'une lésion nerveuse (18).

Lors de cette même analyse des données SAGE de GRDs adultes « sauvages » versus adultes « axotomisés », le gène *Fxyd2* a été identifié dans le groupe de gènes dont l'expression présentait un pic au stade adulte et chutait après axotomie (Figure 4 A), au contraire de *CAMK1a*. Ce gène appartient à la famille des molécules *Fxyds* qui ont la capacité d'interagir avec la pompe *Na,K-ATPase* et d'en réguler la fonction. En 2012, nos résultats ont permis de décrire pour la première fois son expression dans le système nerveux périphérique (19). Les profils d'expression de ce gène ont été également établis par HIS sur des coupes de GRDs embryonnaire à E13 jusqu'au stade adulte (Figure 4 B-E). En accord avec les résultats obtenus par SAGE et par PCR quantitative, aucune expression significative de *Fxyd2* n'a pu être détectée avant la première semaine

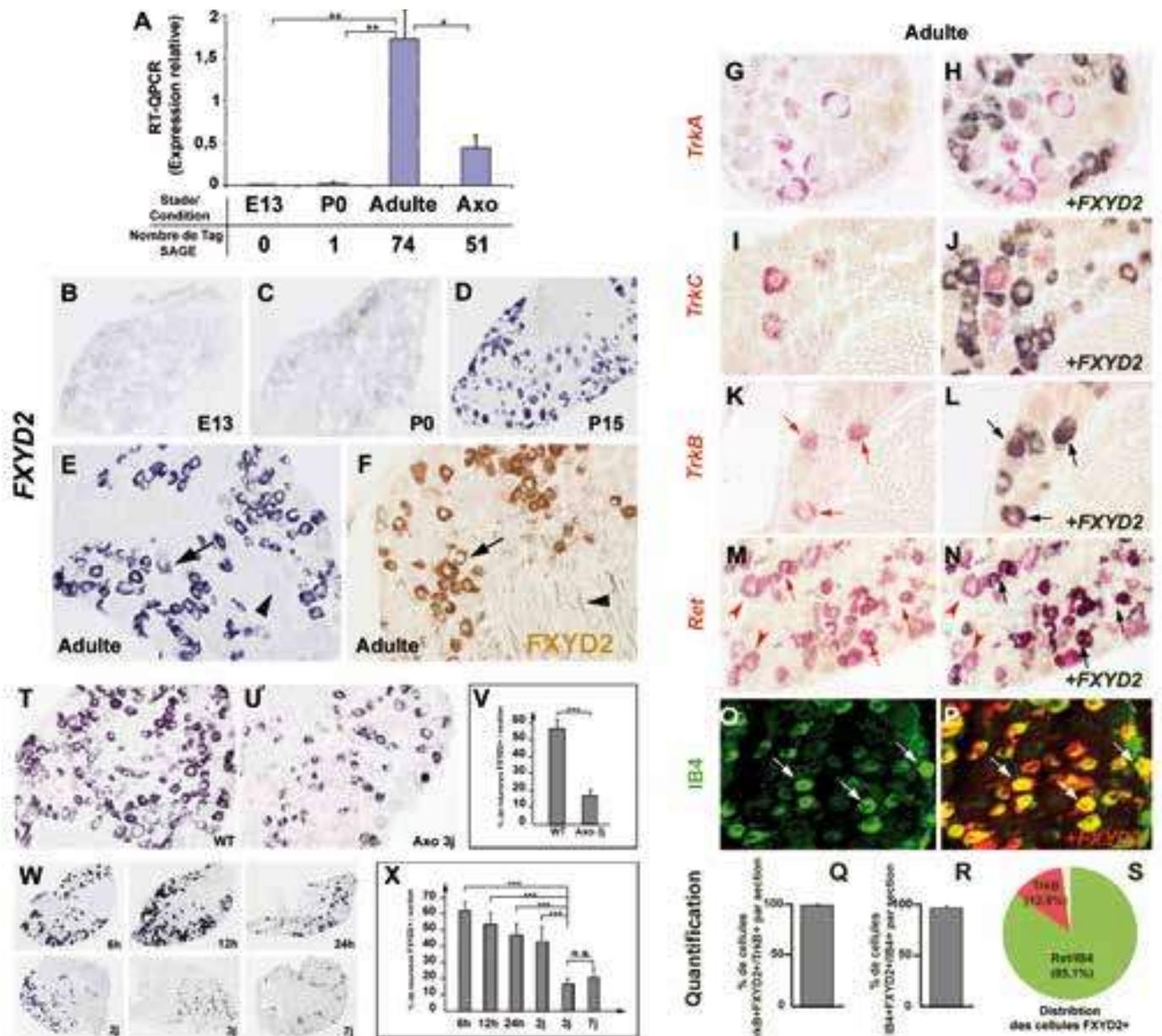


Figure 4 : Profil d'expression du gène *Fxyd2* au cours du développement du GRD et après section du nerf sciatique. D'après (19).

Analyse de l'expression de l'ARNm de *Fxyd2* à différents stades de développement du GRD (E13, P0 et Adulte) et trois jours après axotomie (Axo) par RT-PCR quantitative et la technologie SAGE (A).

HIS de *Fxyd2* sur des coupes de GRDs aux stades E13, P0, P15 et adulte (B-E). Les flèches et têtes de flèche en E indiquent les neurones *Fxyd2+* et *Fxyd2-* respectivement. Marquage immunohistochemique de la protéine *Fxyd2* sur coupes de GRDs adultes (F). Les flèches et têtes de flèche indiquent respectivement les corps cellulaires et fibres nerveuses positifs.

Doubles marquages pour *Fxyd2* et *TrkA*, *TrkB*, *TrkC*, *Ret* ou *IB4* sur coupes de GRDs adultes (G-P). Aucune co-localisation n'est observée entre *Fxyd2* et *TrkA* ou *TrkC* (H et J). Des doubles marquages sont observés pour les neurones *TrkB+* (flèches en L) et *Ret+/IB4+* (flèches en N et P). Les têtes de flèche en M et N indiquent les neurones *Ret+* de grande taille qui sont *Fxyd2* négatifs. Les pourcentages des neurones *TrkB+* (Q) ou *IB4+* (R) exprimant *Fxyd2* indiquent que virtuellement tous les neurones mécanocéptifs *TrkB+* et tous les neurones nociceptifs non peptidergiques sont *Fxyd2+*. Distribution des neurones *Fxyd2+* dans deux principaux types neuronaux : les *TrkB+* (13 %) et les *Ret+/IB4+* (85 %) (S).

L'HIS de *Fxyd2* sur des coupes de GRDs adultes naïfs (WT) (T) et 3 jours après axotomie (Axo 3j) (U) montre une perte d'expression de *Fxyd2* dans les GRDs après 3 jours d'axotomie. La quantification du pourcentage de neurones *Fxyd2+* chez le GRD naïf et 3 jours après axotomie indique une réduction de 57 % à 16 % après lésion du nerf sciatique (V). Cinétique d'expression de *Fxyd2* dans les GRDs de 6h jusqu'à 7 jours après axotomie par HIS (W). La quantification révèle une importante diminution de l'expression de *Fxyd2* entre 2 et 3 jours pour rester stable à 7 jours après axotomie (X).

post-natale. En effet l'expression de ce gène dans le GRD apparaît environ 7 jours après la naissance et semble concerner l'ensemble des neurones. Cependant cette expression de *Fxyd2* se restreint progressivement au cours du temps pour ne concerner chez l'adulte plus que 60% des neurones. Ces résultats ont été confirmés et étendus par l'utilisation d'un anticorps polyclonal spécifique de la protéine *Fxyd2*. Au sein des neurones, la protéine *Fxyd2* est détectée aussi bien au niveau du corps cellulaire que dans les axones (Figure 4 F). Par la suite, la caractérisation des sous-populations du GRD adulte exprimant le gène *Fxyd2* a été réalisée grâce à différentes techniques de doubles marquages. Les résultats obtenus ont ainsi révélé que le gène *Fxyd2* est exprimé principalement dans deux grandes populations de neurones sensitifs chez l'adulte : la population *TrkB+* identifiant les neurones mécanosensitifs, et la population de neurones *Ret+/IB4+* correspondant aux petits neurones nociceptifs « non-peptidergiques » (Figure 4 G-S). Par ailleurs, les résultats de l'analyse des banques SAGE adultes révélèrent que l'expression de *Fxyd2* chutait après section de nerf sciatique. Afin d'étudier plus en détail ce phénomène, nous avons analysé l'expression de *Fxyd2* à différents temps après axotomie (6 heures, 12 heures, 1 jour, 2 jours, 3 jours et 7 jours) par HIS sur les GRDs adultes. La technique d'HIS nous a également permis de quantifier finement la chute d'expression de *Fxyd2*. Cette expérience nous a montré que dès 3 jours après axotomie, le pourcentage de neurones *Fxyd2+* au sein du GRD passe de 60% à 16% (Figure 4 T-X). De plus,

nous avons démontré que l'administration *in vivo* de facteurs neurotrophiques de la famille GDNF, ligand du récepteur *Ret* permet le maintien de l'expression de *Fxyd2* au sein des neurones nocicepteurs *IB4+* lésés. Ce résultat démontre donc que la voie de signalisation *Ret* participe au maintien de l'expression de *Fxyd2* dans les neurones nocicepteurs non peptidergiques chez l'adulte (19).

CONCLUSION

L'analyse des banques d'expression SAGE à partir de GRDs de souris dans différentes conditions nous a permis d'identifier des acteurs moléculaires du système somatosensoriel. L'HIS a été la technique essentielle à la validation des différents résultats issus de l'analyse de ces différentes banques. En effet, les profils d'expression précis des différents gènes candidats ont pu être établis par simple marquage en HIS sur coupes de GRDs aux différents stades de développement, mais également en condition pathologique (en l'occurrence, après axotomie). De plus, des marquages par double HIS ainsi que par combinaison d'HIS suivie d'un immunomarquage ont permis de déterminer précisément et aisément dans quelle sous-population de neurones sensoriels étaient exprimés nos gènes d'intérêt.

L'analyse comparative des banques SAGE de GRDs sauvages versus GRDs dépourvus de neurones thermoceptifs a révélé le gène *Grik1/GluR5* comme un marqueur permettant d'identifier l'ensemble des neurones nociceptifs non peptidergiques. Ce résultat est en accord avec des

études pharmacologiques précédemment réalisées sur des cultures de neurones de GRDs au stade P0. En effet, Lee et collaborateurs avaient identifié le gène *Grik1* dans les cellules liant l'isolectine B4 (20). D'autre part, Lucifora et collaborateur avaient également montré par doubles marquages immunohistochimiques que la protéine *Grik1* était fortement exprimée dans la population nociceptive P2X3-positif (8). Nos résultats confirment et étendent ces données puisque nous avons pu montrer en HIS que le gène *Grik1* ne co-localise jamais avec le récepteur *TrkA* et que son expression est restreinte aux neurones nociceptifs de petit diamètre *Ret+/IB4+* jusqu'au stade adulte.

Cette analyse a également permis de mettre en évidence l'expression du gène *Crip2* dans le GRD. Son expression est certes large mais, de façon frappante, elle est totalement exclue des neurones proprioceptifs. Le rôle de la voie de signalisation *TrkC*-dépendante dans les neurones proprioceptifs est connu depuis longtemps. Au-delà d'une fonction essentielle dans la survie neuronale, cette voie intervient également dans la spécification de l'identité des neurones proprioceptifs, notamment en étant indispensable à l'induction de l'expression du facteur de transcription *ER81* qui contrôle la formation du circuit réflexe monosynaptique proprioceptif (21). Il a par ailleurs été démontré que le facteur de transcription *Runx3* joue un rôle essentiel dans l'acquisition du phénotype proprioceptif (10) et dans la mise en place des projections proprioceptives dans la région ventrale de la moelle épinière (22).

Il y agit notamment en réprimant l'expression du marqueur des neurones mécanocceptifs *TrkB*. Ainsi, le gène *Crip2* pourrait, de manière similaire à *TrkB*, être réprimé par *Runx3* et/ou par la signalisation *TrkC* dans cette population.

Par ailleurs, cette analyse a permis de révéler l'expression du gène *Dok4* au sein de tous les sous-types de neurones sensoriels du GRD adulte. Cette expression est majoritaire dans les neurones nociceptifs *Ret+/IB4+*. Ceci est particulièrement intéressant dans la mesure où une interaction entre *Dok4* et *Ret* a été mise en évidence dans un système d'expression cellulaire hétérologue (7). Il pourrait donc avoir un rôle dans la transmission du signal passant par ce récepteur tyrosine-kinase.

L'analyse comparative des banques SAGE de GRDs à différents stades du développement (E13, P0 et adulte) a permis de mettre en évidence l'expression du facteur de transcription *MafA* au sein des ganglions rachidiens. L'établissement de son profil d'expression par HIS aux premiers stades du développement des GRDs a été essentiel et a révélé son expression dès le stade embryonnaire 11,5 jours. Des manipulations complémentaires nous ont permis d'identifier le gène *MafA* comme un marqueur d'une population fine de neurones responsables de la perception du toucher au cours du développement embryonnaire.

D'autre part, l'analyse différentielle des banques adultes sauvages et post-axotomie nous a permis quant à elle de

caractériser des gènes candidats potentiellement impliqués dans les capacités régénératives des neurones du GRD et/ou dans les remaniements fonctionnels à l'origine des douleurs neuropathiques. En effet, le traumatisme du nerf périphérique induit de profondes modifications moléculaires et cellulaires conduisant à un processus de régénération. Cependant cette régénération est dans la plupart des cas incomplète et conduit souvent à des troubles moteurs, neurovégétatifs et sensitifs comme les douleurs dites neuropathiques. La recherche de telles molécules présente donc un intérêt important pour une meilleure compréhension des événements moléculaires induits après un traumatisme et notamment afin d'identifier les déterminants et voies de régulation/signalisation clés impliqués dans le déclenchement d'un programme de croissance axonale dans le neurone adulte périphérique. Nos résultats de cette analyse indiquent que la voie CaMKK/CaMKIIa contribue à la capacité intrinsèque des neurones périphériques à repousser à la suite d'une lésion nerveuse et révèlent le gène CaMKIIa comme un nouvel acteur de la régénération des nerfs périphériques après lésion.

Cette même analyse a également permis d'identifier l'expression du gène *Fxyd2* dans le système nerveux périphérique. En effet, nous avons pu montrer que ce gène est exprimé dans deux sous-populations spécifiques de neurones du GRD au stade adulte : les neurones mécanocéptifs *TrkB+* et les neurones nociceptifs non-peptidergiques qui lient l'isolectine B4 et qui expriment le récepteur *Ret*. D'autre part, nous avons

démonstré que 3 jours après section du nerf sciatique, l'expression de *Fxyd2* s'éteint dans les neurones effectivement axotomisés et que la voie de signalisation *Ret* est nécessaire au maintien de son expression dans les neurones nocicepteurs non peptidergiques de GRDs adultes. Des manipulations complémentaires encore en cours au laboratoire révèlent ce gène comme un candidat à haut potentiel en tant que cible thérapeutique pour le traitement des douleurs neuropathiques chroniques.

Parmi les différentes techniques d'analyse d'expression génique, l'HIS est la principale méthode pour mettre en évidence la présence d'une séquence d'acides ribonucléiques déterminée au sein d'un tissu ou d'une population cellulaire. Dans notre analyse transcriptomique du GRD de souris dans différentes conditions, elle a constitué notre méthode de référence pour la validation de nos résultats et l'établissement des profils d'expression précis des nombreux gènes candidats. En effet, la mise au point de protocoles robustes et reproductibles d'HIS en double marquage ou couplée à un marquage immunohistochimique sur GRDs a été essentielle. Il nous est possible aujourd'hui de caractériser, de manière fiable et aisée, les populations de neurones sensoriels où est exprimé un gène d'intérêt. Les méthodes d'analyse du transcriptome ont beaucoup évolué ces dernières années et la technique d'hybridation reste aujourd'hui notre méthode de prédilection pour valider nos résultats obtenus par exemple en séquençage de seconde génération (NGS Next-generation sequencing) ou encore pour l'identifica-

tion de cibles de facteurs de transcription (par Chromatin Immunoprecipitation). Enfin, le recours à l'HIS s'avère encore aujourd'hui une technique de choix qui complémente efficacement l'utilisation d'anticorps. En effet, dans certains cas, si les immuno-marquages sont très utiles pour caractériser la localisation subcellulaire d'une protéine d'intérêt, ils peuvent s'avérer difficiles à interpréter lorsqu'il s'agit d'identifier clairement les types cellulaires qui les expriment. C'est en particulier le cas pour les neurones sensoriels regroupés dans les GRDs qui envoient de

longs prolongements vers la périphérie et la moelle épinière. Certaines protéines étant par exemple localisées spécifiquement dans les axones ou au niveau des synapses, l'HIS constitue une technique complémentaire indispensable pour l'identification des corps cellulaires correspondants. Par ailleurs, malgré le nombre en constante augmentation d'anticorps disponibles, leurs coûts restent encore élevés et certains s'avèrent encore inefficaces en analyses histochimiques. L'HIS constitue une solution de repli relativement moins onéreuse et la plupart du temps efficace.

BIBLIOGRAPHIE

1. PARDUE M. L., GALL J. G.: Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1969, 64 (2), 600–604.
2. MECHALY I., BOURANE S., PIQUEMAL D., AL-JUMAILY M., VEN-TEO S., PUECH S., SCAMPS F., VALMIER J., CARROLL P.: Gene profiling during development and after a peripheral nerve traumatism reveals genes specifically induced by injury in dorsal root ganglia. *Mol. Cell Neurosci.*, 2006, 32 (3), 217-29.
3. BOURANE S., MECHALY I., VEN-TEO S., GARCES A., FICHARD A., VALMIER J., CARROLL P.: a sage-based screen for genes expressed in subpopulations of neurons in the mouse dorsal root ganglion. *BMC Neurosci.*, 2007, 8, 97.
4. VELCULESCU V. E., ZHANG L., VOGELSTEIN B., KINZLER K. W.: Serial analysis of gene expression. *Science*, 1995, 270, 484-487.
5. VIRLON B., CHEVAL L., BUHLER J. M., BILLON E., DOUCET A., ELA-LOUF J. M.: Serial microanalysis of renal transcriptomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 15286-15291.
6. VAN HAM M., CROES H., SCHEPENS J., FRANSEN J., WIERINGA B., HENDRIKS W.: Cloning and characterization of mCRIP2, a mouse LIM-only protein that interacts with PDZ domain IV of PTP-BL. *Genes Cells*, 2003, 8, 631-644.
7. GRIMM J., SACHS M., BRITSCH S., DICESARE S., SCHWARZ-ROMOND T., ALITALO K., BIRCHMEIER W.: Novel p62dok family members, dok-4 and dok-5, are substrates of the c-Ret receptor tyrosine kinase and mediate neuronal differentiation. *J. Cell. Biol.*, 2001, 154, 345-354.
8. LUCIFORA S., WILLCOCKSON H. H., LU C. R., DARSTEIN M., PHEND K. D., VALTSCHANOFF J. G., RUSTIONI A.: Presynaptic low- and high-affinity kainate receptors in nociceptive spinal afferents. *Pain*, 2006, 120, 97-105.
9. KERCHNER G. A., WILDING T. J., LI P., ZHUO M., HUETTNER J. E.: Pre-synaptic kainate receptors regulate spinal sensory transmission. *J. Neurosci.*, 2001, 21, 59-66.
10. KRAMER I., SIGRIST M., DE NOOIJ J. C., TANIUCHI I., JESSELL T. M., ARBER S.: A role for Runx transcription factor signaling in dorsal root ganglion sensory neuron diversification. *Neuron*, 2006, 49, 379-393.

11. BOURANE S., GARCES A., VEN-
TEO S., PATTYN A., HUBERT
T., FICHARD A., PUECH S.,
BOUKHADDAOUI H., BAUDET C.,
TAKAHASHI S., VALMIER J., CAR-
ROLL P.: Low-threshold mechanore-
ceptor subtypes selectively express
MafA and are specified by Ret signaling. *Neuron*, 2009, 64 (6), 857-70.
12. TSUJINO H., KONDO E., FUKUO-
KA T., DAIY., TOKUNAGA A., MIKI
K., YONENOBU K., OCHI T., NO-
GUCHI K.: Activating transcription
factor 3 (ATF3) induction by axotomy
in sensory and motoneurons: A novel
neuronal marker of nerve injury. *Mol.
Cell Neurosci.*, 2000, 15, 170-182.
13. BEFORT K., KARCHEWSKI L.,
LANOUE C., WOOLF C. J.: Selec-
tive up-regulation of the growth arrest
DNA damage-inducible gene Gadd45
alpha in sensory and motor neurons
after peripheral nerve injury. *Eur. J.
Neurosci.*, 2003, 18, 911-922.
14. BONILLA I. E., TANABE K.,
STRITTMATTER S. M.: Small pro-
line-rich repeat protein 1A is expressed
by axotomized neurons and promotes
axonal outgrowth. *J. Neurosci.*, 2002,
22, 1303-1315.
15. COSTIGAN M., BEFORT K., KAR-
CHEWSKI L., GRIFFIN R. S., D'UR-
SO D., ALLCHORNE A., SITARSKI
J., MANNION J. W., PRATT R. E.,
WOOLF C. J.: Replicate high-density
rat genome oligonucleotide microar-
rays reveal hundreds of regulated
genes in the dorsal root ganglion after
peripheral nerve injury. *BMC Neurosci.*, 2002, 3, 16.
16. MARCHAND J. E., CEPEDA M. S.,
CARR D. B., WURM W. H., KREAM
R. M.: Alterations in neuropeptide Y,
tyrosine hydroxylase, and Y-receptor
subtype distribution following spinal
nerve injury to rats. *Pain*, 1999, 79,
187-200.
17. SANEYOSHI T., WAYMAN G.,
FORTIN D., DAVARE M., HOSHI
N., NOZAKI N., NATSUME T., SO-
DERLING T. R.: Activity-dependent
synaptogenesis: regulation by a CaM-
kinase kinase/CaM-kinase I/betaPIX
signaling complex. *Neuron*, 2008, 1,
94-107.
18. ELZIERE L., SAR C., VEN-
TEO S., BOURANE S., PUECH S., SONRIER
C., BOUKHADDAOUI H., FICHARD
A., PATTYN A., VALMIER J.,
CARROLL P., MECHALY I.: CaM-
KK-CaMK1a, a new post-traumatic
signalling pathway induced in mouse
somatosensory neurons. *PlosOne*,
2014, 9 (5), e97736.

19. VENTEO S., BOURANE S., MECHALY I., SAR C., ABDEL SAMAD O., PUECH S., BLOSTEIN R., VALMIER J., PATTYN A., CARROLL P.: Regulation of the Na,K-ATPase gamma-subunit FXYD2 by Runx1 and Ret signalling in normal and injured nonpeptidergic nociceptive sensory neurons. *PlosOne*, 2012, 7 (1), e29852.
20. LEE C. J., KONG H., MANZINI M. C., ALBUQUERQUE C., CHAO M. V., MACDERMOTT A. B.: Kainate receptors expressed by a subpopulation of developing nociceptors rapidly switch from high to low Ca²⁺ permeability. *J. Neurosci.*, 2001, 21, 4572-4581.
21. PATEL T. D., KRAMER I., KUCERA J., NIEDERKOFER V., JESSELL T. M., ARBER S., SNIDER W. D.: Peripheral NT3 signaling is required for ETS protein expression and central patterning of proprioceptive sensory afferents. *Neuron*, 2003, 38, 403-416.
22. CHEN A. I., DE NOOIJ J. C., JESSELL T. M.: Graded activity of transcription factor Runx3 specifies the laminar termination pattern of sensory axons in the developing spinal cord. *Neuron*, 2006a, 49, 395-408.