

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Sciences du vivant

Spécialité : Neurosciences

Présentée par

Hugues PETITJEAN

Rôle des interactions fonctionnelles entre couches superficielles et couches profondes de la corne dorsale de la moelle épinière de rat dans le traitement de l'information nociceptive

Soutenue publiquement le 1^{er} Juillet 2011

Membres du Jury :

M. Daniel LE BARS
Directeur de recherches INSERM

Rapporteur externe

M. Daniel VOISIN
Professeur, Université Bordeaux 2

Rapporteur externe

M. Bernard POULAIN
Directeur de recherches CNRS

Examineur

M. Rémy SCHLICHTER
Professeur, Université de Strasbourg

Directeur de thèse

Cette thèse a été effectuée à l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (CNRS UPR 3212), dans le département Nociception et Douleur, au sein de l'équipe « Signalisation nociceptive dans la moelle épinière ».

Remerciements

Je remercie sincèrement M. Bernard Poulain, M. Daniel Voisin et M. Daniel Le Bars d'avoir bien voulu accepter d'être les membres de mon jury de thèse.

Je remercie chaleureusement Rémy Schlichter de m'avoir accueilli dans son équipe. De m'avoir encouragé et transmis son enthousiasme débordant pour la science. Je vous remercie aussi pour toutes les discussions scientifiques que nous avons eues durant ma thèse.

Ce travail de thèse n'aurait pas pu aboutir de cette manière sans l'aide et la pédagogie de Jean-Luc Rodeau. Je vous remercie de tout ce que vous avez fait pour moi durant mon stage de master et pendant ma thèse. Un grand merci pour m'avoir initié à vos secrets en quantification et modélisation en biologie.

Ce travail doit aussi beaucoup à Sylvain Hugel que je remercie. Merci de ta patience et de tes conseils lors de mes nombreuses répétitions d'oraux.

Je souhaite aussi remercier Matilde Cordero-Erausquin, pour nos nombreuses discussions diverses et variées, et de son soutien.

Je remercie aussi Catherine Moreau pour m'avoir grandement facilité la vie au sein de l'IPCB.

L'ensemble des données comportementales de ce travail de thèse n'aurait jamais pu être obtenu sans l'aide et le concours de Yohann Bohren et Ipek Yalcin. Je les en remercie tous les deux.

Je remercie aussi Perrine Inquimbert pour avoir eu la patience de m'avoir transmis ses compétences en dissection et en blind patch. Merci aussi de ton soutien.

Je remercie aussi Stéphane Gaillard et Chantal Fitterer qui m'ont toujours aidé lorsque je le leur ai demandé.

Je remercie aussi mes amis et ma famille de s'être intéressé à mes travaux de thèse. Je remercie affectueusement mes parents qui m'ont permis de pouvoir faire cette thèse. Un immense merci à Johanna.

Sommaire

Résumé	5
Table des illustrations	7
Introduction	9
I. Les afférences sensorielles primaires et la corne dorsale de moelle épinière	10
1. <i>Les afférences sensorielles primaires</i>	10
a) Les propriétés des fibres A β , A δ et C	10
b) Marqueurs neurochimiques des différents types de fibres	11
c) Projections des ASP cutanées dans la CDME	11
d) Afférences primaires et modalités sensorielles	12
e) Transduction des messages nociceptifs	13
2. <i>Description des couches de la CDME</i>	14
a) Etudes morphologiques	15
b) Classification neurochimique des neurones de la CDME	17
c) Caractérisation fonctionnelle des neurones de la CDME	18
d) Relation entre excitabilité et phénotype des neurones	19
e) Réponses aux stimuli sensoriels	20
f) Les neurones à convergence	21
3. <i>Voies efférentes et neurones de projection</i>	22
4. <i>Les contrôles descendants</i>	23
II. Organisation synaptique	24
1. Entre afférences sensorielles primaires et neurones de la CDME	24
2. Relations synaptiques entre les neurones de la CDME	27
III. Le système nociceptif spinal	29
1. <i>Plasticité fonctionnelle des neurones de la CDME</i>	29
a) Mécanismes de plasticités synaptiques	29
b) Changement d'excitabilité et de patrons de décharges	30
2. <i>Changements associés aux douleurs inflammatoires et neuropathiques</i>	31
a) Douleur aiguë et inflammatoire	31
b) Douleur neuropathique	31
3. <i>Circuits spinaux de l'allodynie</i>	33
4. <i>Activation des nocicepteurs TRPV1 et système nociceptif spinal</i>	35
a) Caractérisation et fonction des canaux TRPV1	35
b) Localisation des canaux TRPV1 dans le système nociceptif spinal	36
c) Rôles physiologiques des afférences sensorielles nociceptives exprimant TRPV1	37
d) Impact de l'activation des canaux TRPV1 sur les transmissions synaptiques de la CDME	38

Objectif de la thèse	41
Matériels et Méthodes	42
I. Animaux et traitements	42
1. <i>Animaux utilisés</i>	42
2. <i>Injections</i>	42
II. Préparation des tranches	43
1. <i>Prélèvement de la moelle épinière</i>	43
2. <i>Préparation des tranches</i>	44
III. Enregistrements électrophysiologiques	45
1. <i>Chambre d'enregistrement</i>	45
2. <i>Pipettes et milieu intracellulaire</i>	45
3. <i>Acquisition et stockage des données</i>	46
4. <i>Déroulement des enregistrements</i>	46
5. <i>Courants post-synaptiques spontanés et miniatures</i>	47
IV. Méthode d'analyse	48
1. <i>Analyse des changements de fréquence</i>	48
2. <i>Estimation de l'apparition de l'effet</i>	49
3. <i>Test statistiques</i>	49
V. Séparation des CPSI GABAergiques et glycinergiques	50
VI. Culture de DRG	50
VII. Imagerie du calcium	52
1. <i>Introduction de la sonde dans les cellules</i>	52
2. <i>Le poste d'imagerie</i>	53
3. <i>Acquisition et analyse des images</i>	53
4. <i>Application des solutions</i>	54
5. <i>Analyse des réponses</i>	54
VIII. Tests comportementaux	55
1. <i>Evaluation de la sensibilité nociceptive thermique</i>	55
2. <i>Evaluation de la sensibilité nociceptive mécanique</i>	56
3. <i>Groupes d'animaux</i>	56
XI. Stratégie de stimulation pharmacologique	57
1. <i>Cas de la capsaïcine</i>	57
2. <i>Cas du probénécide</i>	57

Résultats	59
------------------	----

I. Caractérisation des transmissions synaptiques dans les couches II, III-IV et V de la corne dorsale	59
1. <i>Analyse des fréquences de base des CPSE et des CPSI spontanés et miniatures</i>	59
2. <i>Caractérisation pharmacologique et cinétique</i>	61
3. <i>Analyse des distributions cumulées des τ_D des évènements inhibiteurs isolés pharmacologiquement</i>	63
a) <i>Propriétés des distributions des τ_D glycine</i>	64
b) <i>Propriétés des distributions des τ_D GABAergiques</i>	64
c) <i>Mise en place de « zones qualitatives »</i>	64

4. Classement des distributions cumulées des τ_D des sCPSI enregistrés en l'absence de bloquants pharmacologiques	65
5. Ajustement non-linéaire des distributions cumulées des τ_D des événements inhibiteurs	65
a) Méthode	66
b) Bilan des ajustements gaussiens	67
II. Effets de la capsaïcine	69
1. Méthode d'analyse des changements de fréquence	69
2. Effet de la capsaïcine sur les transmissions synaptiques rapides	70
a) Transmission excitatrice	70
b) Transmission inhibitrice	71
3. Convergence des variations de fréquence des sCPSE et sCPSI	71
4. Effet de la capsaïcine sur les patrons d'inhibition des neurones	72
5. Conclusion	73
6. Recrutement des transmissions inhibitrices suite à l'activation des afférences TRPV1	73
a) Effet sur la transmission glycinergique	74
b) Effet sur la transmission GABAergique	74
7. Implication d'une transmission cholinergique dans l'effet de la capsaïcine	75
8. Rôle de la couche V dans le contrôle de la transmission inhibitrice dans les couches II et III-IV	76
9. Conclusion	77
III. Effet de la stimulation des canaux TRPV2	78
1. Distribution des canaux TRPV2 dans les DRG	78
2. Effet de la stimulation des récepteurs TRPV2 sur les transmissions synaptiques rapides	79
a) Transmission excitatrice	79
b) Transmission inhibitrice	80
c) Co-activation par la capsaïcine et le probénécide	80
3. Effet des applications de probénécide en présence de MLA	81
4. Effets comportementaux induits par le probénécide et la capsaïcine	82
a) Effet d'injections intrathécales	82
b) Effet d'injections intraplantaires	83

Discussion	85
1. Transmissions excitatrice et inhibitrice dans la CDME	86
1. <i>Etude des fréquences moyennes des sCPSE et des sCPSI</i>	86
2. <i>Caractérisation des transmissions inhibitrices</i>	87
a) <i>sCPSI glycine isolés pharmacologiquement</i>	88
b) <i>sCPSI GABA isolés pharmacologiquement</i>	88
c) <i>sCPSI en l'absence de bloquants pharmacologiques</i>	89
2. Stimulation sélective des afférences nociceptives	90
1. <i>Avantage des stimulations pharmacologiques</i>	90
2. <i>Fibres afférentes exprimant TRPV1 et TRPV2</i>	90
a) <i>TRPV1</i>	91
b) <i>TRPV2</i>	92
c) <i>Coexistence de TRPV1 et TRPV2</i>	93
3. Effet de la stimulation de TRPV1	94
1. <i>Effet sur la transmission inhibitrice</i>	95
2. <i>Mise en évidence d'un mécanisme de désinhibition</i>	96
3. <i>Intervention d'un maillon cholinergique</i>	96
4. <i>Conclusion</i>	97
4. Rôles physiologiques possibles de l'inhibition activée par la stimulation des afférences TRPV1	98
1. <i>Inhibition des neurones de projection nociceptifs</i>	98
2. <i>Modulation des champs récepteurs</i>	98
3. <i>Dépolarisation des afférences primaires</i>	99
4. <i>Activation de neurones nociceptifs par des neurones non nociceptifs</i>	100
5. <i>Analgésie induite par une stimulation nociceptive</i>	100
5. Effet de la stimulation de TRPV2	101
1. <i>Réseau commun activé par des afférences TRPV1 et TRPV2 et réseaux distincts</i>	101
2. <i>Implications physiologiques</i>	101
Conclusion générale	103
Perspectives	104
Bibliographie	107

Résumé

La corne dorsale de la moelle épinière (CDME) est organisée en différentes couches. Chaque couche se caractérise par la présence de neurones intrinsèques contactés par différents types d'afférences sensorielles primaires (ASP). Chaque ASP achemine un message nerveux correspondant à une modalité sensorielle de la périphérie vers les neurones centraux de la CDME. Ainsi, les informations nociceptives sont véhiculées par des fibres de types A δ et C et contactent des neurones des couches I, II et V. Les fibres myélinisées véhiculant de l'information non nociceptive contactent des neurones des couches III à V. Parmi les fibres nociceptives et non nociceptives il existe des sous-contingents qui peuvent être identifiés par l'expression de marqueurs moléculaires tels que les canaux TRPV. Ainsi, les fibres qui expriment TRPV1 véhiculent de l'information thermique nociceptive et se projettent au niveau de la couche II. Les fibres qui expriment TRPV2, ne possèdent pas TRPV1 et contactent des neurones des couches profondes. Nous avons enregistré l'activité synaptique dans des neurones localisés dans les différentes couches de la CDME par la technique de patch-clamp dans des tranches aiguës de ME de rat. Les terminaisons centrales TRPV1, contactant uniquement des neurones la couche II ont été stimulées par l'application de capsaïcine. Les terminaisons centrales portant les récepteurs TRPV2 sont stimulables par du probénécide.

Nos résultats indiquent l'existence d'un réseau polysynaptique transférant l'information nociceptive provenant des fibres exprimant TRPV1 de la couche II vers les couches profondes (III-V) sous la forme d'une stimulation des transmissions synaptiques excitatrices et inhibitrices. Ceci constitue la première démonstration de l'existence de telles interactions fonctionnelles entre couches II et III-IV. De plus, ces résultats suggèrent que l'augmentation de la transmission inhibitrice glycinergique dans la couche II et dans les couches III-IV nécessite un relais neuronal situé dans une couche plus profonde que la couche IV, probablement dans la couche V et dépend de la mise en place d'un phénomène de désinhibition.

Nos résultats démontrent que les neurones de la couche II ne reçoivent aucune information synaptique excitatrice ou inhibitrice après stimulation des afférences sensorielles exprimant les récepteurs TRPV2. En ce qui concerne les neurones des couches profondes (III à V) de la corne dorsale, ils reçoivent des informations provenant des fibres sensorielles afférentes

exprimant TRPV1 et des afférences exprimant TRPV2. Cette convergence d'information implique à la fois des interneurons excitateurs et inhibiteurs.

Les effets électrophysiologiques de la capsaïcine et du probénécide, ainsi que les résultats obtenus lors de tests nociceptifs avec ces substances, nous ont amené à formuler l'existence de réseaux de neurones différents dans la CDME impliqués dans l'hyperalgésie thermique et l'hyperalgésie mécanique. Les neurones qui sont uniquement impliqués dans le traitement de l'information provenant des fibres TRPV1 sont impliqués dans la mise en place d'hyperalgésie thermique. Les neurones qui participent au traitement de l'information nociceptive provenant des afférences TRPV1 et des afférences TRPV2 semblent impliqués dans la mise en place de l'hyperalgésie mécanique.

L'ensemble de ces résultats contribue à une meilleure compréhension de la structure des réseaux d'interneurones spinaux impliqués dans le traitement de l'information nociceptive et met en évidence l'importance des relations synaptiques entre les couches de la corne dorsale lors de ce processus. Une meilleure connaissance de la structure et du fonctionnement de ces réseaux permettra d'aborder l'étude des phénomènes de plasticité fonctionnelle s'opérant dans ces réseaux d'interneurones dans des situations de douleur inflammatoire ou neuropathique.

Liste des figures

Introduction

Tableau 1 : caractéristiques générales des afférences sensorielles primaires somato-sensorielles.	10
Figure 1 : Les différentes couches de la CDME et principales projections des ASP	11
Figure 2 : Implication des canaux TRP dans la thermoception et la nociception	13
Figure 3 : Représentation des arborisations dendritiques des différents neurones de la CDME	15
Figure 4 : Localisation des interneurons GABAergiques et glycinergiques dans la CDME	17
Figure 5 : Profils de décharge caractéristiques des neurones de la CDME	19
Tableau 2. Neurones répondant (%) aux stimulations mécaniques	21
Figure 6 : Recrutement des interneurons de la CDME par les afférences primaires	26
Figure 7 : Réseaux impliqués dans l'allodynie mécanique	33

Matériel et Méthode

Tableau 3 : composition en mM du sACSF et de l'ACSF	43
Figure 8 : Préparation et stockage des tanches aiguës de ME	44
Figure 9 : Schéma représentant le dispositif expérimental	45
Figure 10 : Stratégie expérimentale de stimulation des afférences sensorielles primaires exprimant TRPV1 ou TRPV2	57

Résultats

Tableau 4 : Fréquence de base (Hz) des courants postsynaptiques	59
Figure 11 : Fréquence de base des courants postsynaptiques	60
Figure 12 : caractérisation pharmacologique des transmissions inhibitrices	61
Tableau 5 : Constante de temps de désactivation, τ_D (ms), des courants postsynaptiques inhibiteurs spontanés (CPSIs) isolés pharmacologiquement	62
Figure 13 : Représentation des distributions cumulées des τ_D des sCPSI pharmacologiquement isolés	63
Tableau 6 : Propriétés des distributions cumulées des valeurs de τ_D	64
Figure 14 : Classement des distributions cumulées des τ_D des sCPSI	65

Tableau 7 : Classement des distributions cumulées des τ_D des sCPSI par couche	65
Figure 15 : Ajustement gaussien des distributions cumulées des τ_D	67
Figure 16 : Les trois types d'effets induits par l'application de capsaïcine	69
Figure 17 : Proportions des différentes réponses induites par l'application de capsaïcine	70
Figure 18 : Mise en évidence de la reproductibilité de l'effet de la capsaïcine sur les variations de fréquences	71
Figure 19 : Résumé des effets de la capsaïcine sur les fréquences des sCPSE et sCPSI enregistrés dans un même neurone	72
Figure 20a: Analyse des effets de la capsaïcine sur les patrons d'inhibition des neurones	73
Figure 20b : Effet de la capsaïcine sur en fonction des patrons d'inhibition des neurones	73
Figure 21 : Comparaison des effets de l'application de capsaïcine sur les transmissions inhibitrices rapides isolées pharmacologiquement ou identifiées par leurs caractéristiques cinétiques	74
Figure 22 : Effet de la capsaïcine en présence de methyllycaconitine (MLA, 100 nM), un antagoniste sélectif des récepteurs nicotiniqes $\alpha 7$	75
Figure 23 : Effet de la capsaïcine sur des tranches de moelle épinière ayant subi une section mécanique entre les couches IV et V.	76
Figure 24 : Proportion de neurones exprimant TRPV1 et TRPV2	24
Figure 25 : Proportion de neurones présentant des changements de fréquence des sCPSE ou des sCPSI suite à l'application de probénécide	78
Figure 26 : Co-activation des neurones de la CDME par l'application de probénécide et de capsaïcine	79
Figure 27 : Effet de l'injection intraplantaire ou intrathécale de capsaïcine ou de probénécide sur la sensibilité mécanique nociceptive	80
Figure 28 : Evaluation de la sensibilité nociceptive thermique au chaud suite à l'injection de capsaïcine ou de probénécide	83
Figure 29 : Réseau excitateur	94
Figure 30 : Réseau inhibiteur	95
Figure 31 : Réseau commun activé par des afférences TRPV1 et TRPV2	102
Tableau 10 : résultats préliminaires	104

Introduction

La corne dorsale de la moelle épinière (CDME) est une région clé du système nerveux central (SNC) dans laquelle les informations sensorielles sont reçues, intégrées et relayées vers les centres supraspinaux. Les neurones de la substance grise de la moelle épinière (ME) sont organisés en couches, définies selon la classification de Rexed en 1952 (Rexed, 1952). Les couches I à VI forment la CDME et s'organisent dans un axe dorso-ventral, la couche I étant la plus dorsale. La CDME reçoit des entrées synaptiques à partir d'une variété d'afférences primaires véhiculant de l'information nociceptive (chimique, thermique ou/et mécanique) ou de l'information non-nociceptive (thermique, mécanique (pression, vibration), tactile, proprioceptive). Ces informations sont détectées au niveau de la peau, des articulations, des viscères et des muscles. La plupart des axones des afférences primaires nociceptives ont un petit diamètre et sont faiblement myélinisés (fibres A δ), ou non myélinisés (fibres C). Les projections nociceptives vers la CDME se font dans les couches les plus superficielles (couche I et la partie externe ou dorsale de la couche II) et la couche V. Les neurones de la CDME des couches III-IV reçoivent de l'information non-nociceptive mécanique à bas seuil, véhiculée par des afférences primaires de type A β possédant des axones de gros diamètre et fortement myélinisés. L'innervation de la CDME par les afférences sensorielles primaires s'effectue selon une organisation somatotopique (Millan, 1999).

Les réseaux de neurones de la CDME participent au traitement des différentes modalités sensorielles. Les neurones qui répondent uniquement à des stimulations nociceptives et/ou à des stimulations thermiques non-nociceptives sont localisés majoritairement dans les couches les plus superficielles (I-II). La plupart des neurones des couches III-IV sont impliqués dans le traitement d'informations non-nociceptives. La couche V se distingue des couches plus superficielles en possédant le plus grand contingent de neurones à convergence, recevant à la fois des informations nociceptives et non-nociceptives. Ces neurones participeraient au codage de l'intensité des stimuli (Millan, 1999).

Dans une première partie de l'introduction, nous présenterons des propriétés des afférences primaires et les caractéristiques des neurones des différentes couches de la CDME. Dans une deuxième partie, nous ferons le point sur les connaissances relatives aux réseaux de neurones de la CDME. Dans la troisième partie de l'introduction, nous traiterons de

Tableau 1 : caractéristiques générales des afférences sensorielles primaires somato-sensorielles.

Modalités	Structure réceptrice	Type de fibres	Vitesse de conduction	Rôle dans la perception	Projection dans la CDME
Mécanoception	Merkel	A β	42-72 m/s	Pression, forme, texture	III-IV
	Corpuscule de Meissner	A β	42-72 m/s	Mouvement	III-IV
	Corpuscule de Ruffini	A β	42-72 m/s	Pression	III-IV
	Corpuscule de Pacini	A β	42-72 m/s	Vibration	III-IV
Thermoception	Terminaison libre	C	0,5-1,2 m/s	Température chaude	I-II
	Terminaison libre	A δ	12-36 m/s	Température froide	I-II
Nociception	Terminaison libre	A δ	12-36 m/s	« douleur aiguë »	I-II
	Terminaison libre	C	0,5-1,2 m/s	« douleur soutenue »	I-II
Proprioception	Organe tendineux de Golgi	A α	72-120 m/s	Tension musculaire	III-VII
	Fuseau neuro-musculaire	A α	72-120 m/s	Type I longueur du muscle	III-VII
	Fuseau neuro-musculaire	A β	42-72 m/s	Type II longueur du muscle	III-VII

La colonne « rôles dans la perception » indique la fonction classique attribuée à ce contingent de fibres. La colonne « projection dans la CDME » indique la zone principale de projection dans la corne dorsale de la moelle épinière.

(d'après Zigmond et al., 1999)

l'intégration et de la modulation des informations nociceptives dans les réseaux de neurones du système nociceptif spinal ainsi que des formes de plasticité qui permettent de rendre compte de phénomènes d'hyperalgésie et allodynie. Dans cette partie, nous ferons également le point sur les interactions fonctionnelles entre modalités sensorielles dans la CDME.

I. Les afférences sensorielles primaires et la corne dorsale de moelle épinière

1. Les afférences sensorielles primaires

Les afférences sensorielles primaires (ASP) permettent la détection des stimuli provenant de la périphérie. Ces stimuli sont transformés en message nerveux et acheminés vers les neurones de la CDME sous forme de potentiels d'action (PA). Les neurones sensoriels primaires sont des neurones pseudo-unipolaires en T. Leurs corps cellulaires sont situés dans les ganglions rachidiens pour les afférences du tronc et des membres, et dans les ganglions crâniens (principalement ganglion du trijumeau V) pour les afférences provenant de la tête et de la face. Ces neurones possèdent deux branches axonales, dont les terminaisons sont localisées l'une, en périphérie, et l'autre, dans le SNC. Les fibres sensorielles peuvent être classées selon différents critères comme la vitesse de conduction ou le type de modalité sensorielle détecté. Deux groupes fonctionnels de fibres peuvent être ainsi définis : les fibres nociceptives qui relaient les informations liées aux stimulations risquant d'endommager l'organisme, et les fibres non-nociceptives (tableau 1).

a) Les propriétés des fibres A β , A δ et C

On distingue classiquement trois types de fibres : le type A β / α , le type A δ et enfin, le type C, définis selon un classement qui repose sur leur vitesse de conduction des messages nerveux. Cette propriété est directement liée au diamètre et au degré de myélinisation des axones. Les afférences du type A β / α présentent la plus grande vitesse de conduction (30 à 100 mètres par seconde, diamètre de l'axone >10 μ m) et sont fortement myélinisées. Les fibres du type A δ présentent une vitesse de conduction intermédiaire (12 à 30 mètres par seconde, diamètre de l'axone 2 à 6 μ m), et les fibres C ont une vitesse de conduction faible (0,5 à 2 mètres par seconde, diamètre de l'axone 0,4 à 1,2 μ m). Les fibres A δ sont moins myélinisées que les fibres de type A β et les fibres C ne sont pas myélinisées (Millan, 1999; Zigmond, 1999). En règle générale les fibres nociceptives sont de type C et A δ , alors que les fibres non-

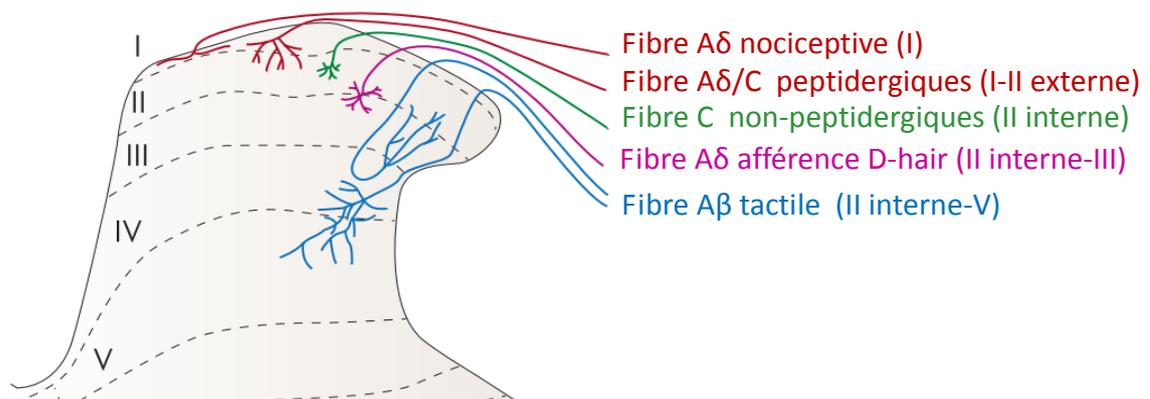
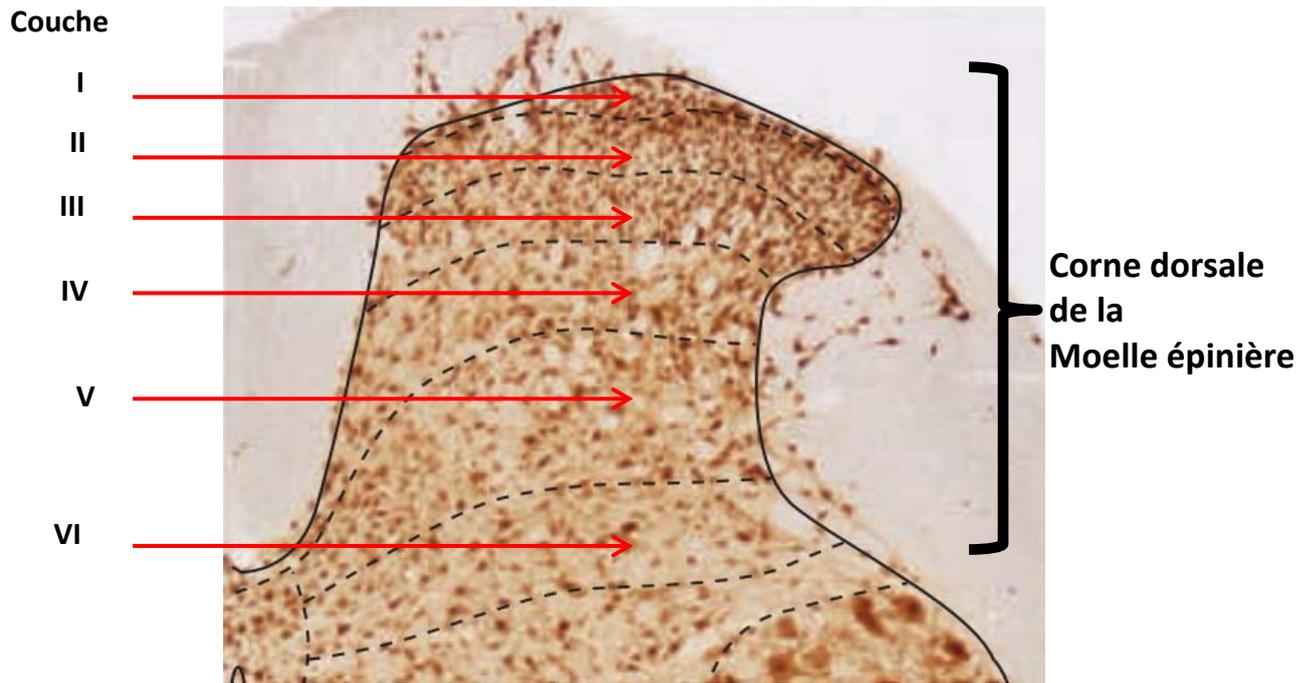


Figure 1. Les différentes couches de la CDME et principales projections des ASP

(Haut) Marquage immunohistochimique d'une coupe transversale de ME avec un anticorps anti-NEUN qui marque sélectivement les noyaux des neurones. Les lignes pointillées sur la photographie délimitent les différentes couches de la CDME selon la classification de Rexed (1952). Cette classification est basée sur la densité et la morphologie des neurones.

(Bas) Zones de projection des afférences somato-sensorielles dans les différentes couches de la CMDE. En rouge et vert les fibres impliquées dans la nociception et la thermoception. En rose et bleu les fibres véhiculant des informations non-nocicpetives. (d'après Todd, 2010).

nociceptives sont de types A β et A δ . Les fibres C représenteraient 70% du total des fibres sensorielles cutanées chez le rat, et les fibres A β et A δ 10% et 20% respectivement. Ces proportions peuvent varier selon les espèces (Lynn, 1984). Il existe cependant des exceptions : 20% des fibres A β sont des nocicepteurs (Djouhri et Lawson, 2004); de même, de l'information non-nociceptive (thermique ou mécanique) peut être véhiculée par une sous-population de fibres C (Alvarez et Fyffe, 2000).

b) Marqueurs neurochimiques des différents types de fibres

Les fibres de type A myélinisées expriment une forme de neurofilaments phosphorylés d'un poids moléculaire de 200 *KD* (NF200), alors que les fibres C ne l'expriment pas (Chen et al., 2010)

Dans le cas des fibres de type C, on distingue :

- des fibres C exprimant le récepteur Trk-A du facteur de croissance NGF (*nerve growth factor*) et contenant des neuropeptides tels que de substance P, la galanine et du CGRP (*calcitonin-gene related peptide*).

- des fibres C non-peptidergiques qui expriment le récepteur (RET) du GDNF (*Glial cell-derived neurotrophic factor*), les sous-unités P2X3 des récepteurs canaux de l'ATP (P2X) et un site de liaison pour la lectine IB4 (Averill et al., 1995).

c) Projection des ASP cutanées dans la CDME

Chez le rat, les terminaisons centrales des afférences primaires contactent les neurones de la CDME selon une organisation précise. Des collatérales des fibres A β terminent dans les couches III à V, avec dans certains cas des extensions dans la couche II interne (Woodbury et Koerber, 2003). Les afférences provenant des follicules pileux de type A δ (D-Hair) s'arborescent à la frontière des couches II et III. Les fibres nociceptives de type A δ contactent des neurones des couches I, V et X (Light et Perl, 1979). A ce titre, il faut noter que chez la souris les mécano-nocicepteurs myélinisés de type A β et A δ s'arborescent dans toutes les couches de CDME (Woodbury et al., 2008). Les fibres nociceptives de type C et A δ contenant des neuropeptides (CGRP, substance P) se projettent dans les couches I et II externe, alors que la plupart des fibres nociceptives non peptidergiques liant l'IB4 se terminent dans la partie la plus dorsale de la couche II interne (Todd, 2010)(figure 1).

d) Afférences primaires et modalités sensorielles

-Les fibres non nociceptives :

-*Type A β* :

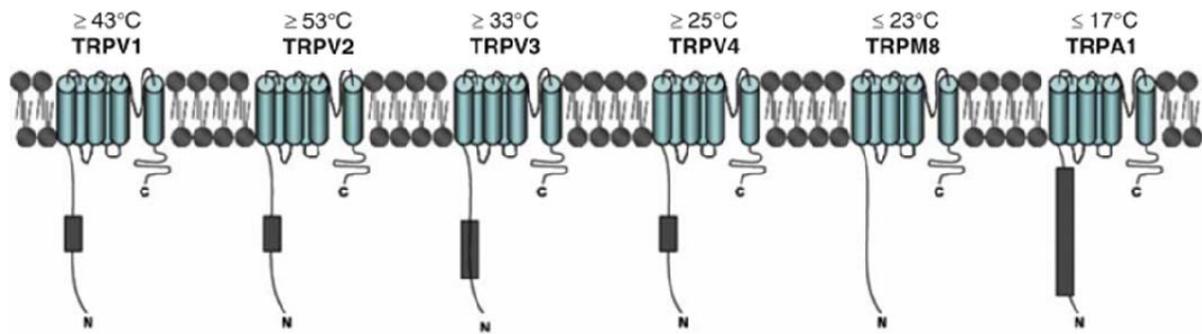
Les neurones impliqués dans la détection des stimuli mécaniques non nociceptifs sont des mécanorécepteurs à bas seuil. La surface cutanée du corps possède par quatre types de structures différentes impliquées dans la mécanocception. Chaque type de mécanorécepteur possède des caractéristiques histologiques et physiologiques différentes (Vega et al., 2009). Les disques de Merkel et les corpuscules de Ruffini sont impliqués dans la détection de la pression. Les corpuscules de Meissner et les corpuscules de Pacini permettent la détection des vibrations. Les fibres associées à ces mécanorécepteurs sont de type A β et gagnent la ME par les racines dorsales, puis empruntent les cordons dorsaux pour faire synapse dans les noyaux des cordons dorsaux, noyaux cunéen et gracile, dans le bulbe rachidien. Au niveau de la ME, elles abandonnent des collatérales qui s'arborisent dans les couches Iii à V de la CDME, notamment dans la couche III-IV. Il existe une somatotopie des projections de ces fibres dans la CDME (Brown, 1982).

-*Type A δ et C*

L'innervation des follicules pileux est réalisée par des fibres A δ dénommée « D-Hair afferent ». Les températures non nociceptives sont détectées par des terminaisons libres de fibres A δ et C (McGlone et Spence, 2010). Des fibres de type C sont également impliquées dans la sensation de prurit (McGlone et Reilly, 2010).

-Les fibres nociceptives

Les nocicepteurs véhiculent des informations concernant des stimuli nociceptifs aigus comme des piqûres et des brûlures, mais aussi des informations mécaniques nociceptives (coupures, pincement) (Julius et Basbaum, 2001). Les fibres C et A δ sont impliquées dans la transmission des informations nociceptives, et possèdent des terminaisons libres en périphérie. Il a été décrit deux classes de nocicepteurs de type A δ qui répondent aux stimuli mécaniques nociceptifs. La première classe répond aussi à des températures élevées et la seconde classe est sensibilisée par une lésion tissulaire (Burgess et Perl, 1967). Les nocicepteurs de type C sont principalement polymodaux.



Canal	Fonction des canaux TRPV et implications physiologiques	Activation	
		Stimulus physiologiques	Agoniste chimique
TRPV1	Détection de chaleurs nociceptives, dans l'hyperalgésie thermique	Chaleur > 43°C	Capsaïcine, Résiniferatoxine, Protons, Camphre, Anandamide
TRPV2	Mécanoception Détection de chaleurs nociceptives dans des systèmes hétérologues (controversé)	Stimulation mécanique Chaleur > 52°C	Probénécide, Carvacrol
TRPV3	Détection de températures non-nociceptives	Chaleur > 33°C	Camphre, Carvacrol, Vanilline
TRPV4	Détection de températures non-nociceptives	Chaleur > 25°C	Bisandrographolide
TRPM8	Détection températures froides	Froid < 23°C	Menthol
TRPA1	Détection de températures froides nociceptives (controversé)	Froid < 15°C	Huile de moutarde, Cinnaméldehyde

Figure 2. Implication des canaux TRP dans la thermoception et la nociception.

Modifié (d'après Eid et al., 2009 ; Lawson et al., 2008 ; Tominaga et Caterina, 2004)

La moitié des fibres C répond à la fois à des stimulations nociceptives chimiques, mécaniques et thermiques (Perl, 1984). D'autres nocicepteurs ont été caractérisés comme répondant uniquement à des températures nociceptives. Il existe une dernière catégorie de nocicepteur de type C dits «silencieux». La propriété de ces nocicepteurs est de devenir uniquement actifs suite à un processus de sensibilisation induit par une lésion tissulaire ou une inflammation.

e) Transduction des messages nociceptifs

Les terminaisons nociceptives sont des terminaisons libres, et expriment de nombreux récepteurs qui permettent de détecter une grande variété de stimuli (Tominaga, 2007). L'excitation des nocicepteurs par des températures nocives et des stimuli chimiques dépend de la présence, à leur surface membranaire, d'un ou de plusieurs éléments de la famille des protéines de transduction appelés «*transient receptor potentiel*» ou canaux «TRP». Quatre types de canaux de la famille TRPV (*transient receptor potentiel vanilloïde*) (TRPV1-V4) sont connus pour être impliqués dans la détection de variations de température nociceptive ou non. Les canaux TRPV3 et TRPV4 semblent impliqués dans la détection de températures chaudes non nociceptives au seuil respectif de 32°C et 24°C (Guler et al., 2002). Les canaux TRPV1 et TRPV2 sont impliqués dans la détection de chaleurs nociceptives, dans une gamme de 42°C (ou 43°C selon les auteurs) à 52°C pour TRPV1 (Caterina et al., 1997), et des températures supérieure à 52°C pour TRPV2 (Caterina et al., 1999). Les fibres nociceptives de petite section expriment TRPV1, alors que le récepteur TRPV2 est présent sur des fibres myélinisées (Lewinter et al., 2004) (Figure 2).

Chez la rat, les canaux TRPV1 sont exprimés par des fibres non peptidergiques (IB4) qui projettent dans la couche II, et plus particulièrement au niveau du tiers supérieur de la couche IIinterne (Guo et al., 1999). Il existe des différences inter espèces notables, comme chez la souris où les fibres sensorielles qui expriment le récepteur TRPV1 sont peptidergiques et n'expriment pas le site de liaison pour l'IB4 (Zwick et al., 2002).

Les fibres sensorielles exprimant le récepteur TRPV2 chez le rat sont myélinisées, de type A β et A δ , et n'expriment pas TRPV1 (Lewinter et al., 2004). Les terminaisons centrales des ASP exprimant TRPV2 se localisent dans les couches I et IIinterne (nocicepteurs myélinisés A δ) et dans les couches III-IV (fibres A β). Le rôle de TRPV2, en qualité de thermocepteur est controversé chez la souris car les fibres exprimant TRPV2 seraient des

mécano-nocicepteurs ($A\delta$) ou des mécanorécepteurs non-nociceptifs de type $A\beta$ (Lawson et al., 2008). D'autres canaux TRP tels que TRPM8 sont activés par le froid et le menthol et sont exprimés par un contingent de nocicepteurs détectant les températures de 25°C à 30°C. Un autre canal, TRPA1 détecte aussi des températures froides, et est présent sur des nocicepteurs exprimant aussi des canaux TRPV1. Ces nocicepteurs pourraient expliquer les sensations de chaleurs intense lors de détections de températures froides (Tominaga et Caterina, 2004).

Résumé

De manière classique, la majorité des fibres nociceptives sont de type C et projettent vers les couches I et IIo mais sont aussi de type $A\delta$ et projettent vers les couches I, IIo et V de la CDME. Les informations non-nociceptives sont relayées vers les couches III-V par des fibres $A\beta$.

2. Description des couches de la CDME

La substance grise de la ME peut être subdivisée en dix couches selon la classification établie par Rexed en 1952. Cette classification se base sur les propriétés cyto-architecturales des neurones dans un plan transversal de la ME. Les six premières couches sont arrangées l'une en dessous de l'autre, de la partie la plus dorsale vers la partie ventrale, et forment la corne dorsale de la ME, (CDME). Les couches VII-IX forment la corne ventrale de la ME. La couche X entoure le canal de l'épendyme. La classification établie par Rexed en 1952 repose sur la densité des corps cellulaires, sur la morphologie et la taille des arborisations dendritiques des neurones (Figure 1).

La couche I de la CDME, nommée aussi la couche marginale de la CDME ou zone marginale de Waldeyer, contient des neurones de projections et des interneurones locaux. Les neurones de projections se caractérisent par un corps cellulaire dont le diamètre est supérieur à 200 μ m, alors que les interneurones ont un petit corps cellulaire inférieure à 200 μ m de diamètre (Al Ghamdi et al., 2009).

La couche II (ou substance gélatineuse de Rolando) présente une densité neuronale plus importante que dans la couche I et regroupe essentiellement des neurones à petits corps cellulaire. Cette couche peut être subdivisée en deux parties, la zone la plus dorsale ou externe (couche IIo pour lamina II outer ou IIext) et une zone plus ventrale ou interne, (couche Ii pour lamina II inner ou IIint).

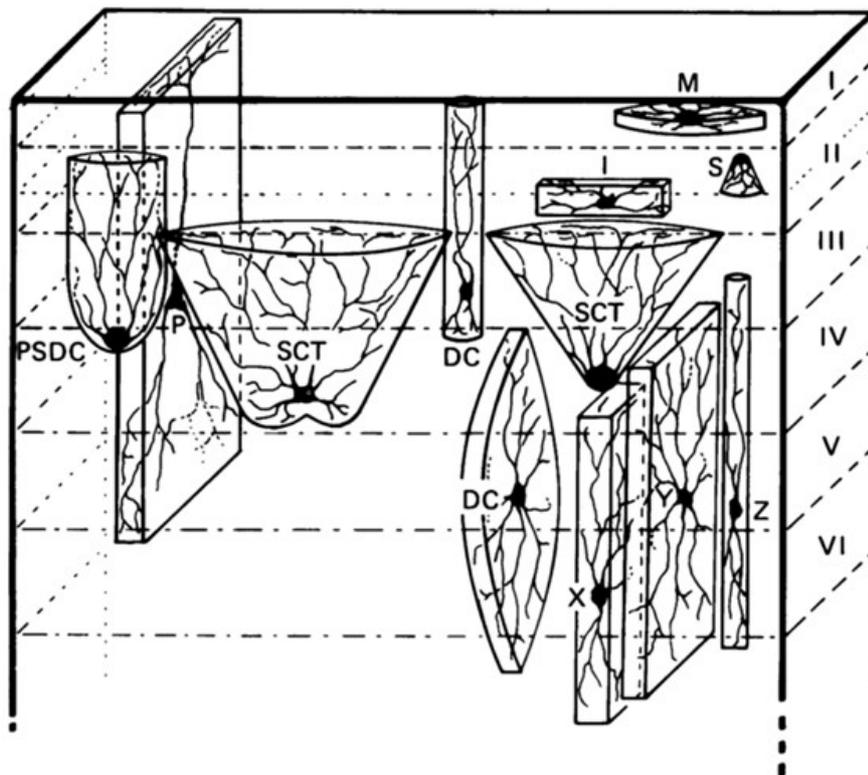


Figure 3. Représentation des arborisations dendritiques des différents neurones de la CDME

M : cellule marginale de la couche I ; I : cellule en îlot (Islet cell) ; S : cellule en tige (Stalked cell) ; P : neurones pyramidaux de la couche III ; PSDC et DC : trois types de neurones de la voie postsynaptique des cordons dorsaux ; SCT : neurones du tractus spino-cervical ; X, Y et Z : interneurones des couches V-VI (d'après Brown, 1982).

Les couches III-IV (noyau propre de la CDME) se distinguent de la couche II par la présence de nombreuses fibres myélinisées.

La couche V est également appelée « le cou ou *neck* » de la CDME. C'est la plus épaisse des couches. La partie latérale a une apparence réticulée. Des niveaux T1 à L3, la partie médiane de LV contient le noyau de Clarke qui est une structure relais importante pour les informations proprioceptives vers le cervelet.

La couche VI sépare les couches V et VII et ne se trouve que dans les segments cervicaux et lombaires de la ME.

A la hauteur de la couche V des CDME, on trouve également le noyau latéral spinal (NSL). Il s'agit d'un groupe dont les corps cellulaires sont localisés dans la substance blanche ventrolatérale. Ces neurones sont contactés par des afférences primaires non nociceptives et nociceptives. Certains sont des neurones de projections vers des structures supra-spinales (thalamus, amygdale) ou les neurones de la CDME (couches I-II et V) (Watson et al., 2008) .

a) Etudes morphologiques

Les techniques immuno-histochimiques et l'injection de traceurs axonaux, permettent d'étudier les arborisations dendritiques des neurones et l'organisation de leurs projections axonales (figure 3). Les neurones de la CDME ainsi étudiés, ont montré qu'il existait des différences cyto-architecturales entre les couches. Les axones des interneurones des différentes couches de la CDME, projettent soit dans la même couche que celle où se trouvent les corps cellulaires, ou peuvent contacter des neurones appartenant à d'autres couches (Brown, 1982). Il existe aussi des interneurones dits propriospinaux dont l'axone contacte des neurones d'un segment spinal différent (Brown, 1982). De plus, des interneurones commissuraux permettent le transfert d'information entre les deux cornes dorsales de la moelle épinière (Petkó et al., 2004). Les axones des neurones de projection vers les centres supra-spinaux se regroupent en différents faisceaux ascendants qui cheminent dans la substance blanche de la moelle épinière (Millan, 1999).

Dans la couche I, quatre types d'organisation somato-dendritique ont été mis en évidence chez le rat : fusiforme, aplati, multipolaire et pyramidal (Lima et Coimbra, 1983). Les neurones de la couche I ont principalement des arborisations dendritiques qui s'étendent dans un axe rostro-caudal et/ou un axe médio-latéral, et qui restent majoritairement confinées

à la couche I. Cependant, certains neurones ont des dendrites qui s'étendent dans les couches II et III. Dans la couche I, il semble exister une assez bonne corrélation entre la morphologie et le type de stimulation sensorielle qui active le neurone. Ainsi, les neurones fusiformes sont activés préférentiellement par des stimulations nociceptives. Les neurones multipolaires reçoivent des informations nociceptives et non nociceptives alors que les neurones pyramidaux sont stimulés uniquement par des informations thermoceptives froides (Watson et al., 2008).

Dans la couche II, les organisations dendritiques sont différentes de celles de la couche I. Quatre principaux types d'arborisation ont été décrits et référencés dans différentes études : les cellules en îlot (Islet cell), les cellules centrales, les cellules radiales et les cellules verticales (Grudt et Perl, 2002; Yasaka et al., 2007). Les dendrites de ces différents types neuronaux demeurent principalement dans la couche II. Les cellules en îlots ou centrales ont des arborisations dendritiques principalement orientées dans un plan rostro-caudal dont la longueur moyenne est de 600 μm et de 200 μm respectivement. Les neurones de type radial et vertical se caractérisent par une extension de leurs arborisations dendritiques plus importante dans un axe dorso-ventral, respectivement de 90 μm et de 130 μm , alors que l'extension dorso-ventrale des cellules en îlot et centrale est inférieure à 70 μm (Yasaka et al., 2007). Les axones des interneurons de la couche II projettent vers les couches I-V (Light et Kavookjian, 1988; Eckert et al., 2003; Braz et al., 2005).

Les neurones de la couche III possèdent des arborisations dendritiques hétérogènes. On peut distinguer deux classes. La première est celle des neurones dont l'arborisation dendritique reste confinée dans la couche III et se développe selon un axe rostro-caudal. La seconde classe concerne des neurones qui ont une arborisation dendritique qui s'étend dans les autres couches superficielles (I-III) dans un axe ventro-dorsal (Maxwell et al., 1983; Polgar et al., 2004). Dans la couche IV certains neurones se caractérisent par des arborisations dendritiques dites « en antenne » et dont les prolongements peuvent remonter dans les couches I, II et III, (Szentagothai, 1964). Certains neurones des couches III et IV ont également des dendrites dans la couche V (Brown, 1982). Les neurones des noyaux spinaux latéraux ont des arborisations dendritiques multipolaires, qui peuvent s'étendre dans les couches III à VI (Luz et al., 2010) Dans les couches V et VI, les arborisations dendritiques s'organisent dans un axe dorso-ventral et peuvent s'étendre jusque dans les couches II et III (Watson et al., 2008).

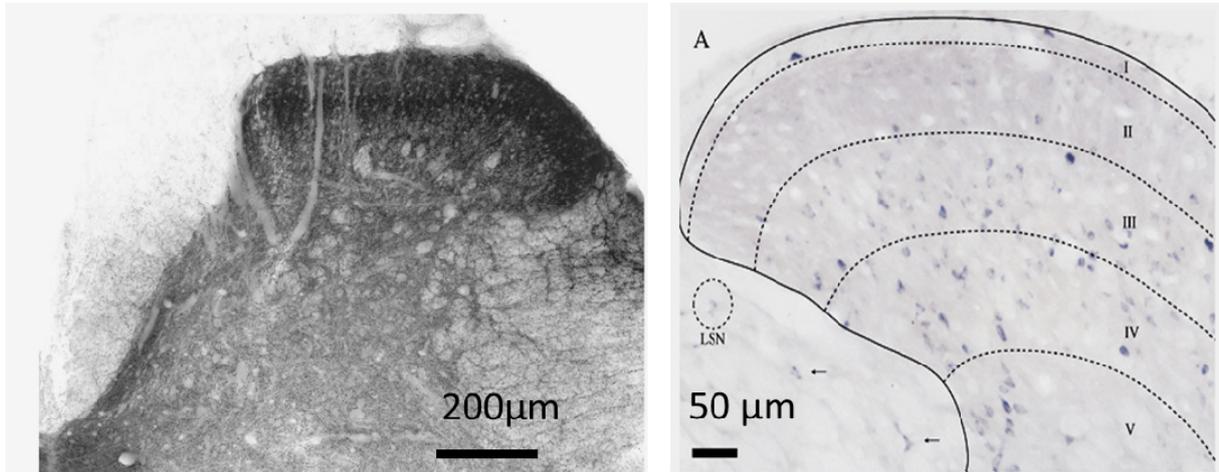


Figure 4. Localisation des interneurones GABAergiques et glycinergiques dans la CDME

Les interneurones inhibiteurs de la CDME de rat sont révélés par hybridation *in situ* :

- des ARN messagers de la GAD67 (d'après Mackie et al., 2003) (gauche).
- des ARN messagers de GlyT2 (d'après Hossaini et al., 2007) (droite).

b) Classification neurochimique des neurones de la CDME

- Les interneurones inhibiteurs

Les interneurones inhibiteurs de la CDME utilisent le GABA (acide- γ -aminobutyrique) et/ou de la glycine comme neurotransmetteurs (figure 4). Des immunomarquages dirigés contre le GABA et la glycine révèlent que 30% des neurones de la couche I et II, et 46% des neurones de la couche III, contiennent du GABA (Todd et Sullivan, 1990). La plupart des neurones GABAergiques colocalisent de la glycine, soit 33%, 43% et 64% pour les couches I, II et III respectivement. Dans les couches III-V de la CDME les interneurones peuvent être GABAergiques et/ou glycinergiques, (Mackie et al., 2003).

Des études utilisant des souris transgéniques, exprimant une protéine fluorescente verte (Enhanced green fluorescent protein, EGFP) sous le promoteur de l'enzyme de synthèse du GABA, la glutamate décarboxylase 67 (GAD67), permettent de visualiser directement les neurones GABAergiques par la présence d'une fluorescence verte en microscopie à fluorescence, notamment dans les tissus vivants. Les neurones GABAergiques sont localisés dans les couches I, II et III et très peu dans les couches profondes (Tamamaki et al., 2003). Ce résultat a été confirmé chez le rat, par une révélation des ARN-messagers de la GAD67 et de la GAD65 (Mackie et al., 2003).

Le même type d'approche a été utilisé pour caractériser les neurones glycinergiques grâce à une souris transgénique exprimant l'EGFP sous le promoteur du transporteur neuronal de recapture de la glycine (GlyT2). Les études des souris transgéniques GlyT2-EGFP montrent que les corps cellulaires des neurones glycinergiques sont principalement localisés dans les couches profondes (III-V) de la CDME. On trouve quelques corps cellulaires glycinergiques dans la couche I, mais aucun ou quelques très rares neurones de la couches II semblent exprimer Glyt2, (Zeilhofer et al., 2005). Chez le rat, la révélation des ARNm de GlyT2 montre que les couches IV-VI contiennent plus de neurones glycinergiques que la couche III, qui, elle-même, en contient plus que les couches I et II (Hossaini et al., 2007)

-Les interneurons excitateurs

Les neurones excitateurs de la CDME utilisent le glutamate comme neurotransmetteur. Il n'est pas possible de marquer directement les corps cellulaires des neurones glutamatergiques par des techniques d'immunohistochimie, mais il est souvent considéré que les neurones qui ne contiennent pas de GABA et /ou de glycine sont glutamatergiques. Par contre, les axones des neurones glutamatergiques peuvent être identifiés par la présence de transporteurs de recapture du glutamate (VGLUT). Il existe trois formes de VGLUT : VGLUT1-3. Les corps cellulaires des neurones qui expriment soit la forme VGLUT1 ou soit la forme VGLUT2 sont localisés dans les couches I-II et les couches III-IV. Des neurones de la couche V expriment l'une des trois formes. Les marquages immunohistochimiques contre les différentes formes des protéines VGLUT permettent de distinguer les axones des interneurons excitateurs des axones des ASP. Les ASP de type A projetant dans les couches III-IV exprime VGLUT1, un marquage VGLUT1 est absent dans la couche II. Ainsi les interneurons excitateurs de la couche II exprimant VGLUT1 pourraient avoir leurs axones qui projettent dans les couches III-IV (Landry et al., 2004).

c) Caractérisation fonctionnelle des neurones de la CDME

Pour tenter de comprendre l'organisation et le fonctionnement des réseaux de neurones de la CDME, des études ont cherché à corréler différents critères tels que le profil de décharge de potentiels d'action, la nature neurochimique ou encore la morphologie dendritique afin d'identifier des groupes de neurones. Les différentes techniques d'enregistrements électrophysiologiques (patch-clamp, enregistrement intracellulaire) permettent de caractériser les patrons de décharge des neurones intrinsèques de la CDME, ainsi que les connexions synaptiques qu'ils établissent et reçoivent.

Les profils de décharge (patron) de potentiels d'action enregistrés dans les neurones de CDME suite à l'application de créneaux rectangulaires de courant positif, se distinguent par le mode et les fréquences de décharge de potentiels d'actions, ainsi que le potentiel seuil de déclenchement de ces potentiels d'actions.

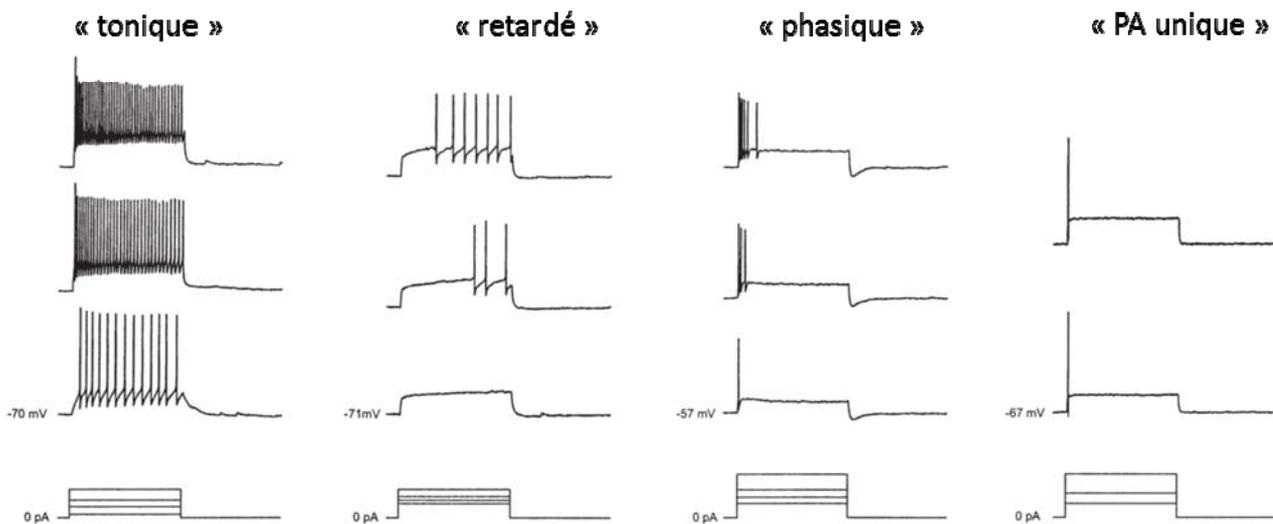


Figure 5. Profils de décharge caractéristiques des neurones de la CDME

Dans le profil « tonique », la décharge de potentiels d'action s'effectue de manière régulière pendant toute la durée de la stimulation. Elle se caractérise par une faible atténuation de la fréquence et de l'amplitude des potentiels d'action (PA) durant la dépolarisation.

Le profil « retardé », la décharge de potentiel d'action ne survient pas au début de la stimulation mais après un délai de quelques millisecondes.

Le profil « phasique », se caractérise par la décharge d'une bouffée de PA au début de la dépolarisation.

Le profil « potentiel d'action unique », correspond à la génération d'un potentiel d'action unique quelle que soit l'intensité du stimulus dépolarisant appliqué.

(d'après Ruscheweyh et Sandkuhler, 2002)

Différents profils de décharge de potentiels d'action (PA) ont été décrits (figure 5) (Ruscheweyh et Sandkuhler, 2002) :

- le profil « tonique ». La décharge de potentiels d'action s'effectue de manière régulière pendant toute la durée de la stimulation. Elle se caractérise par une faible atténuation de la fréquence et de l'amplitude des potentiels d'action durant la dépolarisation.
- le profil « phasique », se caractérise par la décharge d'une bouffée de PA au début de la dépolarisation.
- le profil « potentiel d'action unique », correspond à la génération d'un potentiel d'action unique quelle que soit l'intensité de stimulus dépolarisant appliqué.
- le profil « retardé ». La décharge de potentiel d'action ne survient pas au début de la stimulation mais après un délai de quelques millisecondes.

Des neurones présentant ces profils sont trouvés dans l'ensemble des couches I-V de la CDME (Light et Lee, 2009) .

d) Relation entre excitabilité et phénotype des neurones

Dans certaines études, les auteurs ont essayé de savoir si un profil de décharge donné était associé à un type de neurone particulier. Dans la couche I, quatre profils de décharge ont été décrits : tonique, phasique, retardé et potentiel d'action unique. D'une manière générale, les neurones fusiformes de la couche I ont un profil de décharge tonique, les neurones pyramidaux un profil phasique, et les neurones multipolaires ont des profils de type retardé ou de type d'action unique (Prescott et al., 2006). Il semble donc exister une certaine corrélation entre le profil de décharge des potentiels d'actions et le type de morphologie de neurone dans la couche I.

Dans la couche II, les mêmes types de profil de décharge ont été observés, mais il n'a pas été possible d'établir une corrélation précise entre les caractéristiques morphologiques du neurone et le type de profil de décharge de potentiels d'action, sa nature neurochimique et/ou sa fonction (Yasaka et al., 2010). Cependant, toutes les cellules en îlot présentent un profil de décharge tonique. De plus les cellules en îlot et les cellules centrales à décharge tonique sont des interneurones inhibiteurs GABAergiques (Lu et Perl, 2003).

Dans les couches profondes III-IV, chez le rat, 47% des neurones ont un profil de décharge tonique, 38% des neurones un profil phasique et 15% des neurones un profil retardé. De plus 70% des neurones de projection ont un profil de type tonique, les interneurones locaux présentent un profil phasique, et les interneurones inter-segmentaires ont un profil retardé (Schneider, 2003). Dans la couche V, 90% des neurones ont un profil de décharge tonique (Derjean et al., 2003).

Au plan physiologique, il semble que les neurones à convergence (WDR) de la couche V possèdent un profil de décharge tonique alors que dans les autres couches de la CDME la plupart des neurones répondant uniquement à des stimulations nociceptives ont plutôt un profil phasique (Lopez-Garcia et King, 1994). Par contre, chez la souris, il ne semble pas qu'il y ait de corrélation entre les profils de décharge et le type d'entrées sensorielles auquel répond le neurone (Graham et al., 2004).

e) Réponses aux stimuli sensoriels

Les rôles des neurones de la CDME dans l'intégration des informations sensorielles, ont été déterminés par l'enregistrement des décharges de potentiels d'actions en réponse à des stimulations nociceptives ou non-nociceptives dans leur champ récepteur périphérique. De telles études nécessitent des enregistrements électrophysiologiques intra- ou extra- cellulaires *in vivo* de neurones des différentes couches de la CDME ou dans des préparations de ME avec un membre postérieur attaché (Lopez-Garcia et King, 1994). Par rapport aux informations nociceptives, certains neurones ne sont pas activés par ce type de stimulation et sont classés comme non-nociceptifs (NN). D'autres neurones, les neurones dits nociceptifs spécifiques (NS), répondent uniquement aux stimulations nociceptives. Les neurones qui sont activés à la fois par des stimulations nociceptives et non nociceptives sont dits neurones à convergence (WDR, wide dynamic range) (Le Bars et Catten, 2009) .

Les neurones répondant aux stimulations mécaniques nociceptives ou non-nociceptives :

L'existence de neurones répondant uniquement à des stimulations mécaniques nociceptives, uniquement à des stimulations mécaniques non-nociceptives ou au deux types de stimulations a été décrite (Light et Durkovic, 1984).

Tableau 2. Neurones répondant aux stimulations mécaniques

Couche	NN mécanique	convergence	NS mécanique
I	0 %	86 %	14 %
II	25 %	50 %	25 %
III	73 %	27 %	0 %
IV	57 %	37 %	7 %
V	34 %	53 %	13 %
VI	26 %	46 %	28 %
VII	23 %	55 %	23 %

Les neurones sont classés en fonction de leurs réponses aux stimulations mécaniques non nociceptives (NN mécanique) et aux stimulations non nociceptives mécanique (NS mécanique). Dans le cas où le neurone répond aux deux types de stimulation il est classé comme neurone à convergence (convergence), (d'après Light et Durkovic, 1984).

Les neurones répondant uniquement à des stimulations mécaniques non-nociceptives sont majoritairement trouvés dans les couches III et IV, alors que les neurones répondant à des stimulations mécaniques nociceptives sont principalement localisés dans les couches I et II. Les couches V et VI se caractérisent par la présence des trois types de neurones (NN, NS et WDR) (tableau 2).

Les neurones répondant aux stimulations thermiques nociceptives ou non-nociceptives :

Les neurones répondant à des stimulations thermiques nociceptives ou non-nociceptives sont localisés dans les couches I et II. La majorité des neurones sont des NS thermiques ou polymodaux. Dans la couche II, la majorité des neurones répond à des stimulations mécaniques non nociceptives (Bullitt et al., 1992). Les interneurons exprimant la PKC γ qui se localisent à la frontière de la couche II et de la couche III sont activés par des afférences sensorielles myélinisées non nociceptives (Neumann et al., 2008).

f) Les neurones à convergence

Les neurones à convergence (WDR) se définissent par le fait qu'ils sont activés à la fois par des stimulations nociceptives et non nociceptives. Les champs récepteurs de ces neurones sont plus grands que ceux des neurones NS et le champ récepteur des neurones WDR se caractérise par un gradient de sensibilité de la partie centrale vers la partie périphérique (Guirimand et Le Bars, 1996). Dans la partie centrale la stimulation des fibres de type C, A δ et A β induit une activation neuronale, dans la partie la plus périphérique, seul les stimulations des fibres C et A δ induisent une activité neuronale. De tels neurones sont trouvés dans toutes les couches de la CDME (Light et Durkovic, 1984). Les neurones WDR de la couche V sont impliqués dans des circuits de réflexes. Des neurones de projection spino-thalamique ou spino-réticulaire de la couche V sont aussi des neurones WDR (LeBars et Catten, 2009). Ces neurones augmentent leur décharge de potentiels d'action en fonction de l'intensité des stimulations (Le Bars et Chitour, 1983). Ces neurones sont donc capables de coder l'intensité des stimuli.

3. Voies efférentes et neurones de projection

Les neurones de projection de la CDME ont des axones qui quittent la substance grise pour se regrouper dans la substance blanche sous forme de faisceaux ascendants. Ces faisceaux transmettent les informations nociceptives à diverses structures de l'encéphale. Les principaux neurones de projection nociceptifs sont localisés dans les couches I, III-VI et V. Il existe de nombreux faisceaux ascendants dont un grand nombre véhiculent de l'information nociceptive (Millan, 1999). Cette introduction se limite à présenter brièvement les grands circuits de projection issus des couches I et V.

Les axones de neurones de la couche I et ceux de la couche V, qui décussent pour la plupart au niveau de leur segment spinal, cheminent en position dorsale dans le quadrant ventrolatéral de la substance blanche de la ME. Ce quadrant regroupe des fibres véhiculant de l'information nociceptive et de l'information thermique non-nociceptive. Les axones provenant de la couche I de la CDME de ce faisceau rejoignent, au niveau du tronc cérébral (bulbe rachidien), les axones de la couche I du noyau caudal du complexe trigéminal pour former le faisceau extralemniscal. Le faisceau extralemniscal part en direction de la partie ventro-basale du thalamus latéral, en abandonnant des collatérales dans l'aire parabrachiale, la substance grise périaqueducule et les régions de la rétículo mésentencéphalique. Les informations nociceptives parvenant à l'aire parabrachiale sont transférées vers l'hypothalamus et l'amygdale. Les noyaux de la partie ventro-basale du thalamus latéral projettent vers les aires corticales somatosensorielles : primaires, secondaires et insulaires, ainsi que vers l'amygdale. (pour revue, (Bernard et Villanueva, 2010).

Les axones des neurones de projections provenant de la couche V rejoignent les axones des neurones de projection des noyaux caudal et oral du trijumeau au niveau du bulbe rachidien. Ces axones projettent principalement vers les noyaux réticulaires latéraux, gigantocellulaires et dorsaux du bulbe, vers le sous-noyau parabrachial latéral interne et sur les noyaux du thalamus médian. Les neurones du thalamus médian contactent des neurones des aires corticales cingulaires et préfrontales. (Bernard et Villanueva, 2010).

4. *Les contrôles descendants*

Les centres supra-spinaux peuvent moduler l'activité des réseaux de neurones de la ME. Dans la CDME, les contrôles descendants provenant de la formation réticulée bulbaire et du locus coeruleus vont avoir une action facilitatrice ou inhibitrice sur l'information nociceptive, (Millan, 2002). Les fibres provenant des structures supra-spinales empruntent les faisceaux dorso-latéraux (FDL) et ventro-latéraux (funiculus postérolatéral) pour contacter les neurones de la CDME.

Les stimulus nociceptifs induisent l'activation de neurones de la substance grise périaqueducale (PAG), qui activent à leur tour des neurones de la partie rostroventromédiane (RVM) du bulbe rachidien du tronc cérébral, responsable de contrôles inhibiteurs descendants (Villanueva et Bourgeois, 2010). Les axones des neurones de projections sérotoninergiques, GABAergiques et glycinergiques de la RVM projettent le long des faisceaux dorso-latéraux pour contacter les neurones de la CDME, et inhiber la transmission nociceptive (Zhang et al., 1991; Kato et al., 2006).

Il existe des contrôles descendants facilitateurs de la transmission nociceptive au niveau de la CDME (Millan, 2002). Des neurones de la RVM participent à ce type de contrôles. Plusieurs études ont montré qu'il existait trois types de neurones dans la RVM en fonction de leur activité de décharge de potentiel d'action lors du réflexe de retrait nociceptif. Les neurones de type « ON » qui s'activent avant le réflexe sont impliqués dans les contrôles descendants facilitant la transmission nociceptive. Les neurones de type « OFF » qui inhibent les neurones de la CDME s'inactivent avant le réflexe de retrait nociceptif. Le dernier type de neurones, le type « neutre », ne présente pas de changement d'activité lié à l'activité du réflexe (Villanueva et Bourgeois, 2010).

Conclusion

La CDME est le premier lieu d'intégration et de modulation des informations somatosensorielles provenant de la périphérie. Ces fonctions sont assurées une organisation structurale et fonctionnelle de l'acheminement de ces informations aux neurones de la CDME. Au sein de la CDME, les neurones qui participent au traitement de l'information se caractérisent par différentes propriétés neurochimiques et fonctionnelle.

L'ensemble de ces neurones établissent des connexions les uns avec les autres afin de constituer les réseaux de neurones de la CDME. Dans la partie suivante nous développerons l'organisation synaptique des neurones de la CDME.

II. Organisation synaptique

Le transfert de l'information sensorielle provenant des APS vers les centres supra-spinaux implique des réseaux d'interneurones excitateurs et inhibiteurs et des neurones de projection. Ces réseaux de neurones de la CDME vont participer à l'intégration et à la modulation des informations nociceptives et non-nociceptives.

1. Entre afférences sensorielles primaires et neurones de la CDME

Les glomérules synaptiques :

Les terminaisons centrales des afférences primaires établissent des synapses axo-dendritiques ou axo-somatiques avec les neurones de la CDME. La plupart des terminaisons centrales des afférences primaires participent à un complexe appelé « glomérule synaptique » (Ribeiro-da-Silva et De Koninck, 2008). Les glomérules synaptiques ont été identifiés en microscopie électronique et constituent des structures importantes pour l'intégration et la modulation des informations sensorielles afférentes. On note la présence de vésicules synaptiques, d'éléments postsynaptiques et d'appositions présynaptiques. Les différentes observations réalisées (Todd, 1996) ont permis de distinguer quatre types de glomérules synaptiques. Les types Ia et Ib impliquent les afférences de types C non peptidergiques et peptidergiques respectivement, et sont principalement trouvés dans la couche II. Les terminaisons centrales des fibres A δ et A β sont impliquées dans les glomérules de type IIa et IIb, majoritairement localisés dans les couches IIi ventrale et III.

Neurochimie des transmissions :

Les afférences nociceptives primaires réalisent des synapses excitatrices utilisant majoritairement le glutamate comme neurotransmetteur (Battaglia et Rustioni, 1988). Des neurotransmetteurs comme l'ATP, l'aspartate et des neuropeptides tels la substance P, sont potentiellement aussi impliqués dans les connexions synaptiques entre afférences primaires et neurones de la CDME (Todd et Spike, 1993; Millan, 1999).

Les terminaisons centrales des afférences primaires expriment de nombreux récepteurs dont l'activation va moduler la transmission vers les neurones de CDME. Des récepteurs du glutamate, du GABA, de l'acétylcholine, de différents neuropeptides, et d'autres neurotransmetteurs ont été décrits (Yaksh, 2006). Les neurotransmetteurs associés à ces récepteurs peuvent être libérés par des neurones intrinsèques à la CDME ou par les terminaisons de neurones dont le corps cellulaire est localisé dans des structures supraspinales.

L'inhibition présynaptique GABAergique des afférences sensorielles primaires implique l'activation, par des stimulations sensorielles, des neurones intrinsèques GABAergiques de la CDME (Eccles et al., 1963). L'activation de ces synapses GABAergiques induit une dépolarisation de la terminaison de neurone sensoriel dépendante du Cl^- , et inhibe ainsi la propagation des potentiels d'actions afférents (Willis, 2009). Dans certaines conditions cette forme d'inhibition peut conduire à déclencher des potentiels d'actions si la dépolarisation est suffisante, générant ainsi un « potentiel reflexe de racine » pouvant être à l'origine d'une situation d'allodynie mécanique (Cervero et Laird, 1996).

Contacts synaptiques fonctionnels :

Des études électrophysiologiques sur des préparations comprenant les racines dorsales et la ME ont permis de caractériser les propriétés fonctionnelles et pharmacologiques des contacts synaptiques entre les fibres de type C, $A\delta$ et $A\beta$ et les neurones de la CDME.

Les entrées synaptiques excitatrices et inhibitrices des différents types de neurones (les cellules en ilot, cellules centrales, cellules radiales, cellules verticales) de la couche II, en réponse aux stimulations des fibres $A\delta$ et C ont été caractérisées (Yasaka et al., 2007). Les cellules en ilot et les cellules centrales reçoivent des entrées excitatrices mono-synaptiques provenant des fibres C, mais également des entrées excitatrices polysynaptiques dépendant de l'activation de fibres $A\delta$. Les cellules centrales reçoivent des entrées inhibitrices (GABAergiques et glycinergiques) recrutées par les fibres C et $A\delta$, alors que les cellules en ilots en reçoivent uniquement à partir de stimulation des fibres C, et ces entrées semblent être purement GABAergiques. Les cellules radiales et verticales reçoivent des entrées excitatrices monosynaptiques des fibres C et $A\delta$. La stimulation des fibres $A\delta$ et C recrute également des interneurons inhibiteurs (Lu et Perl, 2005). Les afférences primaires exprimant TRPV1 et

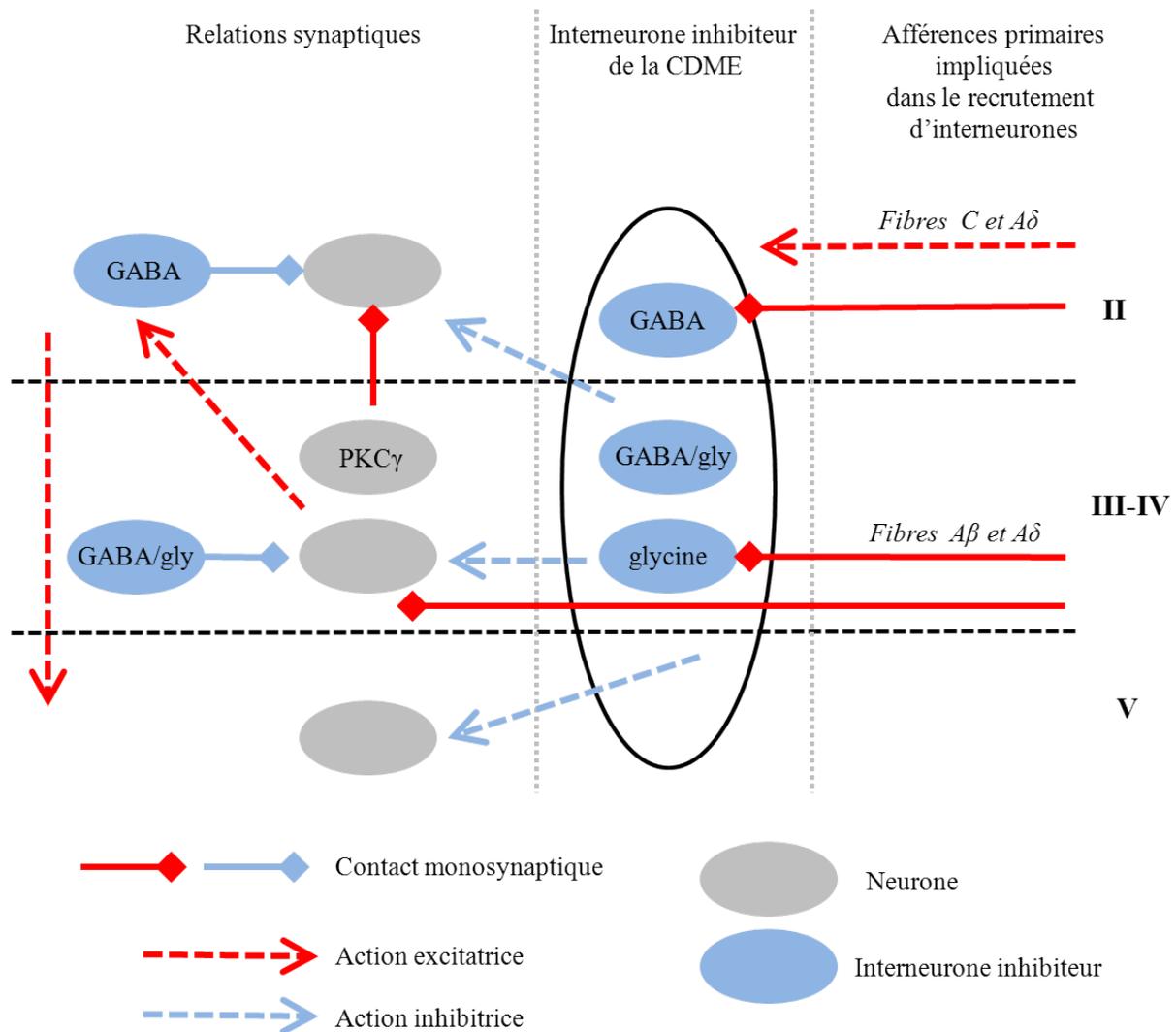


Figure 6. Recrutement des interneurons de la CDME par les afférences primaires.

Dans la couche II, les connexions inhibitrices sont GABAergiques (Lu et perl, 2005). Des fibres de type C peuvent contacter directement des interneurons GABAergiques de la couche II (Lu et perl, 2003). Les fibres C et A δ sont impliquées dans le recrutement d'interneurons inhibiteurs qui contactent des neurones de la couche II (Yasaka et al., 2007). Des fibres non-nociceptives de type A contactent des interneurons glutamatergiques exprimant la PKC γ et des interneurons inhibiteurs glycinergiques dans les couches III-IV (Miraucourt et al., 2007). Des fibres A β peuvent recruter des interneurons GABAergiques de la couche II (Daniele et MacDermott 2009). Des fibres de types C et A δ sont impliquées dans le recrutement de réseaux polysynaptiques excitateurs et inhibiteurs qui contactent les neurones de la couches V (Nakatsuka et al., 2002).

TRPA1, contactent des neurones de type radial et vertical dans la couche II, mais n'établissent pas de synapse avec les cellules en îlot ou verticales (Uta et al., 2010).

Les interneurons glutamatergiques exprimant la PKC γ dont les corps cellulaires se trouvent à la frontière des couches II et III (Polgar et al., 1999) sont contactés par des fibres non-nociceptives A β et A δ , exprimant le transporteur de recapture du glutamate VGLUT1 (Neumann et al., 2008).

La stimulation des fibres non-nociceptives A β recrute certains neurones GABAergiques de la couche II par des circuits polysynaptiques excitateurs. Ces mêmes interneurons GABAergiques sont aussi recrutés par les stimulations des afférences de types A δ et C (Daniele et MacDermott, 2009).

Ainsi, les fibres C et A δ contactent les neurones des couches I et II, alors que fibres A β contactent les neurones des couches profondes de la CDME. L'ensemble de ces études montre que les connexions des afférences primaires sensorielles avec les neurones de la CDME sont très organisées en fonctions des différentes couches.

Circuits polysynaptiques dans la CDME :

Des études à l'aide de traceurs viraux ont permis de commencer à révéler les circuits de la CDME véhiculant l'information nociceptive chez la souris (Braz et al., 2005), (2005; Bráz et Basbaum, 2009) Les fibres nociceptives peptidergiques exprimant les canaux TRPV1 et Nav1.8 contactent des interneurons des couches I et IIo. Ce même contingent de fibres contactent des neurones de projection de la couche I exprimant les récepteurs à la substance P de type 1 (NK1). Les interneurons de la couche Iii dorsale sont contactés par des fibres non myélinisées non peptidergiques exprimant le canal Nav1.8 et le facteur de liaison à l'IB4. Ces contingents de fibres transmettent de manière polysynaptique de l'information nociceptive aux neurones de projection des couches III-V. Des neurones de projection et des interneurons des couches III-V sont contactés monosynaptiquement par des ASP myélinisées. Ces mêmes fibres contactent aussi directement des interneurons exprimant la PKC γ de la couche Iii ventrale.

Ces données suggèrent l'existence de relations synaptiques importantes dans le traitement l'information nociceptive impliquant l'ensemble des couches de la CDME (figure 6).

2. Relations synaptiques entre les neurones de la CDME

Différentes études électrophysiologiques ont permis de caractériser le type de connexions synaptiques qui existent entre les neurones de la CDME.

Des enregistrements électrophysiologiques de paires de neurones ont été réalisés dans la CDME pour caractériser les pourcentages de connexions monosynaptiques entre les neurones intrinsèques de la couche II (Lu et Perl, 2003) et ceux des couches III-IV (Schneider, 2008). Ces études montrent que les probabilités de trouver des neurones connectés dans la couche II et les couches III-IV sont respectivement de 11% (n= 28/248) et 30% (n= 32/106). Dans la couche II 47% (13/28) des connexions sont excitatrices et utilisent comme neurotransmetteur le glutamate. Les connexions inhibitrices entre les neurones de la couche II (53% (15/28)) sont à 90% GABAergiques et à 10% glycinergiques. L'organisation des connexions est totalement différente entre les neurones des couches III-IV. Dans les couches III-IV, 31% (10/32) des connexions sont excitatrices et utilisent comme neurotransmetteur le glutamate. Les connexions inhibitrices entre les neurones des couches III-IV (69% (22/32)) qui ont pu être caractérisées pharmacologiquement impliquent toutes comme neurotransmetteur du GABA et de la glycine (n=6/6).

Une autre étude a été réalisée avec une technique différente pour évaluer le type de connexions excitatrices et inhibitrices entre les neurones des couches superficielles (Santos et al., 2009). Dans cette étude, le neurone suspecté d'être connecté au neurone enregistré est stimulé au niveau de son corps cellulaire et n'est pas enregistré comme dans une approche d'enregistrement de paires de neurones. Dans cette étude 221 paires de neurones connectés monosynaptiquement ont été enregistrées, dans laquelle le neurone postsynaptique était dans la couche II. Les auteurs décrivent que la probabilité globale de trouver des neurones connectés est de 25%. Ces connexions sont majoritairement excitatrices (82%) et sont internes à la couche II (79%). Le reste de ces connexions excitatrices provient de la couche I (8%) et de la couche III (13%). L'importance des connexions excitatrices à l'intérieur de la couche II, ainsi que l'existence de quelques connexions excitatrices entre les neurones de la couche III vers les neurones de la couche II ont été décrites dans une étude d'imagerie utilisant des stimulations localisées grâce à des libérations de glutamate photolibérable (= cagé) (Kato et al., 2007).

L'étude des connexions inhibitrices rapides GABAergiques et glycinergiques dans les couches superficielles mettent en évidence différentes populations de neurones. Chez le rat, dans la couche I les neurones reçoivent uniquement des entrées inhibitrices glycinergiques (Keller et al., 2001). Dans la couche II une partie des neurones reçoit uniquement des entrées GABAergiques (45%) et une autre partie (55%) à la fois des entrées GABAergiques et glycinergiques. Dans les couches III-IV, tous les neurones reçoivent les deux types d'entrées synaptiques inhibitrices (Inquimbert et al., 2007).

Les interneurons inhibiteurs GABAergiques des couches I à III, reçoivent eux-mêmes des entrées synaptiques inhibitrices. Chez la souris, les neurones GABAergiques des couches I et II interne sont majoritairement contactés par des interneurons GABAergiques alors que les neurones des couches II externe et III sont contactés principalement par des interneurons glycinergiques (Takazawa et MacDermott, 2010a). Des connexions entre neurones GABAergiques de la couche II semblent impliquées dans l'intégration de processus nociceptifs induits par l'activation des fibres de type C (Zheng et al., 2010).

Ces études électrophysiologiques illustrent la diversité des connexions synaptiques entre les neurones de la CDME. Il existe des différences d'organisation importantes entre la couche II et les couches III-IV notamment dans les connexions inhibitrices. Malgré ces nombreuses études très peu de chose sont connues sur d'éventuelles relations synaptiques fonctionnelles entre les couches superficielles et profondes de la CDME.

Les neurones de la CDME forment des réseaux complexes d'interneurones inhibiteurs et excitateurs. L'implication fonctionnelle de ces réseaux et de leur plasticité lors du traitement de l'information nociceptive sont présentées dans la partie suivante.

III. « Le système nociceptif spinal »

La nociception est l'ensemble des processus physiologiques permettant à un organisme de détecter des stimulus potentiellement dommageables pour ses tissus. Les neurones sensoriels spécialisés dans la détection des stimuli nociceptifs sont appelés nocicepteurs. Ces neurones contactent des neurones de la CDME. Les réseaux de neurones de la CDME vont intégrer et moduler l'information nociceptive avant de la transmettre vers des centres supra-spinaux. En retour les centres supra-spinaux exercent des contrôles facilitateurs ou inhibiteurs sur les réseaux de neurones de la CDME. L'ensemble de ces connexions synaptiques qui participent au traitement de l'information nociceptive au niveau médullaire se définit comme le système nociceptif spinal. (Voir partie II)

La détection d'une lésion tissulaire, d'une brûlure, d'une inflammation va induire des réponses de la part de l'organisme. Les seuils de détection sensorielle vont être abaissés, et des modalités sensorielles non-nociceptives vont être détectées comme de l'information nociceptive. Ainsi, l'hyperalgésie se définit comme le phénomène de facilitation de la détection des stimuli nociceptifs en abaissant les seuils de détection. L'allodynie est la mise en place d'une sensation douloureuse en réponse à des stimuli non-nociceptifs.

Les résultats de nombreuses études suggèrent que des éléments neuronaux de la corne dorsale de la moelle épinière participent à l'induction et à la maintenance des états d'hyperalgésie et de l'allodynie (Sandkühler, 2009). La plasticité des réseaux de neurones de la CDME semble en partie responsable de la mise en place d'états d'hyperalgésie et d'allodynie.

1. *Plasticité fonctionnelle des neurones de la CDME*

Différents mécanismes de plasticité ont été décrits dans la CDME.

a) Mécanismes de plasticités synaptiques

Le « Wind-up » :

Le phénomène de « Wind-up » est une facilitation de la réponse de neurones des couches II et V en réponse à une stimulation électrique d'intensité constante (0,3-5Hz pendant 5 à 60 secondes) des fibres C. A chaque décharge des fibres C la réponse postsynaptique du

neurone contacté (mono- ou poly-synaptiquement) est amplifiée. En effet, une sommation temporelle des réponses postsynaptiques s'effectue car le neurone n'a pas le temps de revenir à son potentiel de repos entre chaque décharge des fibres C. Cette facilitation dépend de la libération de glutamate et de l'activation des récepteurs NMDA. Ce phénomène apparaît en quelques secondes et disparaît au bout de quelques minutes (1-5 minutes). Ainsi par ses propriétés le Wind-up est classé comme un mécanisme de plasticité à court terme (Woolf et Salter, 2000).

La plasticité à long terme :

La potentialisation à long terme (PLT) de l'efficacité synaptique est un processus de plasticité synaptique (Bliss et Lomo, 1973). Dans le système nociceptif spinal un tel processus a été décrit (Sandkühler, 2009). La stimulation à haute fréquence des fibres C (100 Hz, pendant 1 seconde) entraîne uniquement une PLT au niveau des synapses avec les neurones de la couche I qui expriment le récepteur NK1 et qui projettent vers le noyau parabrachial. Ce protocole n'induit pas de plasticité synaptique avec les autres neurones de la couche I. Un tel mécanisme de plasticité pourrait contribuer à la mise en place de l'hyperalgésie thermique (Randic et al., 1993). Les autres neurones de projection de la couche I exprimant le récepteur NK1 et qui contactent les neurones de la substance grise périaqueducale ont leurs synapses potentialisées par des protocoles différents de stimulations des fibres C (2-3 Hz, pendant 2 à 3 minutes) (Ikeda et al., 2006).

b) Changement d'excitabilité et de patrons de décharges

Des changements d'excitabilité des neurones de la couche II ont été mis en évidence suite à la phosphorylation de la sous-unité Kv4.2 des canaux potassium sensibles au potentiel. Ce mécanisme semble important dans le développement d'hyperalgésie (Hu et al., 2003).

Des changements de profils de décharges de neurones de la couche V ont été décrits (Derjean et al., 2003). Les neurones de la couche V ont un profil de décharge de type tonique. L'application d'un agoniste des récepteurs métabotropiques glutamatergiques de type I ou l'application d'une stimulation nociceptive prolongée induit l'apparition d'une dépolarisation soutenue en plateau qui favorise la décharge continue de ces neurones. L'induction d'une dépolarisation en plateau est un mécanisme intrinsèque au neurone qui amplifie la fréquence de décharge de potentiel d'action suite à une stimulation.

L'ensemble de ces mécanismes de plasticités synaptiques en lien avec l'intégration des informations nociceptives témoigne de l'importance des neurones de la CDME dans le traitement l'information nociceptive. D'autres mécanismes vont aussi pourvoir rendre compte de l'importance des neurones de la CDME dans la modulation des informations nociceptives notamment lors d'états de douleurs inflammatoires et/ou neuropathique.

2. Changements associés aux douleurs inflammatoire et neuropathique

Les états de douleur à court terme (douleurs aiguës et inflammatoires) et à long terme (neuropathie) peuvent être induits chez l'animal. Il existe un grand nombre de modèles animaux pour modéliser ces différents états (Sandkühler, 2009). Différentes études ont pu mettre en évidence des changements au sein de la CDME dans ces modèles animaux de douleur.

a) Douleur aiguë et inflammatoire

Lors de douleurs inflammatoires il y a une augmentation de la concentration de prostaglandine PGE2 dans la CDME une heure après son induction en périphérie (Samad et al., 2001). L'un des effets de la PGE2 dans la CDME est de réduire l'inhibition glycinergique via un mécanisme postsynaptique (Zeilhofer et Zeilhofer, 2008). Les récepteurs de la glycine de la couche II exprimant la sous-unité GlyR α 3 vont être inhibés, ce qui diminue le degré d'inhibition synaptique. Cette perte d'inhibition est corrélée avec des états d'hyperalgésie thermique et d'allodynie mécanique (Harvey et al., 2004).

Dans le cas de douleurs inflammatoires, on a observé également une augmentation de la production de neurostéroïdes 3α 5 α réduits au niveau spinal. Ces stéroïdes sont des potentialisateurs de la transmission GABAergique et limitent l'étendue de l'hyperalgésie thermique qui accompagne les états de douleur inflammatoire (Poisbeau et al., 2005).

b) Douleur neuropathique

Par définition, les douleurs neuropathiques sont des douleurs consécutives à une lésion du système nerveux. Selon le lieu de la lésion, on distingue des douleurs neuropathiques périphériques et des douleurs neuropathiques centrales. Ces douleurs sont liées à un

dysfonctionnement du système nerveux. La douleur neuropathique est une douleur spontanée qui peut s'exprimer en dehors de toute stimulation périphérique ou être évoquée.

Les situations étiologiques les plus fréquentes sont les douleurs post-traumatiques, postchirurgicales, les compressions radiculaires chroniques par arthrose ou les hernies discales (sciatiques ou cervico-brachialgies), ainsi que les neuropathies périphériques, en particulier celles liées au diabète ou à l'action neurotoxique des polychimiothérapies anticancéreuses. Les douleurs neuropathiques centrales s'observent lors de lésions du système des voies sensitives (soit les cordons postérieurs de la moelle, soit le faisceau spino-thalamique), ou les systèmes de contrôle de la douleur (Kuner, 2010).

De nombreuses perturbations moléculaires et cellulaires périphériques et centrales ont été décrites dans des modèles animaux de douleurs neuropathiques [pour revue (Hunt et Mantyh, 2001; Baron, 2006)]. Dans cette introduction, seuls les mécanismes mettant directement en jeu les connexions synaptiques de la CDME sont brièvement décrits.

Changement dans la libération de neuromodulateurs :

Dans les modèles de douleur neuropathique de type constriction du nerf sciatique, on a pu observer de nombreux changements de marqueurs dans les neurones de la CDME. Le niveau de libération de glutamate est plus élevé du côté de la constriction (Kawamata et al., 2005). Des expériences de dosage montrent également que les neurotransmetteurs comme la sérotonine et la noradrénaline, mais aussi des neuropeptides (neuropeptide Y, galanine) sont trouvés en plus grande concentration chez un animal neuropathique que chez un animal contrôle (Colvin et Duggan, 1998, 2001).

Changement gliaux :

Des activations de cellules microgliales et/ou d'astrocytes de la CDME ont été décrites dans certaines douleurs inflammatoires ou neuropathiques. Ces changements microgliaux sont, dans ces cas, impliqués dans les états d'hyperalgésie et d'allodynie, pour revue (Scholz et Woolf, 2007)

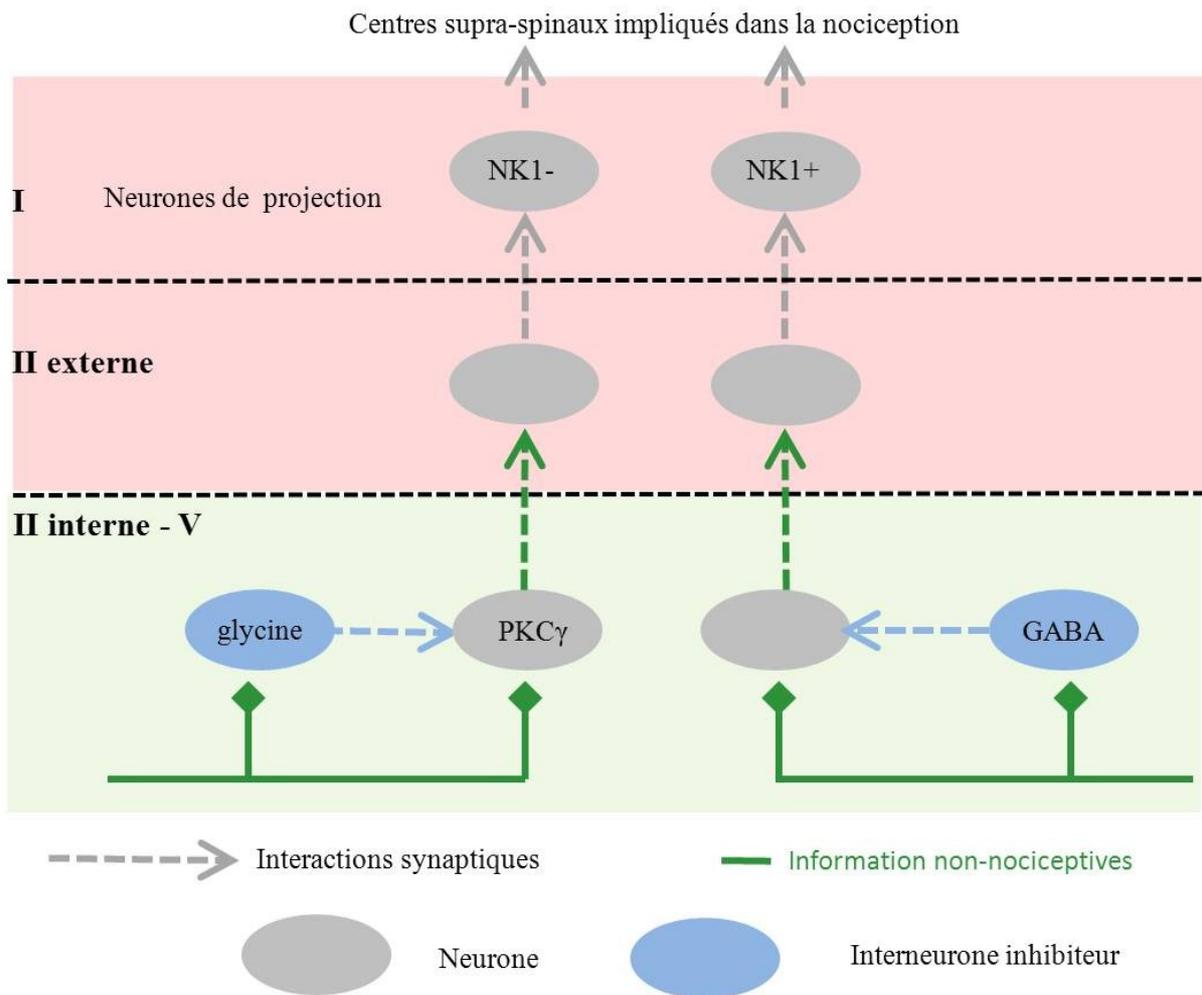


Figure 7. Réseaux impliqués dans l'allodynie mécanique.

Les informations non-nociceptives véhiculées par des fibres de type A sont intégrées dans les couches IIinterne-V. Un des rôles des interneurons inhibiteurs de la CDME est d'inhiber des réseaux de neurones permettant aux informations non-nociceptives d'être acheminées vers les neurones de projection de la couche I qui codent les informations nociceptives. Un de ces réseaux est placé sous un contrôle glycinergique et fait intervenir des interneurons glutamatergiques exprimant la PKC γ et les neurones de projection de la couche I n'exprimant pas le récepteur NK1 de la substance P. Un autre réseau est sous contrôle GABAergique et fait intervenir des interneurons glutamatergiques et les neurones de projection de la couche I exprimant le récepteur NK1 de la substance P. La perte de l'inhibition de ces réseaux conduit à la mise en place d'une allodynie mécanique (D'après Takasawa et MacDermott 2010 ; Miraucourt et al., 2007 ; 2010).

Perturbation de la transmission GABAergique :

Pour expliquer la perte d'efficacité de la transmission synaptique inhibitrice lors de douleurs neuropathiques l'existence d'une mort cellulaire sélective des neurones GABAergiques a été suggérée (Moore et al., 2002). Depuis, les études réalisées avec des modèles animaux de douleur neuropathique indiquent que la mort cellulaire d'interneurones GABAergiques ou encore la baisse de synthèse de GABA ne semblent pas directement impliqués dans les états d'allodynie et d'hyperalgésie (Polgar et al., 2003; Polgar et al., 2004).

L'inhibition GABAergique peut être moins efficace si le gradient des anions est perturbé. Ce gradient est assuré par les transporteurs KCC2 et NKCC1. Chez des animaux neuropathiques la perturbation du fonctionnement de KCC2 aura pour effet de rendre les courants GABA_A et glycine moins hyperpolarisants, voire dépolarisants du fait de l'accumulation d'ions Cl⁻ dans les neurones. Cette perte d'inhibition faciliterait la mise en place d'états d'allodynie et d'hyperalgésie (Coull et al., 2003; Coull et al., 2005)

Lors d'états douloureux des changements moléculaires importants apparaissent au sein de la CDME. Ces changements vont affecter les transmissions synaptiques entre les neurones de la CDME et rendre compte d'état hyperalgésie thermique et d'allodynie mécanique. Il existe d'autres changements au niveau de la CDME qui peuvent sous-tendre des états d'allodynie mécanique, ces derniers sont développés dans la section suivante.

3. Circuits spinaux de l'allodynie

L'allodynie mécanique permet à des informations tactiles non-nociceptives d'être perçues comme douloureuses. La mise en place d'une telle situation suggère l'existence de réseaux de neurones permettant à l'information non nociceptive d'activer des neurones impliqués dans le traitement de l'information nociceptive (figure 7). L'allodynie possède des composantes spinales car l'injection intrathécale de bloquants de la transmission inhibitrice GABAergique et glycinergique induit une allodynie mécanique (Yaksh, 1989).

La théorie du portillon ou « gate control theory » de la douleur attribue aux interneurones inhibiteurs de la CDME un rôle central dans le traitement de l'information nociceptive. Dans la proposition de Melzack et Wall (1965), les fibres non-nociceptives (A β) recruterait des interneurones inhibiteurs de la lamina II qui réduiraient l'activité synaptique des fibres nociceptives, ce qui inhiberait l'information nociceptive (Melzack et Wall, 1965).

Il existe donc des possibilités d'interactions entre modalités nociceptives et non nociceptives au niveau de la CDME.

Interactions entre modalités nociceptives et non nociceptives

Des fonctions anormales des fibres A β (non nociceptives) peuvent contribuer à l'allodynie tactile dans des états de douleurs neuropathiques et/ou inflammatoires si les informations qu'elles véhiculent accèdent aux réseaux de neurones de la CDME impliqués dans le traitement de l'information nociceptive. Il existe deux cas de figure pour expliquer ces interactions :

- Théorie du bourgeonnement et nouvelle innervation :

Une étude a rapporté que les terminaisons centrales des fibres A β (Woolf et al., 1992) étaient sujettes à un bourgeonnement axonal (sprouting) vers les couches I et II externe de la CDME suite à une axotomie périphérique. Ce résultat a été contesté, et d'autres expériences ont montré qu'un tel bourgeonnement n'avait pas lieu dans des états de douleurs neuropathique et/ou inflammatoire (Hughes et al., 2003; Woodbury et al., 2008).

- Relations synaptiques entre couches de la CDME :

Dans certaines conditions, les informations non-nociceptives véhiculées par les fibres A β peuvent être transmises de manière polysynaptique, impliquant des transmissions glutamatergiques rapides vers les neurones des couches I et II impliquées dans le traitement de l'information nociceptive. Ceci semble être le cas dans des états de douleur inflammatoire ou neuropathique (Baba et al., 1999; Schoffnegger et al., 2008), ou après application d'antagonistes des récepteurs GABA_A et des récepteurs de la glycine, ce qui correspond à un blocage total de l'inhibition de la CDME (Torsney et MacDermott, 2006). L'existence de ces connexions synaptiques entre les couches « nociceptives » et « non-nociceptives » révélées uniquement dans certaines conditions, implique qu'elles soient sous fort contrôle inhibiteur dans des situations physiologiques de bases (Cronin et al., 2004).

Des études récentes (Miraucourt et al., 2007; 2009) au niveau du noyau spinal du trijumeau, dont l'organisation en couche est considérée comme analogue à celle de la CDME, démontrent l'existence d'une inhibition glycinergique qui s'exerce sur les interneurons excitateurs exprimant la PKC γ . Ces interneurons sont responsables d'un transfert

d'information non-nociceptive vers les neurones de projection de la couche I n'exprimant pas les récepteurs NK1. Une perte de l'inhibition glycinergique dans ce système conduit à une allodynie mécanique dynamique.

De nombreux changements au niveau de la CDME vont participer à la mise en place et au maintien d'états d'allodynie mécanique. La mise en place d'une allodynie mécanique a été décrite suite à l'activation de fibres nociceptives exprimant TRPV1 (Willis, 2009). Les effets de l'activation des canaux TRPV1 au niveau de la CDME sont détaillés dans la section suivante.

4. Activation des nocicepteurs TRPV1 et système nociceptif spinal

L'excitation des terminaisons sensorielles des afférences primaires, par des températures nociceptives ou non nociceptives dépend de la présence, à leur surface membranaire, d'un ou de plusieurs éléments de la famille des protéines de transduction appelée « transient receptor potentiel » ou canaux « TRP ». Le canal TRPV1 participe à la détection des températures nociceptives (Caterina et al., 1997)

a) Caractérisation et fonction des canaux TRPV1

Le récepteur TRPV1 a été cloné chez le rat et la souris (Caterina et al., 1997). Il s'agit d'un canal cationique transmembranaire présentant une forte perméabilité aux ions Ca^{2+} . Ce canal est activé par des températures nociceptives ($> 43^{\circ}C$), par les protons et par des agonistes sélectifs tels que la capsaïcine (principe actif du piment) ou la résinifératoxine (Spicarova et Palecek, 2008). La capsazépine est un antagoniste compétitif du récepteur TRPV1 (Walpole et al., 1994). Les récepteurs TRPV2-4 ne sont pas activés par la capsaïcine. Au niveau central, des lipides endogènes, comme la NADA (N-arachidonyldopamine), peuvent activer les récepteurs TRPV1 et induire la libération de glutamate à partir des terminaisons des nocicepteurs exprimant TRPV1, mais aussi de substance P et de CGRP contenus dans les mêmes terminaisons (Huang et al., 2002). Le mécanisme de transduction impliquant le récepteur TRPV1 implique l'ouverture d'un canal cationique non sélectif,

permettant un influx d'ions Na^+ et Ca^{2+} , et une sortie d'ions K^+ , ce qui a pour conséquence de dépolariiser les nocicepteurs qui l'expriment (Julius et Basbaum, 2001).

Une souris KO TRPV1-/- a été générée (Caterina et al., 2000). Cette souche de souris présente des réponses normales aux stimuli mécaniques nociceptifs, mais présente un déficit dans la détection des stimuli thermiques chauds nociceptifs. Les comportements douloureux induits normalement par la capsaïcine ne se produisent pas chez les souris KO TRPV1-/- . L'hyperalgésie thermique au chaud, induite par l'injection intraplantaire de carragénine, un agent pro-inflammatoire, est absente chez les souris ne possédant pas les récepteurs TRPV1 (Davis et al., 2000). Au niveau des terminaisons périphériques, il a été établi que les récepteurs TRPV1 pouvaient être potentialisés par les médiateurs de l'inflammation tels que la bradykinine, les prostaglandines ou les protons (Cortright et Szallasi, 2004). Le nombre de récepteurs TRPV1 peut être augmenté à la périphérie, dans des conditions inflammatoires, par l'action du NGF (Ji et al., 2002).

b) Localisation des canaux TRPV1 dans le système nociceptif spinal

Les récepteurs TRPV1 sont exprimés par des afférences de type C et A δ (Caterina et al., 1997; Guo et Gotz, 1997). Chez le rat, les afférences exprimant TRPV1 réalisent des synapses glutamatergiques avec les neurones des couches I et II, et plus particulièrement dans la couche II interne (Guo et al., 1999; Valtschanoff et al., 2001). Les terminaisons centrales TRPV1, qui se projettent dans la couche I, contactent des neurones exprimant le récepteur NK1, et réalisent des contacts monosynaptiques avec des neurones de projections du tractus spino-parabrachial (Hwang et al., 2003). Le développement des afférences primaires exprimant le récepteur TRPV1 dans la CDME se finalise entre P20 et P30 (Guo et al., 1999). Chez le rat, la grande majorité des afférences sensorielles cutanées exprimant TRPV1 exprime aussi le récepteur à l'isolectine IB4 qui caractérise les fibres non peptidergiques (70% des fibres TRPV1). Un autre contingent de fibres sensorielles (30% des fibres TRPV1) se caractérise par la présence de neuropeptides (SP, CGRP).

Le canal TRPV1 est donc un bon marqueur des fibres nociceptives impliquées dans la détection de chaleur nociceptive. Ces fibres se projettent dans la CDME au niveau des couches I et II.

c) Rôles physiologiques des afférences sensorielles nociceptives exprimant TRPV1

La capsaïcine est utilisée en recherche clinique pour comprendre les mécanismes induisant des douleurs. Cette substance peut, en fonction de sa concentration et de son mode d'administration, générer de l'hyperalgésie ou de l'analgésie ou encore de l'allodynie. Elle permet de stimuler des nocicepteurs exprimant les récepteurs TRPV1 (Jancso et Maggi, 1987; Knotkova et al., 2008). L'injection intradermale d'une faible dose (100 µg dans 10 µL) de capsaïcine induit une douleur aiguë, de type brûlure et quelque fois des démangeaisons (prurit) (LaMotte et al., 1991). Elle est suivie de la mise en place d'une hyperalgésie mécanique chez l'humain et d'une excitabilité accrue (*sensibilisation*) des neurones du tractus spino-thalamique (Simone et al., 1991).

Activation des terminaisons périphériques TRPV1

L'activation des terminaisons périphériques TRPV1, par l'injection sous-cutanée de capsaïcine, induit des décharges dans les nocicepteurs polymodaux de type C et les nocicepteurs mécano-thermiques de type Aδ (Rau et al., 2007). Les afférences primaires nociceptives qui sont excitées vont libérer du glutamate dans la CDME, mais aussi des neuropeptides en fonction des espèces animales étudiées (substance P, neurokinine A, CGRP) (Huang et al., 2002). Ces neurotransmetteurs et neuromodulateurs vont contribuer à exciter des neurones de second ordre, dont des neurones de projection des couches I et V par des voies polysynaptiques, impliqués dans l'élaboration de sensation douloureuse. La douleur est ressentie comme maximale, rapidement après l'injection de capsaïcine, et décroît progressivement après 15 à 20 minutes (Willis, 2009). Au niveau du site d'injection de la capsaïcine, se met en place une hypoesthésie (hypoesthésie est le terme médical utilisé pour décrire une diminution de la sensibilité à la stimulation) due à la désensibilisation des afférences primaires exprimant le récepteur TRPV1 (LaMotte et al., 1991). Autour du site d'injection se développe une hyperalgésie primaire mécanique et thermique qui dure environ un jour. (hyperalgésie = sensibilité augmentée à la douleur). Autour de la zone d'hyperalgésie primaire se développe une allodynie mécanique. Une allodynie est une douleur ressentie par un sujet alors que le stimulus responsable était, pour le même sujet, antérieurement indolore.

Elle correspond à la diminution du seuil douloureux : un stimulus normalement non nociceptif va être perçu comme douloureux par le sujet (Torebjork et al., 1992). Les afférences, qui innervent la peau dans les régions d'hyperalgésie secondaire et d'allodynie mécanique, ont un niveau normal d'excitabilité : il n'y a pas de sensibilisation périphérique par l'injection de capsaïcine (LaMotte et al., 1992). Ces processus dépendent donc de l'augmentation des réponses des neurones centraux du SNC, dont ceux de la CDME. Dans le cas de l'allodynie mécanique, des informations non nociceptives vont pouvoir exciter des neurones des couches nociceptives. L'ensemble des processus moléculaires et de plasticité synaptique, qui conduisent à augmenter l'excitabilité des neurones de la CDME en réponse à des stimulations nociceptives, implique notamment des mécanismes de sensibilisation centrale, et de potentialisation à long terme de la transmission synaptique excitatrice, pour revue (Sandkühler, 2009; Willis, 2009). D'autres mécanismes centraux au niveau spinal vont intervenir pour moduler l'arrivée de l'information nociceptive véhiculée par les fibres TRPV1. L'un de ces mécanismes pourrait mettre en jeu un circuit encore mal connu qui impliquerait des connexions avec des neurones de la couche V et des neurones du noyau Accumbens qui mettent en route des contrôles inhibiteurs descendants (Tambeli et al., 2009).

Activation des terminaisons centrales TRPV1

L'injection intrathécale de capsaïcine conduit à la mise en place d'une hyperalgésie qui peut, à long terme, devenir une analgésie (désensibilisation) (Yaksh, 1987; Spicarova et Palecek, 2008). L'injection intrathécale d'antagonistes des récepteurs TRPV1, permet de réduire ou de prévenir la mise en place d'hyperalgésie thermique et d'allodynie mécanique, dans différents modèles de douleurs inflammatoires et chroniques (Kanai et al., 2005). Il a été montré qu'il existait dans la ME une famille de dérivés lipidiques de la classe des acides linoléique (13- et 9-hydroxyoctadecadienoic) qui sont des agonistes du canal TRPV1. L'injection intrathécale de ces composés dans la ME, induit l'apparition d'une allodynie mécanique. La neutralisation de ces composés dans un modèle de douleur inflammatoire chronique (CFA), permet de bloquer l'apparition de l'allodynie mécanique (Patwardhan et al., 2009).

L'activation périphérique ou centrale des terminaisons nociceptives exprimant TRPV1 induit à la fois de l'hyperalgésie thermique et de l'allodynie mécanique.

d) Impact de l'activation des récepteurs TRPV1 sur les transmissions synaptiques de la CDME

Des injections sous-cutanées de capsaïcine dans les pattes postérieures du rat, induisent l'augmentation de l'expression du gène précoce c-FOS dans des neurones inhibiteurs et excitateurs des couches superficielles et profondes de la CDME (Zou et al., 2001; Hossaini et al., 2010).

La stimulation des terminaisons centrales exprimant TRPV1 par la capsaïcine induit une libération de glutamate (Ueda et al., 1994). Des approches électrophysiologiques ont montré que l'application de capsaïcine dans une tranche aigue de ME de rat adulte augmentait la fréquence des sCPSE et des mCPSE dans la couche II de la CDME. Ces études ont permis de déterminer que les afférences exprimant le récepteur TRPV1 réalisaient des synapses fonctionnelles avec les neurones de la couche II (Nakatsuka et al., 2002). Une sous-population de neurones exprimant le récepteur NK1 dans les couches I (73%) et III-IV (43%) est contactée par des afférences TRPV1 (Labrakakis et MacDermott, 2003). De manière générale, les neurones de la couche V ne sont pas directement contactés par des afférences primaires TRPV1 (Nakatsuka et al., 2002), mais il semble qu'un faible contingent de neurones de projection spinothalamiques le soit (Kim et al., 2009).

Il existe des circuits polysynaptiques excitateurs qui transmettent de l'information provenant des afférences TRPV1 depuis la couche II vers la couche V (Nakatsuka et al., 2002). L'enregistrement de courants synaptiques excitateurs miniatures révèle que seules des terminaisons excitatrices contactant des neurones de la couche II expriment le récepteur TRPV1, et aucun neurone de la couche V. Par contre, les neurones de la couche V sont excités par l'application de capsaïcine en l'absence de bloquant de la genèse de potentiels d'action ce qui suggère l'existence d'un circuit polysynaptique excitateur relayant de l'information nociceptive de la couche II vers la couche V.

La stimulation des afférences primaires TRPV1 permet d'activer des interneurones GABAergiques et glycinergiques. Chez les rats âgés de 3 à 4 semaines, la capsaïcine induit des changements de fréquence des courants synaptiques GABAergiques et glycinergiques dans la couche II (Zhou et al., 2007, 2008). Chez la souris (P8-12), l'activation des

terminaisons TRPV1 induit une augmentation de la transmission inhibitrice dans la couche II, par un mécanisme indépendant de la transmission glutamatergique, mais dépendant de la substance P et d'interneurones inhibiteurs exprimant le récepteur NK1 (Ferrini et al., 2007). Chez le rat après destruction des fibres TRPV1 par un traitement néonatal à la capsaïcine, il semble persister une très faible population de neurones glutamatergiques intrinsèques à la couche II exprimant le canal TRPV1 au niveau postsynaptique (Zhou et al., 2009). Chez la souris, une étude électrophysiologique indique la présence de récepteurs TRPV1 sur des interneurones inhibiteurs dans un système de culture organotypique de tranche de ME (Ferrini et al., 2010).

Résumé

La capsaïcine permet d'activer spécifiquement des terminaisons centrales d'afférences nociceptives exprimant TRPV1. Ces terminaisons contactent des neurones des couches I et II. L'information nociceptive TRPV1 est transférée vers les neurones de la couche V par un réseau polysynaptique excitateur. Il n'existe aucune donnée concernant les relations fonctionnelles synaptiques entre la couche II et les couche III-IV dans le traitement de l'information sensorielle provenant des afférences TRPV1.

Objectifs de la thèse

La corne dorsale de moelle épinière (CDME), organisée en couches, constitue le premier relais central des informations sensorielles provenant de la périphérie. Les couches superficielles (I-II) reçoivent principalement des informations nociceptives par des fibres de type A δ et C. Les couches plus profondes, notamment les couches III-IV, sont les cibles de fibres de type A β véhiculant des informations non-nociceptives.

Nous formulons l'hypothèse que l'intégration des messages somato-sensoriels nociceptifs et non-nociceptifs dans la corne dorsale de la moelle épinière met en jeu des interactions entre couches superficielles et couches profondes.

Actuellement peu de choses sont connues sur les réseaux de neurones pouvant participer à de telles interactions, et l'implication des couches III-IV dans le traitement de l'information nociceptive n'a pas été établie.

L'objectif de cette thèse est de mettre en évidence des relations synaptiques fonctionnelles entre la couche II et les couches profondes de la CDME dans le contexte du traitement de l'information nociceptive. Pour cela, des enregistrements électrophysiologiques (patch-clamp), combinés à des applications de capsaïcine qui stimulent sélectivement des neurones des couche II, sur tranches aiguës de moelle épinière de rats âgés de 3 à 4 semaines, permettront de caractériser les interactions synaptiques excitatrices et inhibitrices entre les neurones de la couche II et les neurones des couches profondes de la corne dorsale.

Les neurones qui répondent aux stimulations des fibres TRPV1, sont impliqués dans un réseau du traitement de l'information nociceptive. Pour déterminer si ces neurones peuvent participer à l'intégration d'informations sensorielles véhiculées par d'autres types de fibres, des applications de probénécide ont été faites. Le probénécide active les terminaisons centrales de fibres, exprimant TRPV2 et n'exprimant pas TRPV1, impliquées dans la mécanoeption. Ces expériences permettront de caractériser les réseaux de neurones distincts impliqués dans les traitements de l'information sensorielle véhiculée par les fibres TRPV1 et par les fibres TRPV2. Ces expériences permettront de déterminer l'existence de neurones communs à ces réseaux. Les transmissions inhibitrices GABAergiques et glycinergiques mises en jeu lors du traitement de ces informations sensorielles feront l'objet d'une étude approfondie.

Matériel et Méthodes

I. Animaux et traitements

1. *Animaux utilisés*

Les animaux utilisés pour ce travail de thèse étaient des rats mâles de la souche Sprague-Dawley. Ces animaux sont nés et élevés dans l'animalerie du laboratoire, avec eau et nourriture *ad libitum*, et soumis à une photopériode en deux phases, jour et nuit de 12 heures chacune. Toutes les expérimentations ont été effectuées en conformité avec la législation européenne directive 86/609/CEE du conseil de l'Europe du 24 novembre 1986 en ce qui concerne notre animalerie et avec l'autorisation du ministère français de l'agriculture (Licence numéro 67-107, R. Schlichter). Les animaux utilisés étaient âgés de 17 jours à 30 jours (P17-P30).

2. *Injections*

Pour certaines expériences, des rats ont subi des traitements consistant en des injections de substances par voie sous-cutanée dans les voûtes plantaires des pattes postérieures. Un volume de 50 μL à 100 μL par patte a été injecté grâce à une seringue *Hamilton* ©. Dans d'autres expériences les animaux ont reçu une injection intrathécale d'un volume de 10 μl entre les vertèbres lombaires L5 et L6.

Les injections ont été réalisées sous anesthésie gazeuse à l'isofurane (mélange O_2 (2 bars) à un débit de 0,2 litres/minute avec 3% d'isoflurane). Pour cela, l'animal est placé dans une chambre close où arrive le gaz anesthésiant. Une fois profondément endormi, et afin de permettre l'injection intraplantaire ou intrathécale de substance, le rat est sorti de la chambre et son museau est placé dans un masque par lequel est diffusé le gaz anesthésiant tout au long de l'injection.

Pour induire une inflammation périphérique, les rats ont reçu une injection intraplantaire (3 g / 100ml) de carragénine dans une solution de NaCl à 9%. La carragénine est un polysaccharide sulfaté linéaire, extrait d'algues marines, (carragénine- λ Sigma-Aldrich). L'injection de carragénine induit un œdème des pattes associé à une hyperalgésie thermique au chaud et une allodynie mécanique (Poisbeau et al., 2005). Ce traitement permet de produire un modèle de douleur inflammatoire chez l'animal. Dans le cas des études électrophysiologiques, des injections bilatérales sont effectuées dans les pattes postérieures, et

Tableau 3. Composition en mM du sACSF et de l'ACSF

	sACSF	ACSF
Saccharose	248	-
NaCl	-	126
NaH ₂ PO ₄	1,25	1,25
KCl	2	2,5
CaCl ₂	2	2
MgCl ₂	-	2
MgSO ₄	1,3	-
NaHCO ₃	26	26
Glucose	11	10

les animaux sont sacrifiés 12 heures après les injections afin de préparer les tranches aiguës de moelle épinière.

Pour tester les effets comportementaux de substances activant les afférences primaires (capsaïcine et probénécide), des injections intraplantaires sous-cutanées uni ou bilatérales ont été effectuées dans les pattes postérieures. Les animaux du groupe contrôle ont reçu une injection de la solution d'excipient (NaCl à 9%, TWEEN (40%) à 1%, éthanol absolu 10%). Le probénécide et la capsaïcine ont été préparés à des concentrations de 20 mM et 1 mM respectivement dans de l'excipient juste avant l'injection. Pour les injections intrathécales, les substances utilisées ont été diluées dans une solution de NaCl à 9%. Le pH des solutions injectées a été vérifié et ajusté à 7.3.

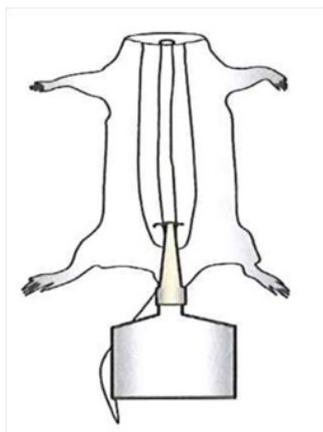
II. Préparation des tranches

Les rats sont anesthésiés par une injection intra-péritonéale de kétamine (75 mg/kg Imalgene) et sacrifiés par décapitation. Le principal problème de la préparation des tranches est l'excitotoxicité glutamatergique due à la libération massive de glutamate par les neurones durant la section du tissu et à l'activation de récepteurs NMDA fortement perméables au Ca^{2+} . Pour limiter l'activation des récepteurs NMDA, la dissection de la moelle épinière et la préparation des tranches sont réalisées dans une solution de saccharose-ACSF (sACSF, ASCF = artificial cerebrospinal fluid (tableau 3)) contenant 2 mM d'acide kynurénique, un antagoniste des récepteurs canaux du glutamate (Sigma). De plus le NaCl cette solution a été remplacé par du saccharose afin d'empêcher la genèse des potentiels d'action et par conséquent la libération synaptique massive de glutamate. Les compositions des solutions sACSF et ACSF sont données dans le tableau 3. Les solutions pour la préparation des tranches sont maintenues à une température comprise entre 1 et 6°C et sont continuellement bullées avec du carbogène (95% O_2 et 5% CO_2) (figure 8).

1. Prélèvement de la moelle épinière

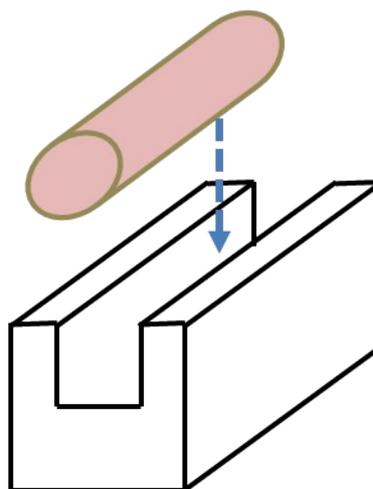
Après décapitation, l'animal est déposé sur une planche de dissection posée sur un tapis de glace. Une incision longitudinale dans la peau du dos depuis la nuque jusqu'à la

1. Prélèvement de la ME



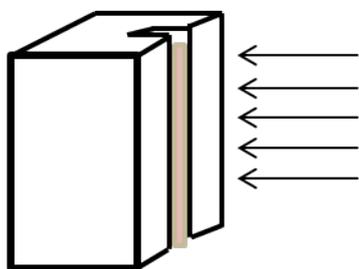
Extrusion hydraulique
sACSF 4°C

2. Inclusion dans l'agarose



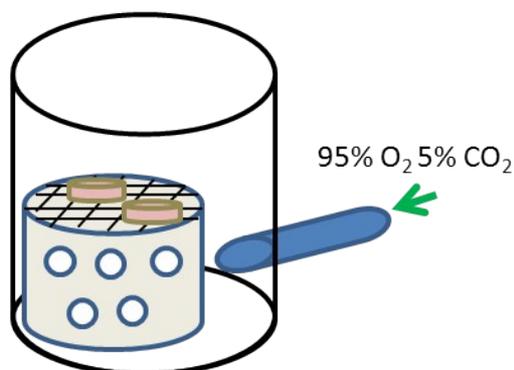
Inclusion du renflement lombaire
de la ME dans un bloc d'agarose (5%)

3. Coupe au vibratome



Section de ME de 600µm

4. Stockage des tranches



Stockage des tranches dans l'ACSF
à température ambiante

Figure 8. Préparation et stockage des tranches aiguës de ME

(1). La ME de rat mâles Sprague-Dawley P17-P26 est prélevée par extrusion hydraulique : une pression hydraulique est exercée dans le canal rachidien pour expulser la ME. (2). La partie lombaire de la ME est placée dans une gouttière d'un bloc d'agarose. (3). Des sections transversales de 600µm d'épaisseur sont réalisées au vibratome puis sont placées (4) dans une chambre de stockage contenant de l'ACSF oxygéné par un mélange 95% O₂/ 5% CO₂ à température ambiante.

région sacrée est réalisée avec un scalpel, puis à l'aide d'une paire de ciseaux, la colonne vertébrale est sectionnée aux niveaux sacré et sous-cervical.

Une seringue de 20 ml contenant 10ml de sACSF (1-6°C) et équipée d'un cône de pipette de 200 µl sectionné afin d'obtenir une ouverture de 2 mm à la pointe, est insérée dans le canal rachidien au niveau sacré (figure 8). L'injection de sACSF grâce à la seringue permet l'extrusion hydraulique de la ME au niveau cervical. La ME est rapidement placée dans une boîte de Pétri remplie de sACSF froid (1-6°C) et maintenue sur de la glace. Les méninges sont ensuite soigneusement retirées à l'aide de pinces à dissection fines. Le renflement lombaire de la ME est prélevé en pratiquant deux sections au scalpel de part et d'autre de ce renflement (figure 8).

2. Préparation des tranches

La partie de la ME prélevée est déposée dans une gouttière réalisée dans un cube d'agarose à 5 % (Euromedex). La largeur de la gouttière est ajustée de manière à assurer le maintien du renflement lombaire sur toute sa longueur sans l'écraser. Le cube d'agarose tenant la ME est collé avec de la superglue sur la platine d'un vibratome (Leica VT 1000 ou Leica VT 1200s). La platine est rapidement déposée dans la cuve du vibratome contenant du sACSF froid (1-6°C). Le tranchage du renflement lombaire est effectué à une fréquence de vibration de la lame de 20 Hz, une vitesse d'avancée de $0.2\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$, et une épaisseur de coupe de $600\mu\text{m}$. Les tranches ainsi obtenues sont stockées sur un filet de nylon, dans une chambre contenant de l'ACSF oxygéné avec un mélange 95% O₂ et 5% CO₂, et conservées à température ambiante pendant au moins 1 heure avant le début des enregistrements électrophysiologiques (figure 8).

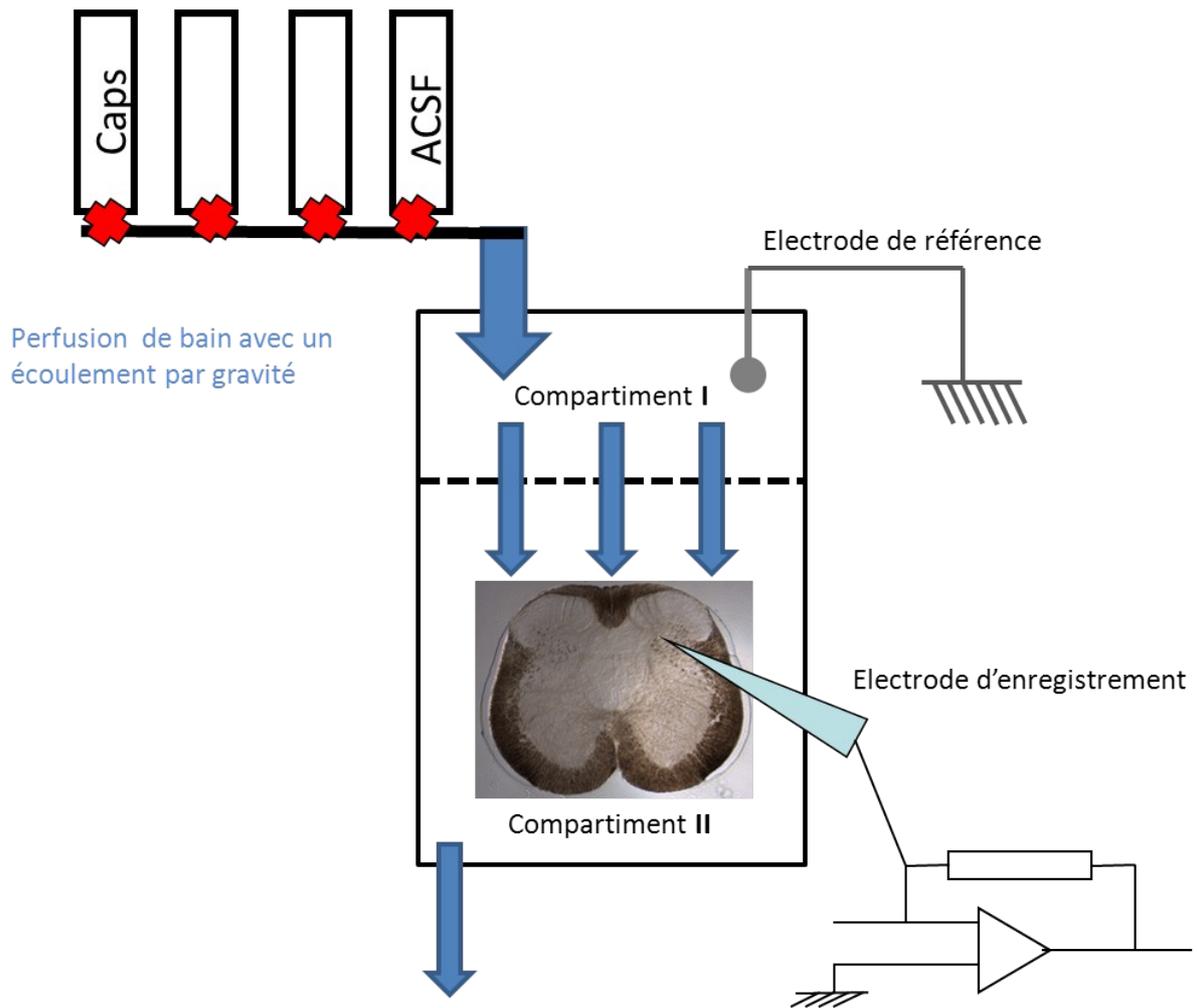


Figure 9. Schéma représentant le dispositif expérimental.

III. Enregistrements électrophysiologiques

Les enregistrements ont été effectués en mode potentiel imposé en utilisant la configuration « cellule entière » de la technique du patch clamp. Les enregistrements ont été effectués à température de $26 \pm 3^\circ\text{C}$

1. *Chambre d'enregistrement*

Pour les enregistrements électrophysiologiques, une tranche de ME est transférée dans une chambre de perfusion à immersion. Cette chambre comprend deux compartiments. Le premier compartiment est le lieu d'arrivée de la solution de perfusion (ACSF) et communique par des petits orifices avec le second compartiment dans lequel se trouve la tranche de ME. La perfusion se fait par gravité et l'évacuation du liquide de perfusion se fait grâce à un papier buvard situé à l'extrémité du second compartiment (figure 9). Dans le premier compartiment se trouve également l'électrode de référence, constituée d'un fil d'argent chloruré immergé dans l'ACSF. La micropipette est positionnée verticalement au-dessus de la zone d'intérêt, par l'intermédiaire d'un micromanipulateur (LEITZ) et sous contrôle visuel grâce à une loupe binoculaire.

2. *Pipettes et milieu intracellulaire*

Les pipettes sont fabriquées à partir de capillaires de borosilicate (diamètre externe = 1,2 mm et diamètre interne = 0,69 mm ; Harvard Apparatus, USA). Les capillaires sont étirés avec une étireuse horizontale à laser (P-200, Sutter Instruments, USA). Les résistances finales des micropipettes, mesurées dans le bain lorsqu'elles sont remplies de milieu intrapipette, sont comprises entre 6 et 8 M Ω .

La composition du milieu intra-pipette était la suivante : Cs₂SO₄ 80 mM, MgCl₂ 2 mM, HEPES 10 mM, Biocytine 10 mM, pH 7,3 ajusté avec du CsOH. L'osmolarité est ajustée à 300±10 mOsm grâce à l'ajout de saccharose.

La présence des ions Cs⁺ permet de bloquer les canaux potassium et par conséquent de réduire le niveau de bruit des enregistrements. Les ions Cs⁺ permettent également d'obtenir des enregistrements stables de courants synaptiques à des potentiels dépolarisés en bloquant les canaux potassium voltage-dépendants qui génèrent des courants sortants soutenus et de forte amplitude (>200 pA) à des potentiels de maintien supérieurs à -40 mV.

Ce milieu intra-pipette a été conçu de manière à pouvoir distinguer facilement les courants postsynaptiques excitateurs (CPSE) et les courants postsynaptiques inhibiteurs (CPSI). En effet, à un potentiel de membrane donné, le sens des courants transmembranaires est défini par le signe de la force efficace : $(E_m - E_{ion})$, où E_m représente le potentiel de membrane et E_{ion} le potentiel d'équilibre de l'ion perméant. Dans nos conditions expérimentales, les conductances cationiques se traduiront par des courants entrants (négatifs) dirigés vers le bas sur les traces des courants enregistrés à un potentiel de maintien (V_h) de -60 mV (force efficace +60 mV). Par contre, en maintenant V_h à 0 mV, la force efficace pour les courants cationiques mixtes (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) est nulle, et la force efficace des ions Cl^- est de +90 mV. Dans ce cas, les courants chlorure qui sous-tendent les CPSI sont sortants (positifs) et dirigés vers le haut.

3. Acquisition et stockage des données

Les enregistrements électrophysiologiques ont été réalisés à l'aide d'un amplificateur Axopatch 200A. Les courants sont filtrés à 5 kHz, numérisés à une fréquence d'échantillonnage de 15 kHz par un convertisseur analogique/numérique TL-one (Axon instruments, Molecular Devices), et enregistrés sur le disque dur d'un ordinateur personnel grâce au logiciel FETCHEX 6 (Axon Instrument, Molecular Devices).

4. Déroulement des enregistrements

Une pression positive est appliquée à l'intérieur de la micropipette pour éviter l'obturation de sa pointe. Un saut de potentiel transitoire de -7 mV d'une durée de 5 ms est appliqué à la pipette, à une fréquence de 50 Hz. Le courant $\Delta I = \Delta V/R$ qui en résulte, est fonction de la résistance (R) de la micropipette. Lors de la descente de la micropipette dans la tranche, le contact de sa pointe avec une membrane cellulaire augmentera sa résistance. Ceci se traduira par une diminution du courant nécessaire pour réaliser le saut de potentiel. A ce moment, la pression positive à l'intérieur de la pipette est relâchée. Puis, une pression négative est appliquée dans la micropipette, ce qui permet un scellement de la membrane cellulaire à la pointe de l'électrode.

Le potentiel de la pipette est ensuite amené de 0 mV à -60 mV ce qui favorise la mise en place d'une jonction à forte résistance mécanique et électrique ($>16 \Omega$) que l'on appelle le giga-seal. Dans nos conditions expérimentales, après établissement du giga-seal, le courant de fuite

$\Delta I = \Delta V/R$ est inférieur à -20 pA, à un V_h de -60 mV. Le scellement de la pointe de la pipette à la membrane représente la configuration « cellule attachée ». On compense alors électriquement grâce à un dispositif interne de l'amplificateur, les courants transitoires capacitifs dus à la pipette. Une aspiration légère, douce et continue, appliquée à l'intérieur de la pipette permet de rompre le fragment de membrane présent sous la pointe de la pipette et de passer de la configuration « cellule attachée » à la configuration « cellule entière ». Ce passage entre les deux configurations se traduit par l'apparition de courants transitoires au début et à l'arrêt du saut de potentiel appliqué à l'électrode.

Ces courants sont dus à la capacité électrique de la membrane cellulaire. Ces transitoires sont également compensés par un dispositif électronique interne à l'amplificateur. La résistance de série indique la qualité de l'accès électrique entre l'électrode et l'intérieur de la cellule. Dans nos conditions expérimentales la valeur de résistance sériée était comprise entre 8 et 50 M Ω . Si ce paramètre change de plus de 20% au cours d'un enregistrement, ce dernier n'est pas retenu pour les analyses. Dans la configuration « cellule entière », le milieu intrapipette dialyse l'intérieur de la cellule. Un délai minimum de 6 minutes, permettant au contenu de la pipette de s'équilibrer avec le milieu intracellulaire, est respecté avant de commencer les enregistrements.

5. Courants postsynaptiques spontanés et miniatures

Les courants postsynaptiques enregistrés dans un neurone sont soit des courants spontanés excitateurs (sCPSE), soit des courants spontanés inhibiteurs (sCPSI). Leur présence indique que le neurone est contacté par des neurones excitateurs et/ou inhibiteurs.

En présence de térodotoxine (TTX 0,5 μ M *Latoxan*), un bloquant de la genèse des potentiels d'actions, dans le milieu extracellulaire, les courants enregistrés sont dit miniatures (mCPSE et mCPSI) et reflètent la libération spontanée de neurotransmetteur en l'absence de potentiels d'action. Ainsi les caractéristiques des courants synaptiques miniatures reflètent l'activité de sites synaptiques uniques individuels.

IV. Méthode d'analyse

Les CPSE et CPSI sont analysés à partir des tracés expérimentaux stockés sous forme digitalisée (voir paragraphe *Acquisition et stockage des données*). Les événements synaptiques sont détectés par le logiciel WinEDR (Dempster, Strathclyde Electrophysiology Software), par la méthode de détection des seuils. La trace est lue par le logiciel, et toute variation supérieure à 2 pA atteinte en au moins 1,25 ms est signalée. La détection est validée *a posteriori* par l'expérimentateur qui décide après inspection visuelle si l'événement détecté correspond à un événement synaptique (front de montée rapide, décroissance exponentielle) avant de le retenir pour l'analyse.

1. Analyse des changements de fréquence

Afin de décider si une substance induit une baisse ou une augmentation des fréquences de sCPSE ou des sCPSI induits, plusieurs critères doivent être pris en compte.

Critère 1

Une variation de fréquence supérieure à 15% doit être observée entre la situation contrôle (CTRL), avant l'application de la substance et la situation test (TEST) suite à l'application de la substance.

Critère 2

Les distributions cumulées des intervalles inter-événements synaptiques (IIE) des périodes CTRL et TEST doivent être significativement différentes. La différence est déterminée par un test de Kolmogorov- Smirnov avec une valeur seuil fixée à 0,01.

Critère 3

Dans le cas de la capsaïcine ou du probénécide qui activent directement des canaux ioniques, les récepteurs TRPV1 et TRPV2, on s'attend à un effet rapide de la substance. Nous avons décidé que les effets de la capsaïcine ou du probénécide sur les changements de fréquences devaient apparaître durant le temps de l'application qui était fixé à 90 secondes. Ce critère a été décidé en nous référant aux délais observés par les effets du kaïnate appliqué dans les mêmes conditions. Le kaïnate active des récepteurs AMPA/kaïnate sans désensibilisation importante. Il permet donc d'estimer le temps de diffusion d'une substance de la surface de la tranche de ME jusqu'au neurone enregistré. L'arrivée du kaïnate au voisinage du neurone enregistré se traduit par l'apparition d'un courant cationique entrant à

un Vh de -60 mV. Dans nos expériences ce délai d'apparition du courant était toujours compris entre 30 et 80 secondes.

2. Estimation de l'apparition de l'effet

Pour quantifier le changement de fréquence suite à l'application de la substance, une représentation cumulée des événements synaptiques au cours du temps est réalisée. (Voir résultats II.1. et figure 16). Cette distribution peut être ajustée par une ou deux droites. Cette méthode d'analyse par régression linéaire consiste à vérifier s'il existe un point où la distribution cumulée des événements change de pente. Ce point doit se situer durant la période d'application (Cf. critère 3). L'équation d'ajustement mise au point se décrit par 4 paramètres :

Pour $t = 0$, à $t = D$: $Y(t) = B + A \times t$ et pour $t > D$: $Y(t) = (B + A \times D) + (C \times (t - D))$

où A et C sont des approximations des fréquences en conditions CTRL et TEST, B est le premier événement à $t = 0$, et D la valeur de t où on observe un changement de fréquence.

3. Test statistiques

- proportions de réponses

Les variations de fréquence détectées suite à l'application d'une drogue ont été classées comme une augmentation ou une diminution. L'absence de variation a été comptabilisée comme « sans changement ». Les proportions de réponse par couche ont été comparées par la méthode d'analyse des tableaux de contingence, en utilisant le test de Fisher.

- fréquences des CPSE et CPSI

Les moyennes de fréquences des CPSE et CPSI enregistrées dans les neurones des différentes couches ont été comparées. Une étude ANOVA et des comparaisons multiples (Test de Tukey) ont été effectuées, en utilisant le logiciel *R version 2.12.0*.

V. Séparation des CPSI GABAergiques et glycinergiques

La séparation des CPSI se base sur des différences de cinétique de désactivation (τ_D) entre les courants GABAergiques et les courants glycinergiques.

Les caractéristiques cinétiques des CPSI ont été analysées avec le logiciel WinWCP (Dempster, Strathclyde Electrophysiology Software), en utilisant la fonction :

$$y(t) = 0,5 \times A \times (1 + \text{erf}((x-x_0) / \text{rise time})) \times \exp(-(x-x_0) / \tau_D)$$

Cette fonction permet de déterminer les paramètres caractéristiques de chaque courant synaptique, à savoir l'amplitude maximale du courant au pic (A), le temps qu'il faut pour arriver à ce pic (rise time (ms)), et la constante de désactivation du courant (τ_D (ms)). Les courants postsynaptiques inhibiteurs CPSI sont dépendants de l'activation de récepteurs canaux du GABA (GABA_A) ou de la glycine. Nos analyses de courants sCSPi isolés pharmacologiquement montrent que les constantes de τ_D des courants spontanés glycinergiques se situent entre un minimum de 2 ms et un maximum de 30 ms, alors que pour les courants spontanés GABAergiques, ils se situent entre 2 et 120 ms (voir résultats partie I.3). Les distributions cumulées des tau-decays issus de ces expériences nous ont permis de définir des critères pour déterminer si un neurone avait des entrées glycinergiques et/ou GABAergiques en fonction de la distribution cumulée de ses τ_D . Cette étude est présentée dans les résultats partie I, paragraphe 4.

VI. Culture de DRG

L'expression des récepteurs TRPV1 et TRPV2 par les neurones sensoriels primaires de rats de P17-P30, ainsi que leurs propriétés fonctionnelles, ont été étudiées sur des cultures de neurones de ganglions rachidiens lombaires (DRG) en utilisant une technique d'imagerie du calcium libre intracellulaire.

Dissection

Les rats (P20-25) sont anesthésiés par une injection intra-péritonéale de kétamine (75 mg/kg *Imalgene*) et sacrifiés par décapitation. Après décapitation, l'animal est déposé sur une planche de dissection maintenue sur un tapis de glace. Une incision longitudinale dans la peau du dos depuis la nuque jusqu'au niveau sacré au scalpel est réalisée, puis à l'aide d'un ciseau, la ME est sectionnée au niveau sacré et sous-cervical. Deux sections longitudinales à l'aide d'un ciseau de part et d'autre de la colonne vertébrale sont effectuées, afin de prélever la

colonne vertébrale. La pièce prélevée est directement plongée dans un bécher de 200 mL contenant un tampon salin sans ions divalents (T-DRG) (NaCl 127 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 4,3 mM, KH₂HPO₄ 1,5 mM pH = 7,3) préalablement réfrigérée (1-4°C). La colonne vertébrale est ensuite sectionnée horizontalement de chaque côté, en remontant du niveau lombaire vers le niveau cervical. La ME est retirée afin de dégager les ganglions rachidiens, logés dans les foramens de conjugaison.

Les ganglions rachidiens sont prélevés avec des pinces fines, transférés dans une solution T-DRG maintenue sur de la glace pilée, puis nettoyés de leurs racines. Les racines et les nerfs sont sectionnés de part et d'autre du ganglion rachidien à l'aide d'un ciseau de microdissection.

Dissociation

Les DRG sont collectés dans un tube *flacon*® de 15 ml dans 2 ml de solution T-DRG contenant en plus 10 mg de *dispase* (Invitrogen) et 4 mg de *collagénase de type 1A* (Invitrogen) pour y subir une dissociation enzymatique au bain-marie à 37°C pendant 10 à 25 minutes. Toutes les 90 s le tube contenant les ganglions est agité. Dès que la solution de T-DRG devient trouble, la réaction est arrêtée. Pour arrêter la dissociation enzymatique, le tube est centrifugé (3 minutes à 300 rpm), le surnageant est retiré, et 2 mL de milieu de culture (MC), préalablement porté à 37°C, est ajouté. Le MC se compose de MEM α (Minimum essential medium alpha sans ribonucleotides et sans déoxyribonucléoside GIBCO) auquel on a ajouté 10% de sérum de cheval (GIBCO) et 2% d'une solution pénicilline/streptomycine (3 μ g/ml pénicilline et 5000 μ g/ml streptomycine, GIBCO).

Des triturations mécaniques sont effectuées à l'aide d'une pipette Pasteur rodée à la flamme afin de réaliser la dissociation mécanique des DRG. Suite à cette étape, le tube est centrifugé (5 minutes à 800 rpm), le surnageant est retiré et du MC est ajouté. Le volume de MC ajouté correspond à 200 μ L pour 3 DRG dissociés. La suspension cellulaire obtenue est mise en culture.

Boîtes de culture

Des boîtes de culture de 35 mm de diamètre ont été percées en leur fonds d'un trou circulaire de 1,2 cm de diamètre. Une lamelle couvre-objet de verre circulaire de 0,17 mm d'épaisseur est collée sur la face inférieure à l'aide d'un élastomère de silicone bi-composant réticulant (Rhodorsil RTV-2, Rhône-Poulenc). Ce fond de verre forme un puits et permet

l'utilisation d'objectifs à immersion à huile, à faible distance de travail, pour l'observation en fluorescence. Les boîtes ainsi montées sont nettoyées à l'alcool 70%, puis traitées pendant 15 min par des UV sous une hotte à flux laminaire pour les stériliser. Une goutte de 200 μ l d'une solution de poly-D-lysine stérile à 0,02 mg/mL dans du tampon borate (acide borique 0,1 mM, ajusté à pH 8,4 avec NaOH) est déposée sur la lamelle de verre centrale. La poly-D-lysine (SIGMA) est utilisée pour faciliter l'adhésion des cellules à la surface du verre. Les boîtes sont placées à l'incubateur pendant 24 h. Avant l'ensemencement des cellules, les boîtes sont rincées 5 fois avec de l'eau stérile et une fois avec du milieu de culture.

Mise en culture

La mise en culture se fait dans les puits des boîtes de culture. 200 μ L de la solution contenant les cellules sont déposées dans le puits central. Après 2 heures à l'incubateur à 37°C, dans une atmosphère de 95% d'air et 5% de CO₂, 2 mL de MC sont ajoutés. 24 heures après l'ensemencement les cultures peuvent être utilisées pour les expériences d'imagerie.

VII. Imagerie calcium

1. Introduction de la sonde dans les cellules

Les changements de la concentration intracellulaire de calcium libre, ($[Ca^{2+}]_i$), ont été déterminés à l'aide de la sonde fluorescente ratiométrique Fura-2, dont la fluorescence F (mesurée à 520 nm) augmente après excitation à 350 nm lorsque $[Ca^{2+}]_i$ augmente, alors qu'elle diminue après excitation à 380 nm. Le rapport R, égal à F_{350} / F_{380} , constitue un index de $[Ca^{2+}]_i$ qui est indépendant de la concentration de la sonde Fura-2 dans la cellule. La sonde a été introduite dans les cellules sous forme d'un précurseur acétoxy-méthyl estérifié liposoluble, le Fura-2-AM (F-1201, Molecular Probes, USA). Avant utilisation, cette forme inactive de Fura-2 est conservée à -20°C sous forme de solution stock à 1 mM dans du DMSO.

Après élimination du milieu de culture et 2-3 rinçages avec la solution extracellulaire d'enregistrement, les cellules sont incubées pendant 1 heure à l'obscurité et à température ambiante dans 1 mL de solution extracellulaire contenant 3 μ L de Fura-2-AM et 3 μ L d'acide pluronique (Pluronic F127 ; Molecular Probes). L'acide pluronique (solubilisé à 200 g/L dans

du diméthyl suloxide 99,5% (DMSO Sigma)) est un détergent facilitant la dispersion du Fura-2-AM hydrophobe.

La durée d'incubation avec le Fura2-AM a été limitée à une heure afin d'obtenir une fluorescence optimale, sans pour autant avoir une concentration intracellulaire de sonde trop élevée, ce qui pourrait induire un effet tampon qui limiterait l'amplitude des variations de $[Ca^{2+}]_i$.

2. Le poste d'imagerie

Le poste d'acquisition (Fig. 3) comprend un microscope inversé à épi-fluorescence (Axiovert 35, Zeiss), équipé d'un objectif à immersion à huile (Fluor 40 / 1,30 oil, Nikon) de grossissement x40 et d'ouverture numérique 1,30. La lumière excitatrice est fournie par une source (Müller Elektronik-Optik, Allemagne) équipée d'une ampoule à xénon de 150 W sans ozone (XBO 150W OFR, OSRAM). Les longueurs d'onde d'excitation à 350 et 380 nm sont obtenues avec des filtres interférentiels placés entre la source lumineuse et l'entrée de l'épi-illuminateur du microscope, dans une roue porte-filtres à 10 positions (Lambda 10-2, Sutter Instruments, USA). Les changements de position de la roue peuvent être commandés manuellement ou par l'ordinateur utilisé pour l'acquisition des données.

Le pic d'émission du Fura-2 se situant entre 510 et 530 nm, un bloc filtre FITC standard, avec un miroir dichroïque à 510 nm, est utilisé sans son filtre d'excitation d'origine. Le filtre d'émission passe-haut (longpass LP 520) permet de conserver un maximum de lumière collectée. Les photons de fluorescence sont captés par une caméra CCD numérique (CoolSNAP HQ, Photometrics), refroidie à $-30^{\circ}C$. La résolution spatiale est de 1392 x 1038 pixels, et la numérisation se fait sur 12 bits, soit 4096 niveaux de gris.

3. Acquisition et analyse des images

L'acquisition et l'analyse des images sont effectuées avec le logiciel Imaging Workbench 4.0 (Axon Instruments). L'acquisition consiste en une série de prises d'images après excitation alternative à 350 et à 380 nm. A chaque cycle, le logiciel calcule et affiche une image du rapport R, pixel à pixel, des intensités de fluorescence mesurées au-dessus de 520 nm (à cause du filtre passe-haut LP 520 et de de toute façon le Fura-2 émet vers 510-530 nm), après excitation à 350 et 380 nm, (F_{350} et F_{380}). Chaque cycle est répété toutes les 2 secondes (ou 12

secondes pendant les phases de récupération). La fréquence d'acquisition à 0,5 Hz limite la durée d'exposition pour chaque image. Pour avoir un signal de niveau suffisant, les pixels sont regroupés 3 par 3 (*binning* 3x3), ce qui donne des images de 464 x 346 pixels. Avec l'objectif x40, la résolution spatiale est alors de 2,19 pixels/ μm .

Des régions d'intérêt (ROI) sont sélectionnées manuellement. Le logiciel enregistre l'évolution, en fonction du temps, de la moyenne spatiale de F_{350} , F_{380} et R pour chaque ROI (Fig. 4). Chaque champ enregistré est ré-analysé a posteriori, après soustraction du bruit de fond, déterminé sur une zone ne comprenant aucun objet. Au début et à la fin de chaque enregistrement, une photographie du champ enregistré est prise en microscopie à fond clair. La valeur de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ peut être calculée grâce à la formule de (Grynkiewicz et al., 1985):

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \cdot \beta \cdot (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

où K_d est la constante de dissociation de Fura-2 et Ca^{2+} ; R_{\min} et R_{\max} sont les valeurs extrêmes de R, obtenues respectivement en absence de Ca^{2+} et en conditions de Ca^{2+} saturantes; β est égal au rapport $F_{380, \min} / F_{380, \max}$, des fluorescences mesurées à 380 nm dans les conditions de mesure de R_{\min} et R_{\max} respectivement. Dans notre étude, les résultats sont présentés sous la forme du rapport R, les valeurs *in situ* de K_d , β , R_{\min} et R_{\max} n'ayant pas été déterminées.

4. Application des solutions

Le champ enregistré est soumis à une perfusion locale de milieu extracellulaire grâce un dispositif à 13 voies convergeant vers un tube de sortie unique (\varnothing_{int} 0,4 mm) placé à l'aide d'un micromanipulateur à environ 100 μm des cellules enregistrées. Chaque voie est reliée à un réservoir de solution, dont la libération est contrôlée par une vanne manuelle et l'écoulement des solutions se fait par gravité. Dans la boîte contenant les cellules, le milieu extracellulaire est par ailleurs renouvelé en permanence, le niveau étant maintenu constant par un système d'aspiration.

5. Analyse des réponses

Dans l'analyse a posteriori chaque ROI possède une valeur de R pour chaque cycle d'acquisition. L'ensemble des valeurs de R est reporté dans un tableau, et les pics des réponses éventuelles consécutives à une stimulation sont déterminés. Certains critères ont été

établis pour déterminer si un changement ΔR de la valeur de R d'une cellule est bien une réponse au stimulus appliqué.

Le changement ΔR doit bien provenir de la cellule observée, et non pas d'une contamination de fluorescence par une cellule voisine présentant une forte réponse. Cela se détermine au cas par cas, en observant l'étalement de fluorescence sur l'image des rapports.

Un seuil de sélection pour la valeur R est déterminé en vérifiant si, pour une cellule donnée, ΔR ressort du bruit de fond par rapport à la ligne de base de la cellule correspondante et s'écarte clairement des valeurs de ΔR pour les autres cellules. Ce seuil correspond à une valeur minimum au moins égale à quatre fois la valeur de l'écart-type associé à la moyenne ΔR établie 10 secondes avant l'application d'une substance. Ce seuil est ensuite ajusté manuellement suite à un contrôle visuel de l'expérimentateur.

VIII. Test comportementaux

Afin d'évaluer les effets comportementaux de l'activation des récepteurs TRPV1 et TRPV2, des rats mâles (P19-29) ont reçus des injections sous-cutanées intraplantaires ou intrathécales (IT) de capsaïcine ou de probénécide. Ces animaux ont été utilisés dans le test de la plaque chaude et le test des filaments de Von Frey afin d'évaluer respectivement leur sensibilité à des stimulus thermiques au chaud ou à des stimulus mécaniques.

L'ensemble des animaux utilisés a été familiarisé avec l'environnement expérimental des différents tests durant une période d'habituation de 5 jours avant les premières mesures. Les animaux sont mis chaque jour dans les dispositifs des différents tests pendant 15 minutes : 15 minutes dans la cage de Von Frey puis 15 minutes sur la plaque chaude laissée à température ambiante. A l'issue de la période d'habituation, soit 3 jours avant les injections, des mesures de la sensibilité thermique et de la sensibilité mécanique sont effectuées afin d'établir les seuils de base des réponses aux stimulus thermiques chauds et mécaniques.

1. Evaluation de la sensibilité nociceptive thermique

Les animaux sont posés sur une plaque chaude (50°C ou 55°C). Le temps qui s'écoule entre le dépôt et jusqu'à l'apparition d'un comportement de léchage ou d'un saut, est mesuré en secondes. Suite à la manifestation d'un de ces comportements, l'animal est retiré de la

plaque. Ce temps est considéré comme un temps de « latence contrôle » de retrait et a été déterminé 72 heures avant les séances de test d'injection d'une substance pharmacologique. Les animaux injectés ont été testés 20 minutes après leur réveil, pour déterminer un temps de latence « après injection ».

Les moyennes des temps de latence « contrôle » et « après injection » des différents groupes expérimentaux ont été comparées avec un test non-paramétrique apparié de Wilcoxon. Une diminution significative du temps de latence suite à un traitement est considérée comme la manifestation d'une hyperalgésie thermique.

2. Evaluation de la sensibilité nociceptive mécanique

Les animaux sont déposés dans une enceinte en plexiglass (8x8x10 cm), reposant sur une grille en métal. La sensibilité mécanique des pattes de chaque rat est évaluée en appliquant une pression calibrée (en gramme) sur les voûtes plantaires des pattes postérieures grâce à des filaments de Von Frey de différents calibres. La pression exercée augmente avec des valeurs calibrées des filaments appliqués. Si pour un filament donné, l'animal retire sa patte au moins 3 fois sur 5 applications, et qu'au filament supérieur au moins 3 réponses sur 5 sont à nouveau observées, le seuil de retrait est considéré comme correspondant au grammage du premier filament. Une valeur de seuil de base a été déterminée pour chaque animal et le même test a été réalisé après l'injection de la substance à tester, 15 minutes après le réveil de l'animal suite à l'anesthésie. Une réduction significative de la valeur du seuil de réponse suite à un traitement est interprétée comme la mise en place d'une hyperalgésie ou d'une allodynie mécanique.

3. Groupe d'animaux

Dans le cas des injections IT, trois groupes d'animaux ont été constitués. Chaque groupe a reçu une injection IT d'un volume de 10 µL. Les solutions d'excipient, de capsaïcine (50 µM) et de probénécide (20 mM) sont injectées. Chaque groupe comprend au minimum 5 individus. La solution d'excipient comprend du NaCl à 9‰ avec 1% éthanol absolu et 1% NaOH, ajusté à un pH de 7,3. Les solutions de capsaïcine et de probénécide sont préparées avec de la solution d'excipient.

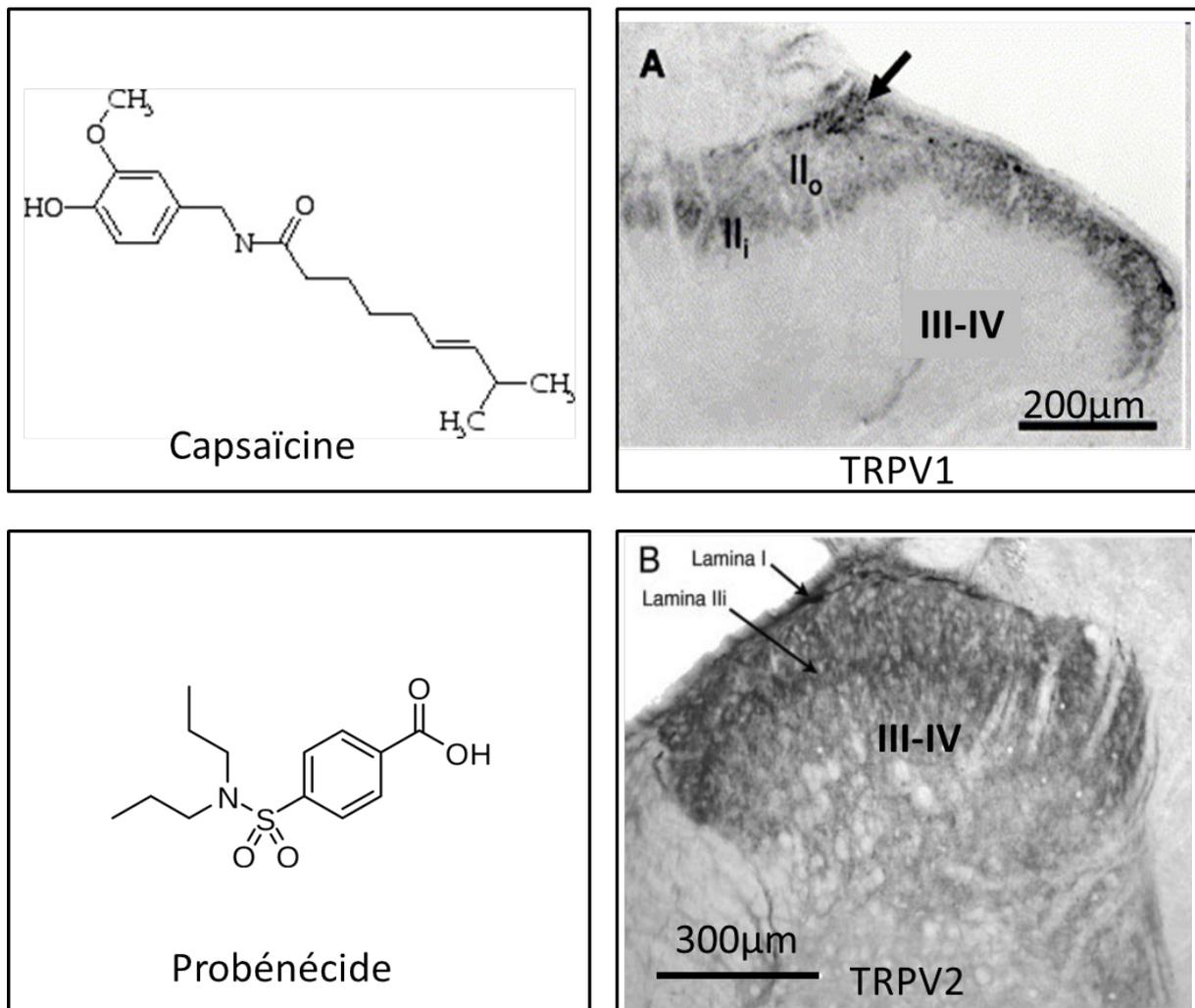


Figure 10. Stratégie expérimentale de stimulation des afférences sensorielles primaires exprimant TRPV1 ou TRPV2

Pour activer sélectivement les terminaisons centrales des afférences sensorielles primaires (ASP) qui expriment le récepteur TRPV1, on applique par bain une solution de capsaïcine (5µM 90s), (colonne de droite, haut : formule de la capsaïcine). Pour activer sélectivement les terminaisons centrales des ASP qui expriment le récepteur TRPV2 on réalise une application par bain de probénécide (500µM 90s), (colonne de droite, bas : formule du probénécide).

Résultats d'immunohistomarquages des canaux TRPV1 et TRPV2 révélés par la technique avidine-biotine peroxydase. Le marquage TRPV1 est important au niveau des couches I et II de la CDME, et plus particulièrement au niveau de la couche II interne (colonne de gauche, haut : Lamina II_i d'après Doly et al., 2004). Le marquage TRPV2 est présent au niveau des couches I-IV de la CDME. Ce marquage se distingue de celui de TRPV1 par le fait qu'il est présent dans les couches III-IV de la CDME (colonne de gauche, droite : d'après Lewinter et al., 2004).

XI. Stratégie de stimulation pharmacologique

Dans le but de stimuler les terminaisons centrales d'afférences nociceptives particulières nous avons retenu une stratégie de stimulation pharmacologique. Cette stimulation utilise des agonistes de canaux spécifiquement exprimés par des sous-types de fibres nociceptives (figure 10).

1. Cas de capsaïcine

Le récepteur vanilloïde de type 1 (TRPV1) est un canal ionotropique, perméable aux cations, qui a pour fonction d'être sensible aux chaleurs supérieures à 43°C, aux protons et à ses ligands endogènes (Caterina et al., 1999). TRPV1 est exprimé par une sous-population de neurones sensoriels afférents, qui ont un corps cellulaire de petit diamètre, (neurones A δ et C). TRPV1 est exprimé au niveau des terminaisons périphériques et centrales de ces neurones. L'activation de TRPV1 est impliquée dans la détection des chaleurs nociceptives, et dans la mise en place de phénomènes d'hyperalgésie et d'allodynie. Dans la CDME, les fibres afférentes exprimant TRPV1, contactent des neurones de la couche II (Guo et al., 1999; Doly et al., 2004). L'activation des TRPV1, sur les terminaisons centrales des afférences nociceptives, va induire la libération de glutamate et exciter les neurones de la couche II. Dans les tranches aiguës de ME utilisées, ces afférences demeurent fonctionnelles et sont stimulables par l'application de capsaïcine (5 μ M pendant 90 s, SIGMA) (Nakatsuka et al., 2002). Les changements de fréquences des CPSE et CPSI observés, sont reproductibles lors d'une seconde application, après un délai de 25 minutes (Nakatsuka et al., 2002; Ferrini et al., 2007). L'application de capsaïcine permet donc de stimuler spécifiquement une sous-population de neurones de la couche II.

2. Cas du probénécide

Le récepteur vanilloïde de type 2 (TRPV2) est un canal ionotropique, perméable aux cations. TRPV2 est exprimé par une sous-population de neurones sensoriels ayant des axones myélinisés, et un corps cellulaire de taille moyenne ou grande (neurones A δ et A β). TRPV2 est exprimé au niveau des terminaisons périphériques et centrales de ces neurones. Chez le rat, ce récepteur est exprimé par des afférences primaires différentes de celles qui expriment TRPV1, et réalise des contacts synaptiques dans les couches I – III et III-IV de la CDME (Lewinter et al., 2004). Les fonctions physiologiques de TRPV2 ne sont pas encore bien

définies. Ce récepteur semble être activé par des températures supérieures à 52°C, et être impliqué dans la détection de stimulus mécaniques non-nociceptifs et nociceptifs (Lawson et al., 2008). Le probénécide a été décrit comme un agoniste spécifique du TRPV2, par rapport aux autres récepteurs TRP présents sur les afférences primaires et aussi par rapport à des agonistes non spécifiques tels que le delta9-tetrahydrocannabinol (THC) et le 2-aminoethoxydiphényle borate (2AP) (Bang et al., 2007). L'application de probénécide (500 µM pendant 90 s, SIGMA), va permettre de stimuler des terminaisons centrales d'afférences primaires myélinisées n'exprimant pas TRPV1, terminant dans les couches III-IV de la CDME.

Résultats

Des enregistrements électrophysiologiques de neurones des couches II, III-IV et V de la CDME ont été réalisés en utilisant la technique de patch clamp en configuration cellule entière en mode potentiel imposé. Les changements de fréquence des courants postsynaptiques excitateurs (CPSE) et inhibiteurs (CPSI) ont été analysés suite à l'application par bain de capsaïcine (5 μ M, 90 s) ou de probénécide (500 μ M, 90 s) dans différentes conditions expérimentales.

Dans une première partie nous exposerons les caractéristiques des CPSE et des CPSI. Dans cette partie nous développerons aussi les critères de sélection du type de sCPSI (GABAergique ou glycinergique) que recevait un neurone. Dans une deuxième partie nous présenterons l'ensemble des effets obtenus suite à l'application de capsaïcine. Enfin dans une troisième partie, nous présenterons la caractérisation des effets obtenus suite à l'activation des récepteurs TRPV2 par le probénécide, ainsi que les résultats comportementaux associés aux expériences d'injections intrathécales de probénécide et de capsaïcine.

I. Caractérisation des transmissions synaptiques dans les couches II, III-IV et V de la corne dorsale

Nous avons dans un premier temps caractérisé les transmissions synaptiques, excitatrices et inhibitrices, observées dans les différentes couches de la corne dorsale de la moelle épinière (CDME). Les fréquences de base des CPSE et CPSI, spontanés et miniatures ont été étudiées pour les couches II, III-IV et V. Les transmissions inhibitrices rapides spontanées GABAergiques (sCPSI-GABA) et glycinergiques (sCPSI-glycine) isolées pharmacologiquement ont été caractérisées afin de développer une méthode d'analyse permettant de déterminer la fraction de sCPSI GABA et sCPSI glycine que recevait un neurone enregistré en l'absence de bloquant pharmacologique des transmissions inhibitrices.

1. Analyse des fréquences de base des CPSE et des CPSI spontanés et miniatures

Des enregistrements de courants postsynaptiques excitateurs (CPSE) ou inhibiteurs (CPSI) ont été effectués dans les différentes couches de la corne dorsale de la moelle épinière (II à V). Il s'agissait soit de courants spontanés (enregistrés en absence de tétrodotoxine), soit de courants miniatures (enregistrés en présence de TTX 0,5 μ M). Les valeurs des fréquences de

Tableau 4. Fréquence de base (Hz) des courants postsynaptiques.

Courants	Couches	Spontanés	Miniatures
CPSE	II	1,27 ± 1,09 (28)	0,99 ± 1,21 (13)
CPSE	III-IV	3,03 ± 2,61 (20)	2,09 ± 1,98 (14)
CPSE	V	3,38 ± 2,50 (12)	1,74 ± 1,48 (10)
CPSI	II	1,00 ± 1,51 (35)	0,54 ± 0,58 (11)
CPSI	III-IV	2,00 ± 3,21 (29)	0,30 ± 0,31 (10)
CPSI	V	6,82 ± 7,72 (33)	0,87 ± 1,38 (7)

Fréquence moyenne (\pm écart-type, nombre de neurones enregistrés) des courants synaptiques excitateurs (CPSE) et inhibiteurs (CPSI), spontanés ou miniatures, enregistrés dans les couches II, III-IV et V de la corne dorsale de la moelle épinière.

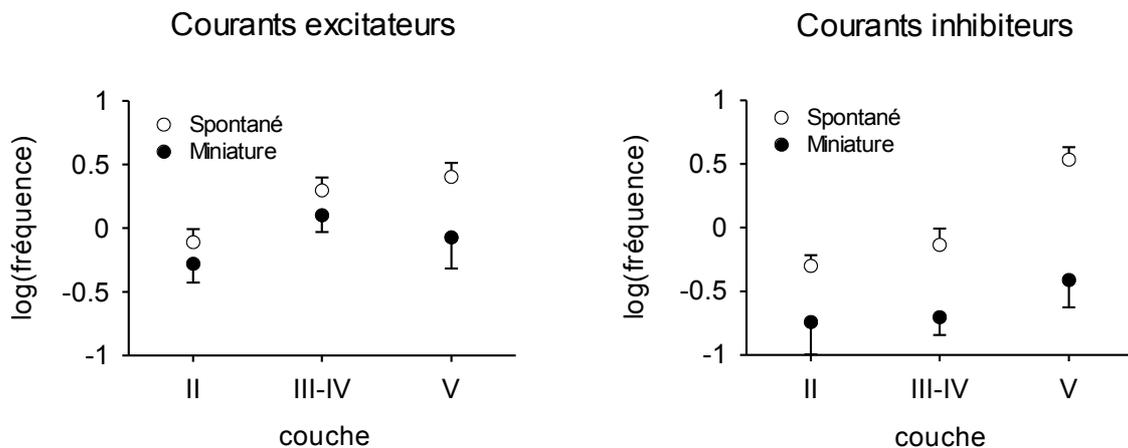


Figure 11. Fréquence de base des courants postsynaptiques.

Pour les courants excitateurs comme pour les courants inhibiteurs, dans toutes les couches de la corne dorsale, la fréquence des courants spontanés (○) est significativement supérieure à celle des courants miniatures (●) enregistrés dans les couches II, III-IV et V. Chaque symbole représente la moyenne du logarithme de la fréquence enregistrée (Hz); la barre d'erreur associée correspond à l'erreur-type.

ces courants sont résumées dans le tableau 4 et dans la figure 11. L'effet des différentes situations (*couche* II, III-IV ou V; *type* de transmission, excitatrice ou inhibitrice; *condition* d'enregistrement, courant spontané ou miniature) a été analysé. Les valeurs de fréquence s'avérant ne pas être distribuées selon une loi normale, une transformation logarithmique a été utilisée (\log_{10}) et l'analyse statistique a été faite sur le logarithme des fréquences.

L'analyse des fréquences des CPSE montre un effet significatif des facteurs *Condition* ($F_{1, 91} = 5.06, p = 0.027$) et *Couche* ($F_{2, 91} = 6.48, p = 0.002$), mais pas de leur interaction ($F_{1, 91} = 0.63, p = 0.534$). Ce résultat indique que les fréquences moyennes des sCPSE sont plus élevées que les fréquences des mCPSE. Les fréquences des sCPSE et mCPSE de la couche II sont plus faibles que les fréquences des sCPSE et mCPSE des couches III-IV et V.

De même, l'analyse des fréquences de base des CPSI montre un effet significatif des facteurs *Condition* ($F_{1, 119} = 23.40, p < 0.0001$) et *Couche* ($F_{2, 119} = 17.76, p < 0.0001$), mais pas de leur interaction ($F_{2, 119} = 1.26, p = 0.287$). Ainsi les fréquences de base des sCPSI sont significativement plus élevées que les fréquences de base des mCPSI (Test de Tukey, $p < 0.0001$). Les fréquences des CPSI spontanés et miniatures sont plus élevées dans la couche V que dans la couche II ($p < 0.0001$) et dans la couche III-IV ($p < 0.0001$). Les fréquences des mCPSI de chaque couche sont similaires.

Conclusion

Les différentes couches de la CDME se caractérisent par des différences significatives dans les fréquences des courants postsynaptiques excitateurs et inhibiteurs. Toutes ces fréquences sont significativement plus basses en présence de TTX. La couche II se caractérise par des fréquences de CPSE plus faibles que dans les autres couches. La couche V se caractérise par une fréquence élevée des sCPSI. La fréquence des sCPSE est environ 1,2 fois plus élevée que celle des sCPSI dans la couche II, et 1,5 fois dans les couches III-IV. Ce rapport supérieur à 1 suggère une dominance de la transmission excitatrice. Dans la couche V, le rapport est de 0,45, ce qui traduit une dominance de la transmission inhibitrice dans les conditions basales.

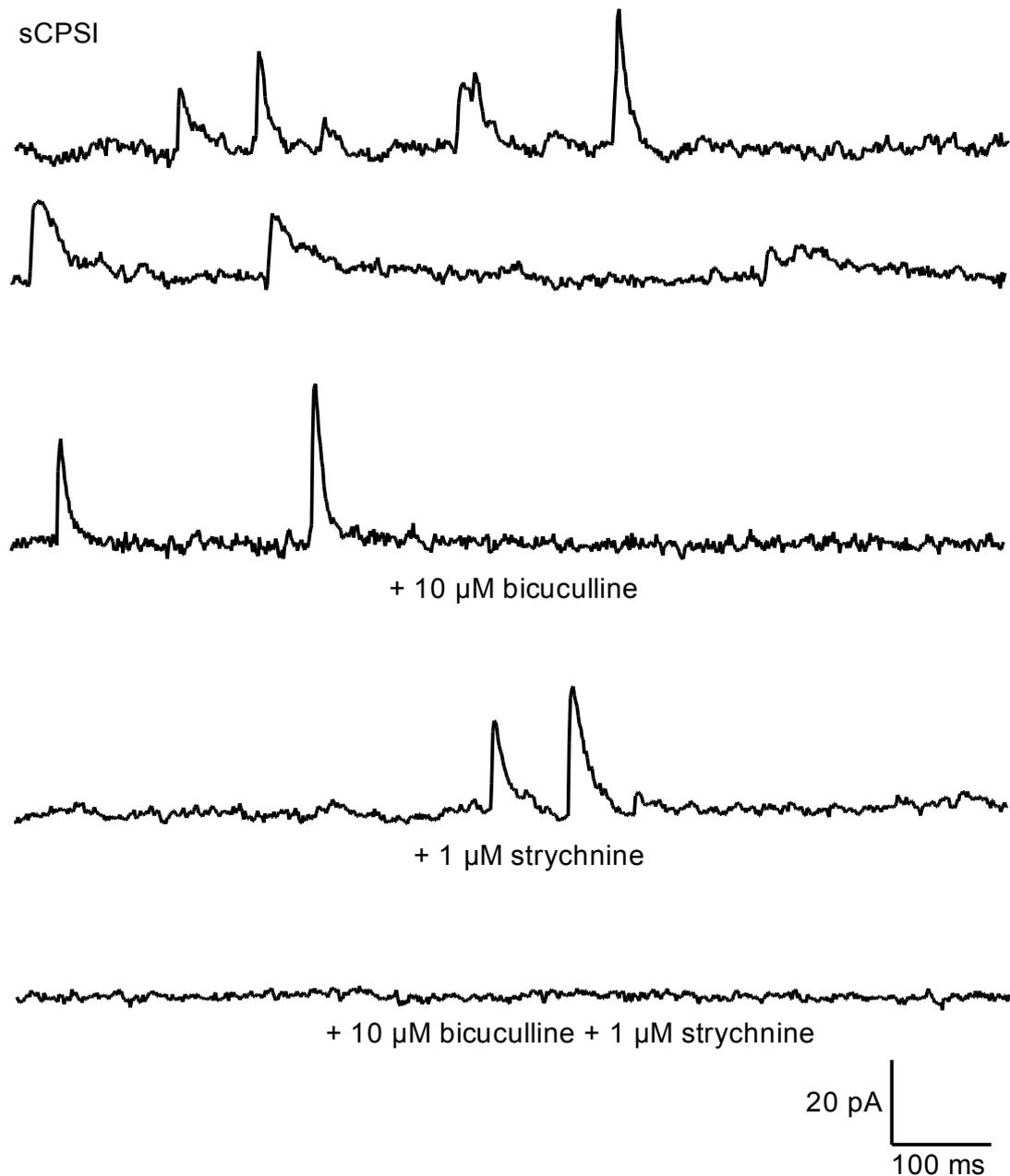


Figure 12. Caractérisation pharmacologique des transmissions inhibitrices. Deux populations distinctes de sCPSI ont été détectées dans les neurones de la CDME. Courants synaptiques inhibiteurs spontanés (sCPSI) enregistrés dans un neurone des couches III-IV, en situation contrôle (sCPSI) ou en présence de bicuculline (10 μ m), ou en présence de strychnine (1 μ M), ou en présence des deux antagonistes.

2. Caractérisation pharmacologique et cinétique

Transmission synaptique excitatrice

Les courants postsynaptiques excitateurs (sCPSE et mCPSE) ont été enregistrés à un potentiel de maintien de -60 mV. L'ensemble des courants observés dépendait de l'activation de récepteurs AMPA/kainate ou NMDA du glutamate. En effet dans tous les neurones où cela a été testé (8/8), les sCPSE étaient bloqués en présence de 10 μ M de CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione) et de 50 μ M de AP5 ((2R)-amino-5-phosphono-pentanoate) ou d'acide kynurénique dans la perfusion de bain.

Transmission inhibitrice

Les neurones inhibiteurs de la corne dorsale de la moelle épinière sont GABAergiques et/ou glycinergiques. Les corps cellulaires des neurones GABAergiques sont présents dans toutes les couches de la CDME, mais ils sont localisés en majorité dans les couches superficielles (couches I-III). De manière intéressante, les corps cellulaires des interneurons glycinergiques se trouvent quant à eux principalement dans les couches plus profondes (III à V) (Mackie et al., 2003; Hossaini et al., 2007).

Les transmissions inhibitrices ont été caractérisées pharmacologiquement (figure 12). Chaque événement synaptique inhibiteur a été caractérisé par la valeur de la constante de temps, τ_D (ms), de la cinétique de désactivation du CPSI (tableau 5). Il est à noter que, pour différentes raisons, cette analyse cinétique n'a pas pu être faite pour tous les événements comptabilisés dans le calcul de la fréquence (par exemple lors de fréquences élevées il existe des sommations d'événements pour lesquels il est impossible de déterminer les τ_D).

- Transmission glycinergique :

Les courants spontanés glycinergiques (sCPSI-glycine) sont enregistrés de manière isolée à un potentiel de 0 mV et en présence de 10 μ M de bicuculline, un antagoniste des récepteurs GABA_A. L'analyse cinétique a été faite sur 673 événements issus de 8 neurones enregistrés dans la couche II, et sur 1283 événements issus de 10 neurones enregistrés dans les couches III-IV. Dans la couche II, la moyenne des τ_D des sCPSI-glycine est de $10,2 \pm 0,1$ ms (avec un minimum de 2,1 ms et un maximum de 29,9 ms). La moyenne des τ_D de la couche III-IV est de $7,5 \pm 0,1$ ms (avec un minimum de 1,4 ms et un maximum de 17,8 ms). Ces deux moyennes sont significativement différentes (test de Mann-Whitney

Tableau 5. Constante de temps de désactivation, τ_D (ms), des courants postsynaptiques inhibiteurs spontanés (CPSIs) isolés pharmacologiquement.

<i>Transmission</i>	<i>Bloquant</i>	<i>Couche</i>	τ_D (ms)	<i>Min</i>	<i>Max</i>	<i>N</i>
Glycine	Bicuculline	II	10,2 ± 0,1 (8)	2,1	29,9	673
Glycine	Bicuculline	III-IV	7,5 ± 0,1 (10)	1,4	17,8	1283
GABA	Strychnine	II	35,4 ± 14,6 (10)	2,1	116,3	709
GABA	Strychnine	III-IV	26,3 ± 7,7 (7)	2,8	74,3	429
GABA	PMBA	II	43,7 ± 9,6 (4)	12,3	89,9	34
GABA	PMBA	III-IV	21,4 ± 10,4 (8)	3,2	78,2	233

Moyenne ± écart-type (nombre de neurones). N : nombre total d'évènements.

Min, Max : valeurs minimales et maximales de τ_D .

Tableau 6. Propriétés des distributions cumulées des valeurs de τ_D .

<i>Transmission</i>	<i>Couche</i>	<i>n</i>	<i>Centile 90%</i>	<i>Centile 50%</i>	<i>Centile 10%</i>
Glycine	II	8	15,2 ± 0,7	9,5 ± 0,3	6,3 ± 0,1
Glycine	III-IV	10	9,2 ± 0,2	7,0 ± 0,1	4,7 ± 0,1
GABA <i>rapide</i>	II	5	31,9 ± 0,7	21,9 ± 0,3	13,3 ± 0,2
GABA <i>rapide</i>	III-IV	10	29,6 ± 1,7	17,6 ± 0,5	10,3 ± 0,4
GABA <i>lent</i>	II	7	73,8 ± 2,2	43,9 ± 0,9	26,6 ± 1,3
GABA <i>lent</i>	III-IV	4	49,0 ± 1,4	33,0 ± 0,4	19,9 ± 0,2

Moyenne ± écart-type des centiles 90%, 50% et 10%. n : nombre de neurones.

(MW), $p < 0.001$). La comparaison des deux distributions cumulées des τ_D pour chaque couche conduit à la même conclusion (test de Kolmogorov-Smirnov (KS), $p < 0.001$).

- Transmission GABAergique :

La caractérisation des courants spontanés GABAergiques (sCPSI-GABA) a été effectuée à un potentiel de maintien de 0 mV en présence de strychnine (1 μ M) ou de phénylbenzène ω -phosphono- α -amino acid (10 μ M, PMBA), deux antagonistes des récepteurs-canaux de la glycine. La strychnine étant également un antagoniste des récepteurs canaux $\alpha 7$ nicotiniques de l'acétylcholine, nous avons préférentiellement utilisé du PMBA qui est un antagoniste très sélectif des récepteurs-canaux de la glycine, lors de notre caractérisation des effets de la capsaïcine sur les transmissions GABAergiques isolées pharmacologiquement (voir ci-dessous).

La moyenne des τ_D des sCPSI-GABA enregistrés en présence de strychnine est de $35,4 \pm 4,6$ ms (avec un minimum 2,8 ms et un maximum de 116,3 ms) pour la couche II (708 évènements, 10 neurones), et de $26,3 \pm 2,9$ ms pour les couches III-IV (429 évènements, 7 neurones; minimum 2,8 ms, maximum 74,3 ms).

Les moyennes des τ_D des sCPSI-GABA enregistrés en présence de PMBA sont de $43,6 \pm 4,8$ ms (avec un minimum 12,3 ms de et un maximum de 89,9 ms) pour les neurones de la couche II ($n = 4$ neurones, 34 évènements) et de $21,4 \pm 3,7$ ms (avec un minimum 3,2 ms de et un maximum de 78,2 ms) pour les neurones des couches III-IV ($n = 8$ neurones, 233 évènements).

Il n'y a pas de différences significatives entre les τ_D des sCPSI-GABA enregistrés en présence de PMBA ou de strychnine dans la couche II ($p = 0,39$) et dans les couches III-IV ($p = 0,32$)

Conclusion

En moyenne les τ_D des sCPSI-glycine sont plus rapides que les τ_D des sCPSI-GABA. Une partie des τ_D des sCPSI glycine (maximum = 29 ms) et des τ_D des sCPSI-GABA (minimum = 2 ms) semble appartenir à la même gamme de valeurs. L'existence de cette gamme commune de valeurs ne permet pas de déterminer une valeur critique de τ_D permettant de séparer sans ambiguïté les sCPSI-GABA et les sCPSI-glycine d'un neurone dont les sCPSI sont enregistrés en l'absence de bloquants pharmacologiques sur la seule valeur de leur τ_D . Cette observation nous a conduits à étudier les propriétés des distributions cumulées des τ_D

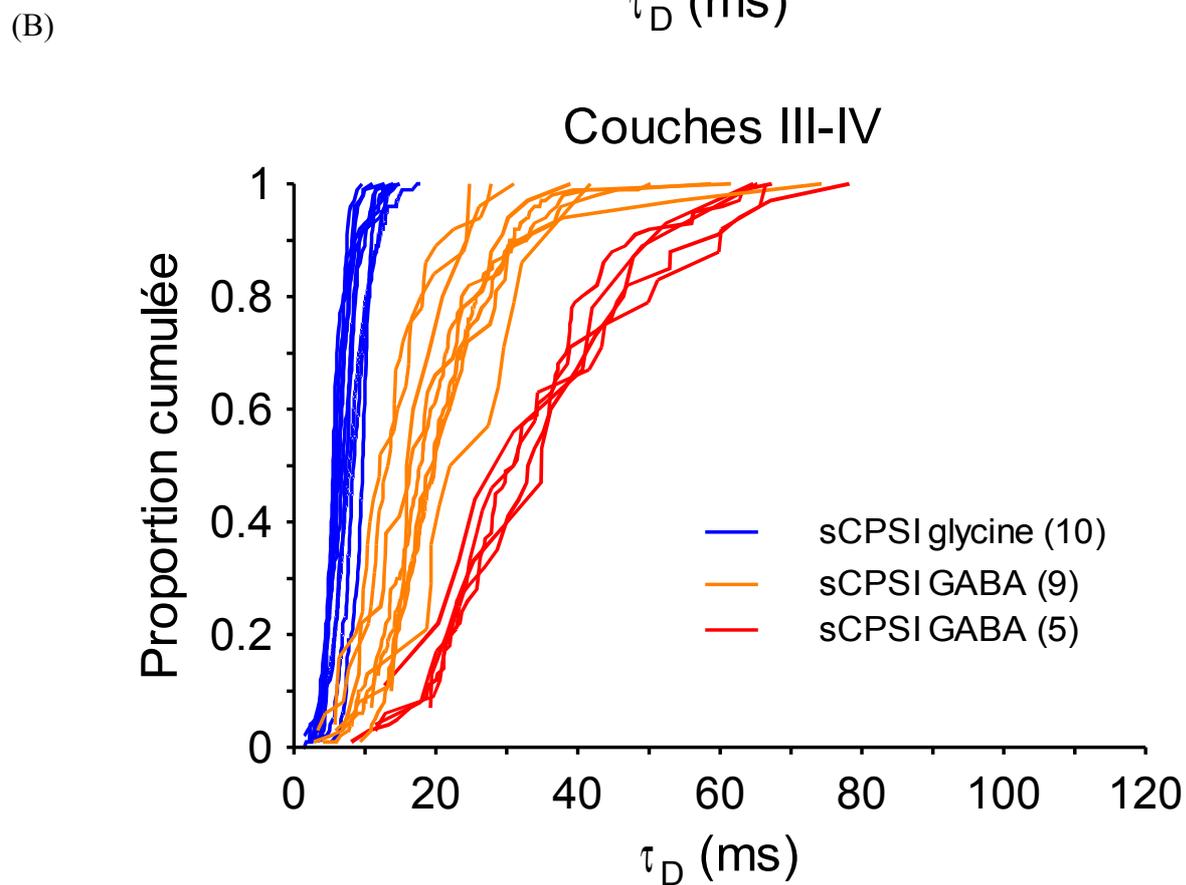
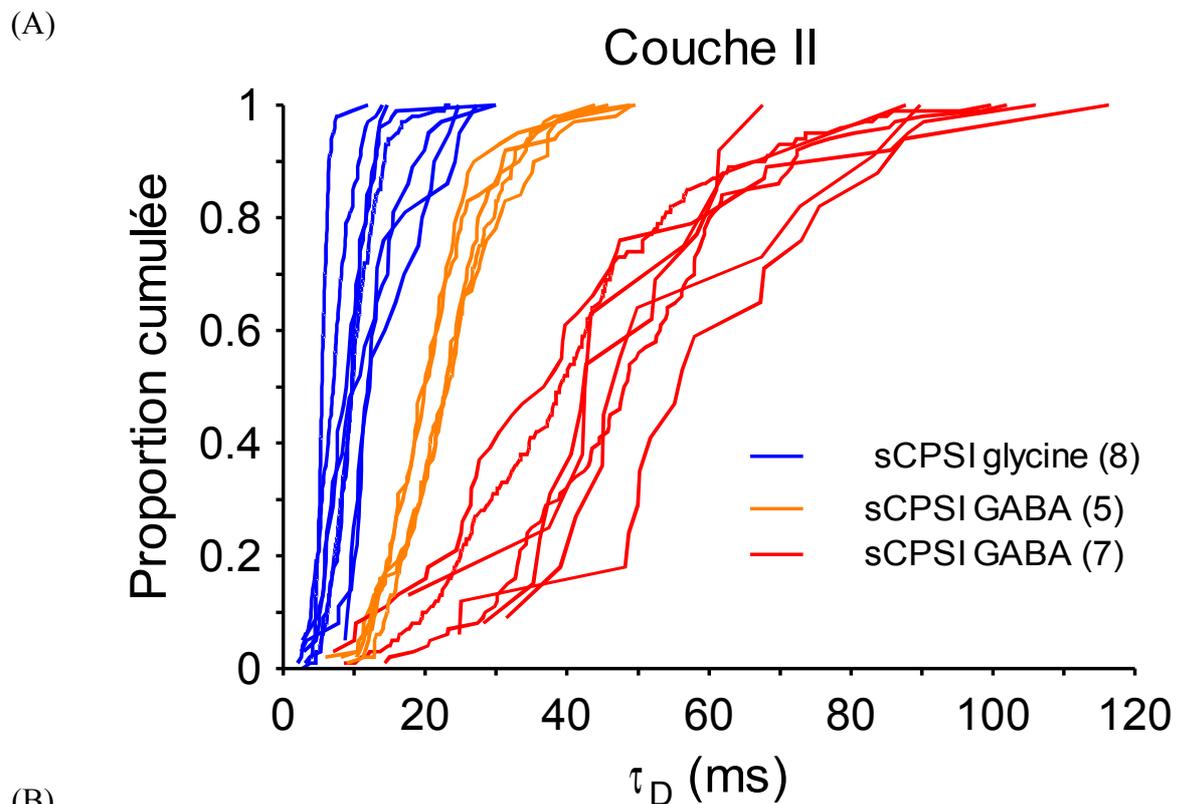


Figure 13. Représentation des distributions cumulées des τ_D des sCPSI pharmacologiquement isolés. Chaque distribution cumulée des τ_D des sCPSI obtenue pour un neurone est représentée par une courbe de couleur. En bleu les distributions des sCPSI-glycine isolés pharmacologiquement, les distributions des τ_D des sCPSI-GABA sont réparties en deux catégories, en orange les τ_D GABA-rapides et en rouge les τ_D GABA-lents. Les deux types de sCPSI GABA sont présents dans la couche II (A) et dans les couches III-IV (B).

des sCPSI isolés pharmacologiquement dans le but d'établir des critères de séparation entre les sCPSI-GABA et les sCPSI-glycine.

3. Analyse des distributions cumulées des τ_D des événements inhibiteurs isolés pharmacologiquement.

L'ensemble des distributions cumulées des τ_D des sCPSI des neurones des couches II et III-IV enregistrés en présence d'un bloquant de la transmission synaptique inhibitrice GABAergique rapide ou glycinergique sont représentées sur les graphiques de la figure 13. On observe ainsi un recouvrement des τ_D des sCPSI-glycine et des τ_D des sCPSI-GABA dans la couche II pour des valeurs comprises entre 10ms et 20ms. L'autre observation majeure est qu'il se distingue deux familles de distributions de τ_D des sCPSI-GABA à la fois dans la couche II et les couches III-IV. Le premier type de distribution se caractérise par la présence de sCPSI GABAergiques rapides et est défini comme une distribution « GABA-rapide ». Le second type de distribution se caractérise par la présence de sCPSI GABAergiques lents et est défini comme une distribution « GABA-lent ».

Une analyse des centiles de ces distributions cumulées à 90% 50% et 10% a été réalisée pour chaque distribution. La moyenne des centiles d'un groupe de distribution donné permet de décrire qualitativement la distribution (Tableau 6).

a) Propriétés des distributions des τ_D glycine

Les sCPSI-glycine de 8 neurones de la couche II et de 10 neurones des couches III-IV ont été enregistrés en présence de bicuculline (10 μ M). Les distributions cumulées des τ_D de ces sCPSI-glycines sont représentées sur la figure 13. En moyenne, 90% des sCPSI-glycine de la couche II ont un τ_D inférieur à 15,2 ms alors que ceux des couches III-IV sont inférieurs à 9,2 ms. La médiane pour l'ensemble des distributions des sCPSI-glycines est de 9,5 ms dans la couche II et de 7,0 ms dans les couches III-IV.

b) Propriétés des distributions des τ_D GABAergiques

Deux types de sCPSI GABAergiques dénommés « *GABA-rapide* » et « *GABA-lent* » ont été mis en évidence. Ces deux types de distribution sont présents à la fois dans la couche II et dans les couches III-IV (figure 13). Dans la couche II, sur 12 neurones étudiés cinq ont été classés dans le groupe « *GABA-rapide* » et sept dans le groupe « *GABA-lent* ». Dans les couches III-IV, sur 14 neurones enregistrés dix ont été classés dans le groupe « *GABA-rapide* » et quatre dans le groupe « *GABA-lent* ».

L'analyse moyenne des centiles pour le groupe « *GABA-rapide* » montre que 90% des sIPSC-GABAergiques ont un τ_D inférieur à 31,9 ms dans la couche II et inférieur à 29,6 ms dans les couches III-IV. Dans ce groupe, 10% des tau-decay des sIPSC-GABAergiques ont un τ_D supérieur à 13,3 ms dans les couches II et à 10,3 ms dans les couches III-IV. La médiane des distributions est de 21,9 ms pour la couche II et de 17,6 ms pour les couches III-IV.

Les propriétés du groupe « *GABA-lent* » étaient les suivantes : 90% des τ_D GABAergiques sont inférieurs à 73,3 ms dans la couche II, et sont inférieurs à 49,6 ms dans les couches III-IV. Ces distributions se caractérisent également par le fait que 10% des τ_D GABAergiques lents sont supérieurs à 26,6 ms dans la couche II et 19,9 ms dans les couches III-IV.

En conclusion, les sCPSI-glycine se distinguent des sCPSI GABAergiques par des τ_D très rapides. La majorité des événements synaptiques glycinergiques spontanés ont un τ_D plus rapide que la majorité des événements synaptiques GABAergiques spontanés rapides.

c) Mise en place de « zones qualitatives »

L'ensemble de ces observations décrites ci-dessus permet de définir sur les graphiques les zones préférentielles de distributions des sCPSI glycinergiques et GABAergiques pharmacologiquement isolés pour les couches II et III-IV. Ainsi nous avons défini différentes zones (figure 14). La première zone s'étend de la droite $y = 0$ (axe des ordonnées) à la distribution des τ_D des sCPSI-glycine la plus lente et constitue la zone dans laquelle les sCPSI-glycine sont dominants, c'est la zone « **glycine** ». La zone comprise entre la distribution la plus lente des τ_D des sCPSI-glycine et la plus rapide des distributions des τ_D des sCPSI-GABAergiques du groupe « *rapide* » forme la zone où les neurones reçoivent à la fois des sCPSI-glycine et des sCPSI-GABA, et détermine la zone « **GABA/glycine** ». La zone où

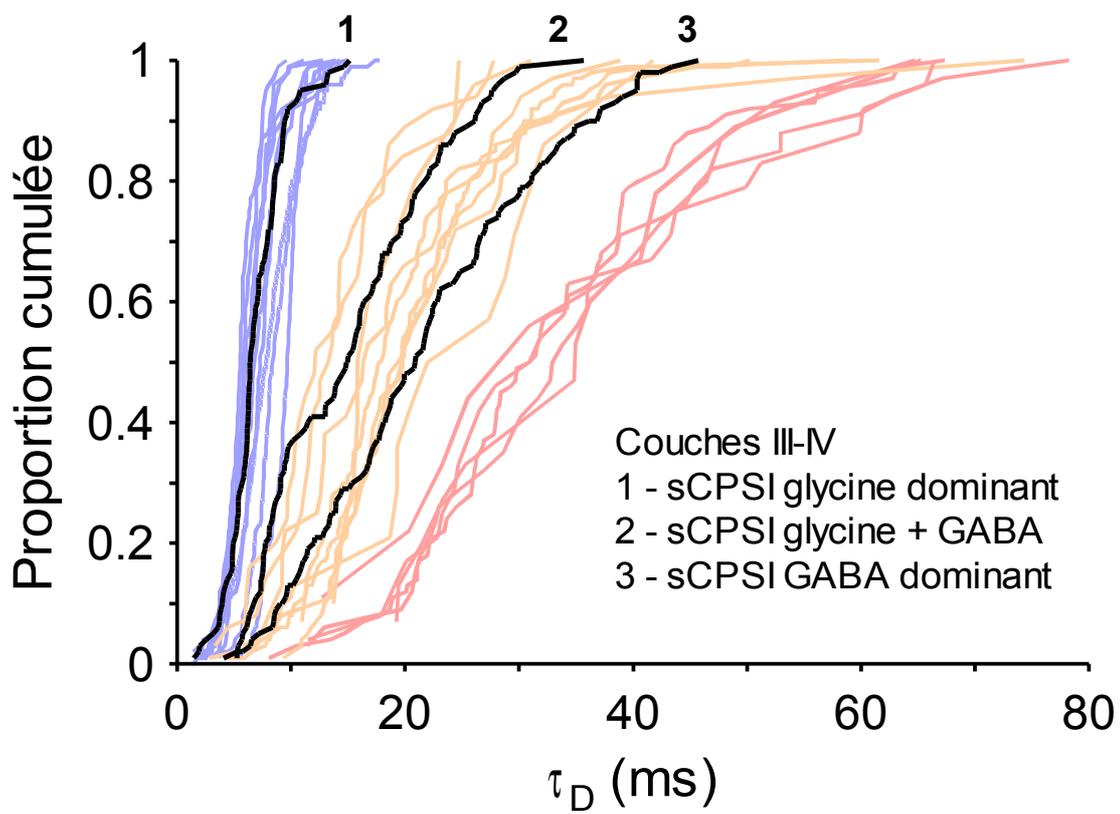


Figure 14 : Classement des distributions cumulées des τ_D des sCPSI. Les distributions cumulées des τ_D des sCPSI non-isolés pharmacologiquement des neurones des couches III-IV ont été comparées avec les distributions des τ_D des sCPSI non-isolés pharmacologiquement pour trois neurones des couches III-IV (1, 2 et 3). La distribution (1) est dans la zone « glycine », la distribution (2) est dans la zone « GABA/glycine » et la distribution (3) est dans la zone (GABA rapide).

Tableau 7 : Classement des distributions cumulées des τ_D des sCPSI par couche

Couche	N	« glycine »	« GABA/glycine »	« GABA »	
				rapide	lent
II	28	36% n=10/28	25% n = 7/28	21% n = 6/28	18% n = 5/28
III-IV	16	25% n=4/16	25% n = 4/16	38% n = 6/16	12% n =2/16
V	30	50% n = 15/30	37% n = 11/30	13% n =4/30	0%

N : effectif total, n : fraction par groupe. Classement des distributions cumulées des τ_D des sCPSI en trois groupes, « glycine » : sCPSI glycine dominants, « GABA/glycine » sCPSI GABA+sCPSI glycine et « GABA » sCPSI GABA dominants, (rapide : sCPSI-GABA rapide ; lent : sCPSI-GABA lent).

les sCPSI-GABA rapides sont dominants s'étend de la distribution la plus rapide des τ_D des sCPSI-GABAergiques du groupe « *rapide* » à la distribution la plus lente de ce même groupe et constitue la zone « **GABA-rapide** ». Au-delà de la distribution des τ_D la plus rapide des sCPSI-GABA du groupe « *lent* » nous nous trouvons dans la zone où la majorité des sCPSI sont des sCPSI-GABA lents, cette zone correspond à « **GABA-lent** »

4. Classement des distributions cumulées des τ_D des sCPSI enregistrés en l'absence de bloquants pharmacologiques

Chaque distribution cumulée de τ_D des sCPSI enregistrés en l'absence de bloquant pharmacologique des transmissions inhibitrices a été classée en fonction des zones qualitatives (voir ci-dessus). De ce fait nous avons pu déterminer à quels patrons d'inhibition les distributions cumulées des τ_D des sCPSI des neurones enregistrés dans les couches II, III-IV et V appartenaient (tableau 7).

Ainsi, dans la couche II, comme dans les couches III-IV et V, tous les patrons d'inhibition ont été observés. Des neurones sous une inhibition principalement portée par des sCPSI-glycines (« **glycine** ») sont trouvés dans la couche II (36%, n=10/28), dans les couches III-IV (25%, n=4/16) et dans la couche V (50%, n=15/30). Dans la couche II et les couches III-IV 25% des neurones ont un patron d'inhibition « **GABA/glycine** », (n=7/28 et n=4/16, respectivement). Dans la couche V, 37% des neurones (n=11/30) sont classés « **GABA/glycine** ».

Le patron d'inhibition « GABA » se compose de deux profils, le profil GABA-rapide et le profil GABA-lent. Dans les couches II, III-IV et V il y a respectivement 21% (n=6/28), 38% (n=6/16) et 13% (n=4/30) de neurones qui sont sous une inhibition « **GABA-rapide** ». Seulement 18% (n=5/28) et 12% (n=2/16) des neurones de la couche II et III-IV sont sous une inhibition « **GABA-lente** ».

Cette classification révèle la présence de neurones dans la CDME recevant à la fois des sCPSI-glycine et des sCPSI-GABA, ce qui n'est pas incompatible avec des observations de la littérature (Inquimbert et al., 2007). Dans le but de déterminer la proportion de sCPSI-glycine et de sCPSI-GABA pour chaque neurone classé « **GABA/glycine** », nous avons mis au point une analyse quantitative des distributions cumulées des τ_D des sCPSI.

5. Ajustement non-linéaire des distributions cumulées des τ_D des évènements inhibiteurs

Nous avons procédé à des régressions non-linéaires de type gaussien pour déterminer si les distributions des τ_D des sCPSI isolés pharmacologiquement pouvaient être décrites par une distribution mono gaussienne. Les neurones recevant à la fois des sCPSI-GABA et des sCPSI-glycine pourraient alors être analysés par une régression avec deux distributions gaussiennes. Cette régression permettrait ainsi de déterminer la fraction de sCPSI-GABA et la fraction de sCPSI-glycine que reçoit ce neurone.

a) Méthode

Chaque distribution cumulée des τ_D a été ajustée par une ou plusieurs courbes gaussiennes. Pour chaque distribution, trois équations d'ajustement ont été testées et comparées.

La première équation (I) décrit une distribution mono-gaussienne dont l'équation est :
 $f(x) = 0,5 \times (1 + \operatorname{erf}((x-\mu)/(\sqrt{2}v)))$

μ étant la moyenne et v étant la variance de la distribution.

La seconde équation (II) comporte deux distributions gaussiennes (1) et (2) dont l'équation est :

$$f(x) = 0,5 \times F \times (1 + \operatorname{erf}((x-\mu_1)/(\sqrt{2}v_1))) + (1-F) \times (1 + \operatorname{erf}((x-\mu_2)/(\sqrt{2}v_2)))$$

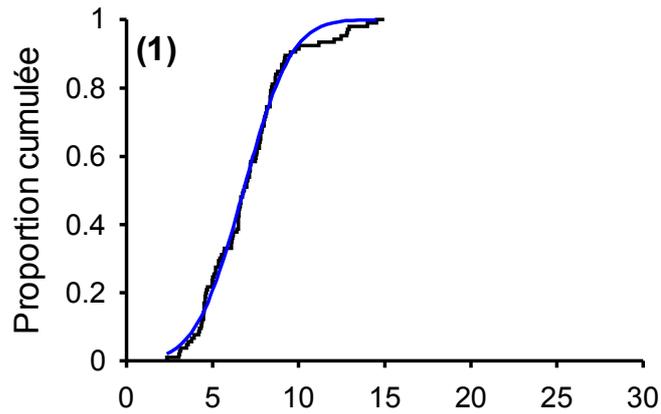
Avec $F > 0$, F étant la proportion de la distribution (1) et $(1-F)$ la proportion de la distribution (2).

La troisième équation (III) comporte trois distributions gaussiennes, (1) (2) et (3) :

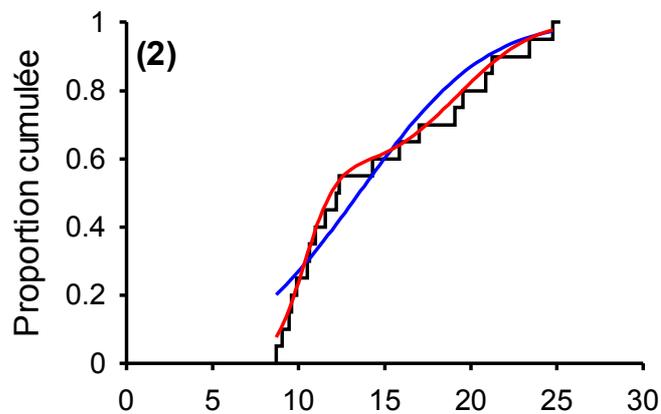
$$f(x) = 0,5 \times (F_1 \times (1 + \operatorname{erf}((x-\mu_1)/(\sqrt{2}v_1))) + F_2 \times (1 + \operatorname{erf}((x-\mu_2)/(\sqrt{2}v_2))) + (1-F_1-F_2) \times (1 + \operatorname{erf}((x-\mu_3)/(\sqrt{2}v_3))))$$

F_1 représente la proportion de la distribution (1), F_2 la proportion de la distribution (2) et $(1-F_1-F_2)$ la proportion de la distribution (3).

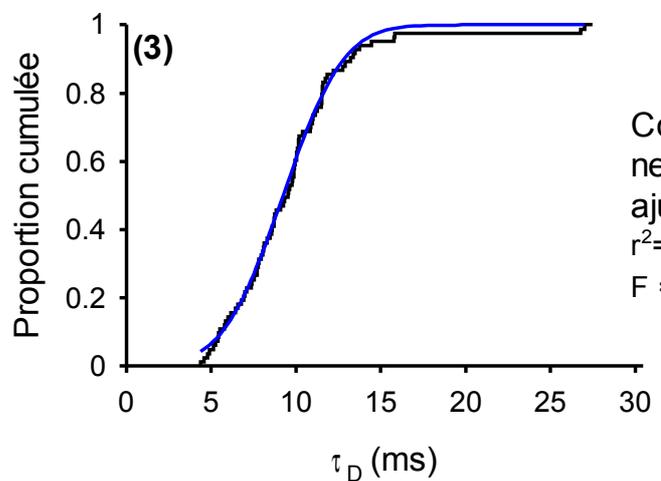
Les trois types d'ajustement sont effectués et comparés par un test statistique de Fisher. Si un ajustement est significatif avec l'équation (II) ou (III) par rapport à l'équation (I), les paramètres (μ_n , μ_n , F_n) sont analysés statistiquement (méthode des asymptotes) ; s'ils ne sont pas tous significatifs alors l'ajustement (II) ou (III) n'est pas retenu par rapport à l'ajustement (I).



(1)
 Couche III-IV
 sCPSI glycine (bicuculline 10 μ M)
 ajustement mono-gaussien (bleu)
 $r^2=0,99$ $\mu = 6,8$ $\sigma = 1,2$
 $F = 100\%$



(2)
 Couche II
 sCPSI glycine (bicuculline 10 μ M)
 ajustement bi-gaussien (rouge)
 $r^2=0,96$ $\mu_1 = 10,4$ $\sigma_1 = 1,4$
 $\mu_2 = 19,2$ $\sigma_2 = 3,4$
 $F_1 = 43\%$ et $F_2 = 57\%$



(3)
 Couche III-IV
 neurone classé "glycine"
 ajustement mono-gaussien (bleu)
 $r^2=0,99$ $\mu_1 = 9,2$ $\sigma_1 = 2,8$
 $F = 100\%$

Figure 15. Ajustement gaussien des distributions cumulées des τ_D . Chaque distribution cumulée des τ_D des sCPSI isolés pharmacologiquement ou des sCPSI contrôle, a été ajustée par une ou deux composantes gaussiennes. Les paramètres μ_n , σ_n et F ont été obtenus pour chaque neurone. Le neurone (1) a une distribution cumulée des τ_D ajustée par une composante gaussienne. Le neurone (2) a une distribution cumulée des τ_D ajustée par deux composantes gaussiennes. Le neurone (3) a une distribution cumulée des τ_D ajustée par une composante gaussienne.

b) Bilan des ajustements gaussiens

Les paramètres μ_n , v_n , F_n ont été obtenus pour chaque neurone (figure 15).

sCPSI-Glycine

L'ajustement des distributions des τ_D des sCPSI-glycine isolés pharmacologiquement révèle que dans la couche II, 7 distributions sur 8 se caractérisent par un ajustement mono-gaussien. La distribution restante peut être ajustée par deux courbes gaussiennes.

Les neurones de la couche II dont les profils d'inhibition ont été classés « glycine » en l'absence de bloquant pharmacologique ont des distributions de τ_D qui sont ajustées par une courbe mono gaussienne dans 8 cas sur 10 et par deux courbes gaussiennes dans 2 cas sur 10. L'ajustement avec deux courbes gaussiennes reflète la présence d'évènements glycinergiques « rapides » qui ont en moyenne une valeur de τ_D $8,6 \pm 1,9$ ms et des évènements glycinergiques « lents » qui ont en moyenne une valeur de τ_D $16,7 \pm 2,2$ ms. La fraction des évènements « rapides » vaut en moyenne 65%.

L'ajustement des distributions des τ_D des sCPSI-glycine isolés pharmacologiquement révèle que dans les couches III-IV toutes les distributions sont mono-gaussiennes (10/10). Les neurones classés « glycine » dans les couches III-IV et V se caractérisent aussi par un ajustement de leur distribution des τ_D des sCPSI par une courbe mono-gaussienne. La moyenne des τ_D est de $7,0 \pm 0,4$ ms.

sCPSI-GABAergiques

Les distributions des τ_D des sCPSI-GABA « rapides » et « lents » isolés pharmacologiquement, dans la couche II (12/12) comme dans les couches III-IV (14/14), peuvent être ajustées par une courbe mono-gaussienne. En l'absence de bloquant pharmacologique, les neurones classés « GABA-rapide » et « GABA-lent » se caractérisent principalement par des ajustements de leur distribution des τ_D des sCPSI par une courbe mono-gaussienne dans les couches II (11/11), III-IV (3/8) et V (4/4).

Cas de neurone classés GABA/glycine

Dans l'ensemble des neurones classés « GABA/glycine » les distributions des τ_D de la couche II (n= 7) et des couches III-IV (n= 4) ont toutes été significativement mieux ajustées par deux composantes gaussiennes. La moyenne de la composante rapide est attribuée aux sCPSI-glycine. La moyenne de la composante lente est attribuée aux sCPSI-GABA.

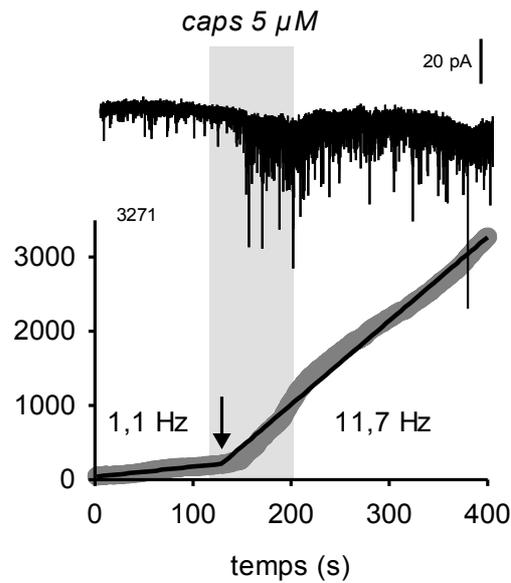
Les neurones de la couche II classés « GABA/glycine » (n = 7) ont en moyenne une fraction de sCPSI glycine de $68 \pm 1\%$ ($\tau_D = 11,1 \pm 1,1$ ms) et une fraction de sCPSI GABA de $31 \pm 1\%$ ($\tau_D = 24,1 \pm 2,8$ ms). Les neurones des couches III-IV classés « GABA/glycine » (n= 4) ont en moyenne une fraction de sCPSI glycine de $49 \pm 1\%$ ($\tau_D = 7,7 \pm 1$, ms) et une fraction de sCPSI GABA de $50 \pm 1\%$ ($\tau_D = 14,8 \pm 1,3$ ms).

Les neurones de la couche V classés « GABA/glycine » (n = 11) ont en moyenne une fraction de sCPSI glycine de $58 \pm 1\%$ ($\tau_D = 7,3 \pm 1,2$ ms) et une fraction de sCPSI GABA de $39 \pm 1\%$ ($\tau_D = 14,5 \pm 1,4$ ms).

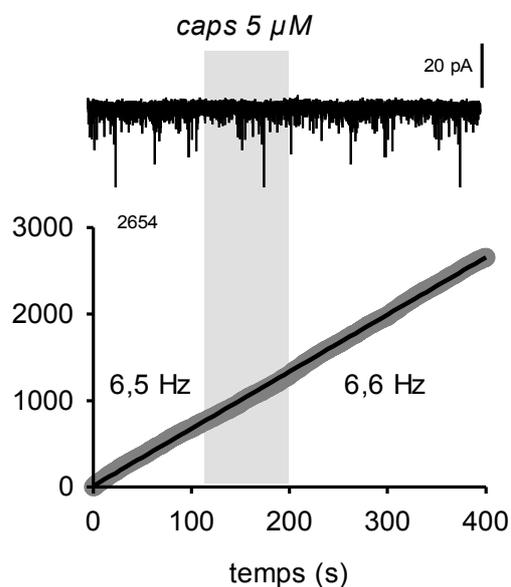
Conclusion

Cette analyse qualitative et quantitative des distributions cumulées des τ_D des sCPSI permet de définir des patrons d'inhibition en fonction du type majoritaire de sCPSI que reçoit un neurone. Le groupe de neurones qui reçoit principalement des sCPSI-glycine est classé « **glycine** », alors que ceux qui reçoivent principalement des sCPSI-GABA sont classés « **GABA** », enfin les neurones qui reçoivent à la fois des sCPSI-glycine et des sCPSI-GABA sont classés « **GABA/glycine** ». Les trois types d'inhibition sont retrouvés dans les couches II, III-IV et V.

Neurone 1
 sCPSE, couche II
 augmentation de fréquence
 délai = 19 s (flèche)
 $R^2 = 0,989$ (2 segments)



Neurone 2
 sCPSE, couche II
 fréquence inchangée
 $R^2 = 0,999$ (1 segment)



Neurone 3
 sCPSI, couche V
 diminution de fréquence
 délai = 79 s (flèche)
 $R^2 = 0,999$ (2 segments)

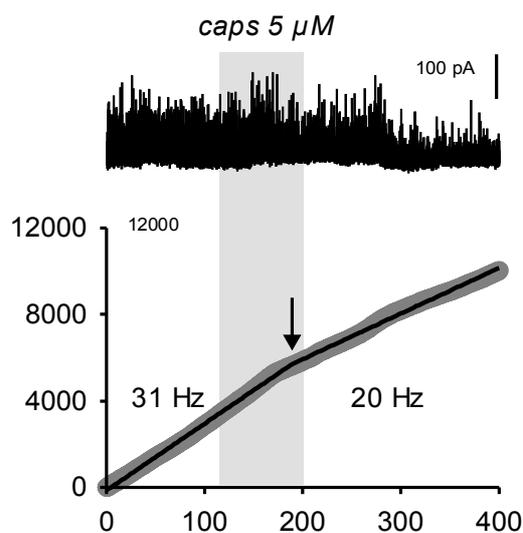


Figure 16. Les trois types d'effets induits par l'application de capsaïcine ($5\mu\text{M}$ pendant 90s).

Les trois cas illustrés représentent une augmentation de fréquence des sCPSE (neurone 1), une absence de changement de fréquence des sCPSE (neurone 2) et une baisse de la fréquence des sCPSI (neurone 3).

II. Effet de la capsaïcine

La capsaïcine est un agoniste sélectif des canaux TRPV1. L'application par bain (5 μ M, 90s) de capsaïcine permet de stimuler spécifiquement les terminaisons des fibres nociceptives qui expriment le canal TRPV1 au niveau de leurs terminaisons centrales dans la CDME (Nakatsuka et al., 2002). Ces terminaisons sont localisées dans les couches I et II de la CDME et leur activation entraîne le recrutement de neurones des couches I et II. L'application de capsaïcine est donc un moyen d'activation spécifique d'une sous-population de neurones de la couche II. L'étude des variations de fréquence des CPSE et CPSI suite à l'application de capsaïcine (5 μ M pendant 90 s) permet de déterminer si le neurone enregistré dans les couches II, III-V ou V appartient à un réseau de traitement de l'information nociceptive dépendant de la stimulation des nocicepteurs exprimant TRPV1.

1. Méthode d'analyse des changements de fréquences

Nous avons analysé en détail les changements de fréquence des courants post-synaptiques (CPS) excitateurs (CPSE) et inhibiteurs (CPSI) suite à l'application par bain de capsaïcine (5 μ M, 90 s). Une représentation cumulée permet de visualiser et de quantifier l'activité synaptique en fonction du temps. Une activité régulière se traduit par une relation linéaire. Des déviations abruptes vers le haut (augmentation) ou vers le bas (baisse) traduisent un changement de fréquence (figure 16). La fréquence moyenne des CPS sur une période de temps donnée est représentée par la pente de la droite obtenue par régression linéaire des points expérimentaux. Si la fréquence des CPS change suite à l'application d'une drogue, les points expérimentaux se distribueront selon une relation linéaire de pente différente. Si l'effet est réversible, cette pente doit s'infléchir pour retrouver un coefficient directeur proche de la valeur initiale avant application de la substance testée. Le processus d'ajustement de courbe par régression non-linéaire permet de définir l'instant auquel se produit la rupture de pente.

La figure 16 (*Neurone 1*) illustre un enregistrement, réalisé dans un neurone de la couche II, qui présente une augmentation de fréquence des CPSE suite à l'application de capsaïcine. Les fréquences contrôle (CTRL) et TEST sont de 1,1 Hz et 11,7 Hz, respectivement. La variation de fréquence entre la situation CTRL et TEST étant de 1060% (> 15%), ce neurone sera considéré comme répondant positivement à la capsaïcine. Les distributions cumulées des intervalles entre évènements (IIE) sont significativement différentes (Test de KS, $p < 0.001$). L'ajustement par deux droites donne les paramètres

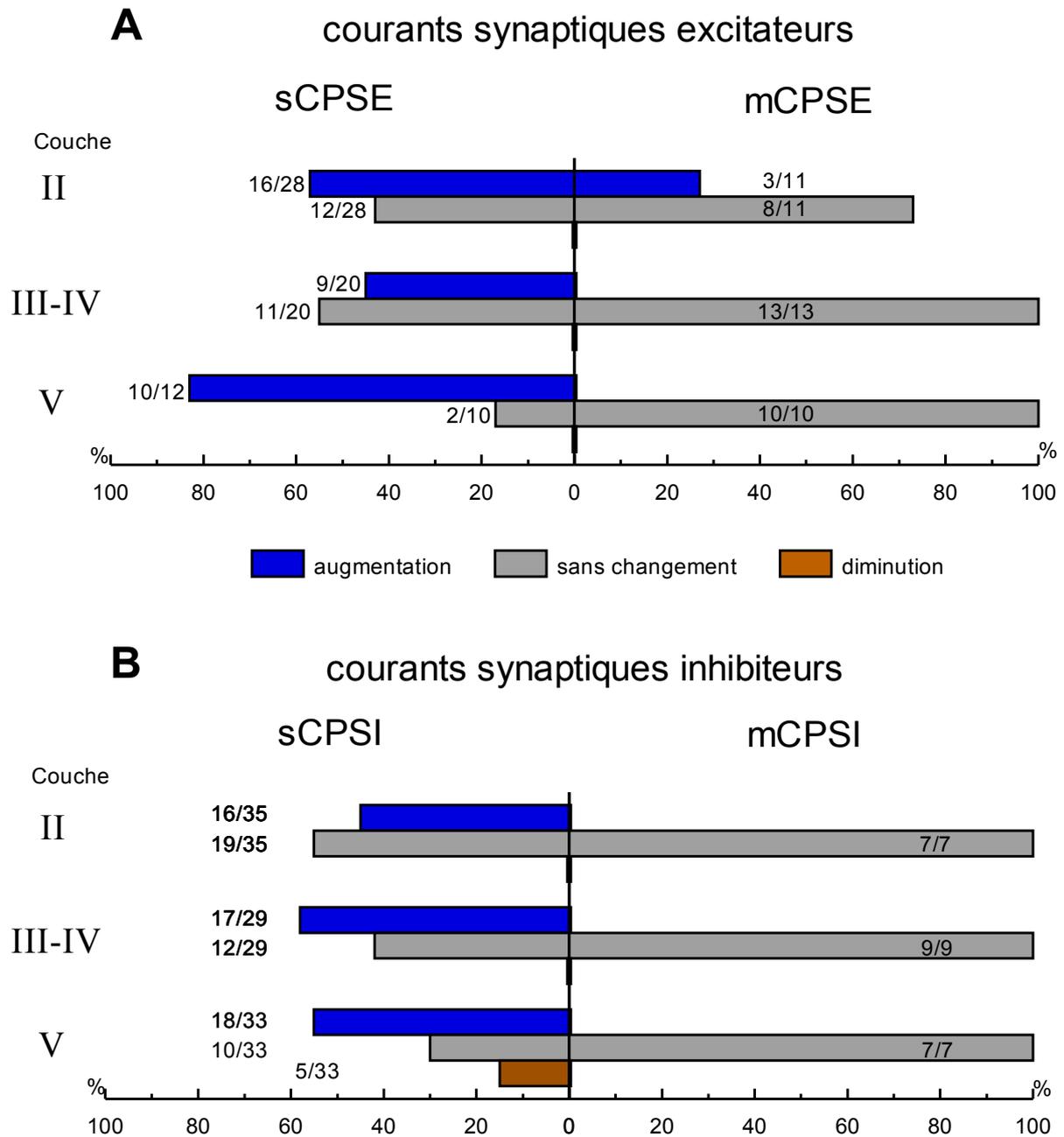


Figure 17. Proportions des différentes réponses induites par l'application de capsaïcine.

Selon les neurones, l'application de capsaïcine peut induire une augmentation (bleu), aucun changement (gris) ou une diminution (brun) de la fréquence des courants postsynaptiques excitateurs (CPSE) ou inhibiteurs (CPSI), spontanés (**A**) ou miniatures (**B**, enregistrés en présence de TTX 0,5 μ M). Les proportions des différentes réponses (nombre de réponses / nombre de neurones enregistrés) sont précisées pour chaque situation d'enregistrement.

suivants : A (CTRL) = 1,35 Hz et C (TEST) = 11,27 Hz, et D = 129 secondes. La valeur de D est bien comprise entre 110 et 200 secondes qui représentent les temps de début et de fin d'application de la drogue. L'efficacité de l'ajustement est quantifiée par le coefficient de détermination r^2 . L'ajustement est validé pour $r^2 > 0,95$. Dans cet exemple, l'ajustement pour le *neurone 1* donne un r^2 de 0,989, et est donc retenu.

Cette méthode permet donc de déterminer si le changement a bien eu lieu durant l'application et de quantifier le changement de fréquence observé. La figure 16 montre les trois cas de figure que nous avons rencontrés : augmentation de fréquence (figure 16 neurone 1), baisse de fréquence (figure 16 neurones 3), ou absence de changement de fréquence (figure 16 neurones 2).

La capsaïcine n'a jamais induit de courant entrant ou sortant mesurable (détectable) dans les neurones enregistrés ($n = 214$). Cette observation suggère que les neurones testés n'expriment pas le récepteur TRPV1 au niveau de leur corps cellulaire. Par contre la capsaïcine a modulé la fréquence des CPSE et CPSI d'une sous-population de neurones.

2. Effet de la de la capsaïcine sur les transmissions synaptiques rapides

a) Transmission excitatrice

Dans la couche II, 57% (16/28) des neurones ont présenté une augmentation de fréquence des sCPSE. De même, 45% (9/20) et 83% (10/12) des neurones des couches III-IV et V ont montré une augmentation de fréquence des sCPSE. Dans aucune des couches nous n'avons observé de baisse de fréquence des sCPSE parmi les neurones enregistrés ($n = 60$) (figure 17).

En présence de TTX, l'application de capsaïcine a induit exclusivement une augmentation de fréquence des mCPSE dans une fraction de neurones de la couche II (27%, 3/11). Aucune augmentation de fréquence de mEPSC n'a été détectée dans les couches III-IV ($n = 13$) ou V ($n = 10$) (figure 17).

En l'absence de TTX, Les proportions de neurones répondant par une augmentation de fréquence des sCPSE dans les différentes couches II, III-IV et V ne sont pas significativement différentes (Test exact de Fisher, $p = 0.2696$). Par contre, les proportions de réponses sont significativement différentes lorsqu'on compare les sCPSE et les mCPSE ($p = 0.0374$). Ce phénomène s'explique par la très forte différence entre les proportions de neurones présentant une augmentation de fréquence des sCPSE dans les couches III-IV ($p = 0.0044$) et dans la

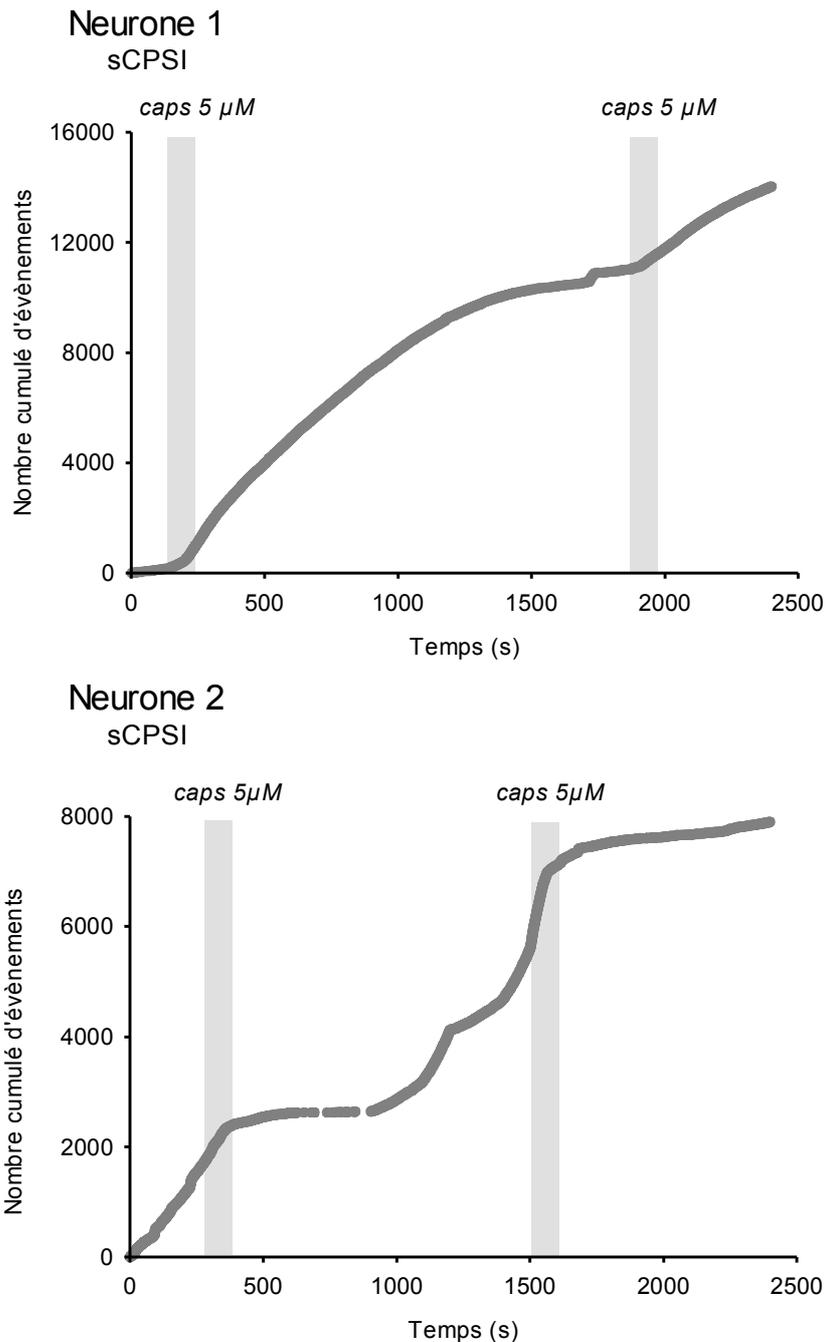


Figure 18. Mise en évidence de la reproductibilité de l'effet de la capsaïcine sur les variations de fréquence.

Les graphiques représentent, en fonction du temps, le nombre cumulé d'événements synaptiques (sCPSI) enregistrés sur deux neurones soumis à deux applications consécutives de capsaïcine à 20 minutes d'intervalle. Pour le neurone 1, enregistré dans la couche II, les deux applications de capsaïcine ont induit une augmentation de fréquence des sCPSI. Pour le neurone 2, enregistré dans la couche V, les deux applications de capsaïcine ont induit une baisse de fréquence des sCPSI.

couche V ($p = 0.0011$), alors qu'en présence de TTX aucun neurone n'a répondu à la capsaïcine par une augmentation de fréquence de mCPSE. Par contre, dans la couche II les proportions de neurones répondant par une augmentation de fréquence en l'absence et en présence de TTX sont semblables ($p = 0.2691$). Nous n'avons jamais observé de baisse de fréquence de mCPSE dans aucune des couches ($n=34$) (figure 17).

b) Transmission inhibitrice

Une fraction importante des neurones de la couche II, (45%, 16/35) a présenté une augmentation de fréquence des sCPSI suite à l'application de capsaïcine. Nous avons également observé une augmentation de fréquence des sCPSI 58% des neurones des couches III-IV (17/29) et 55% (18/33) des neurones de la couche V (figure 17). De manière intéressante, dans la couche V, suite à la l'application de la capsaïcine, 15% (5/33) des neurones ont montré une baisse de fréquence des sCPSI. Une telle baisse de fréquence de sCPSI n'a jamais été observée dans les couches II ou III-IV. En ce qui concerne les courants miniatures, aucune augmentation de fréquence des mCPSI n'a été détectée dans les couches II, III-IV et V ($n = 7, 9$ et 7 respectivement), suite à l'application de capsaïcine (figure 17). Une différence significative dans les proportions de neurones répondant à l'application de capsaïcine par une augmentation de fréquence des sCPSI est observée entre les différentes couches (test de tableau de contingence, $p = 0.0237$). Cette différence s'explique par le fait que dans les couches II et III-IV il n'y a pas de baisse de sCPSI suite à l'application de capsaïcine, alors que dans la couche V des baisses de fréquence ont été observées. Par contre il n'y a pas de différence entre les proportions de la couche II et celles des couches III-IV (figure 17).

3. *Convergence des variations de fréquence des sCPSE et sCPSI*

Lorsque deux applications de capsaïcine ($5 \mu\text{M}$, 90 s) étaient espacées d'au moins 20 minutes, les deux applications ont induit une augmentation de la fréquence des sCPSE ou des sCPSI, indiquant une reproductibilité des effets de la capsaïcine. La figure 18 illustrant un exemple représentatif de la reproductibilité des effets induits par l'application de capsaïcine ($n = 10/10$). Nous avons ensuite voulu voir si les augmentations de fréquence des sCPSE et sCPSI se produisaient dans les mêmes neurones ou dans des contingents de cellules nerveuses distinctes. Pour cela nous avons appliqué deux fois la capsaïcine à 20 minutes d'intervalle et

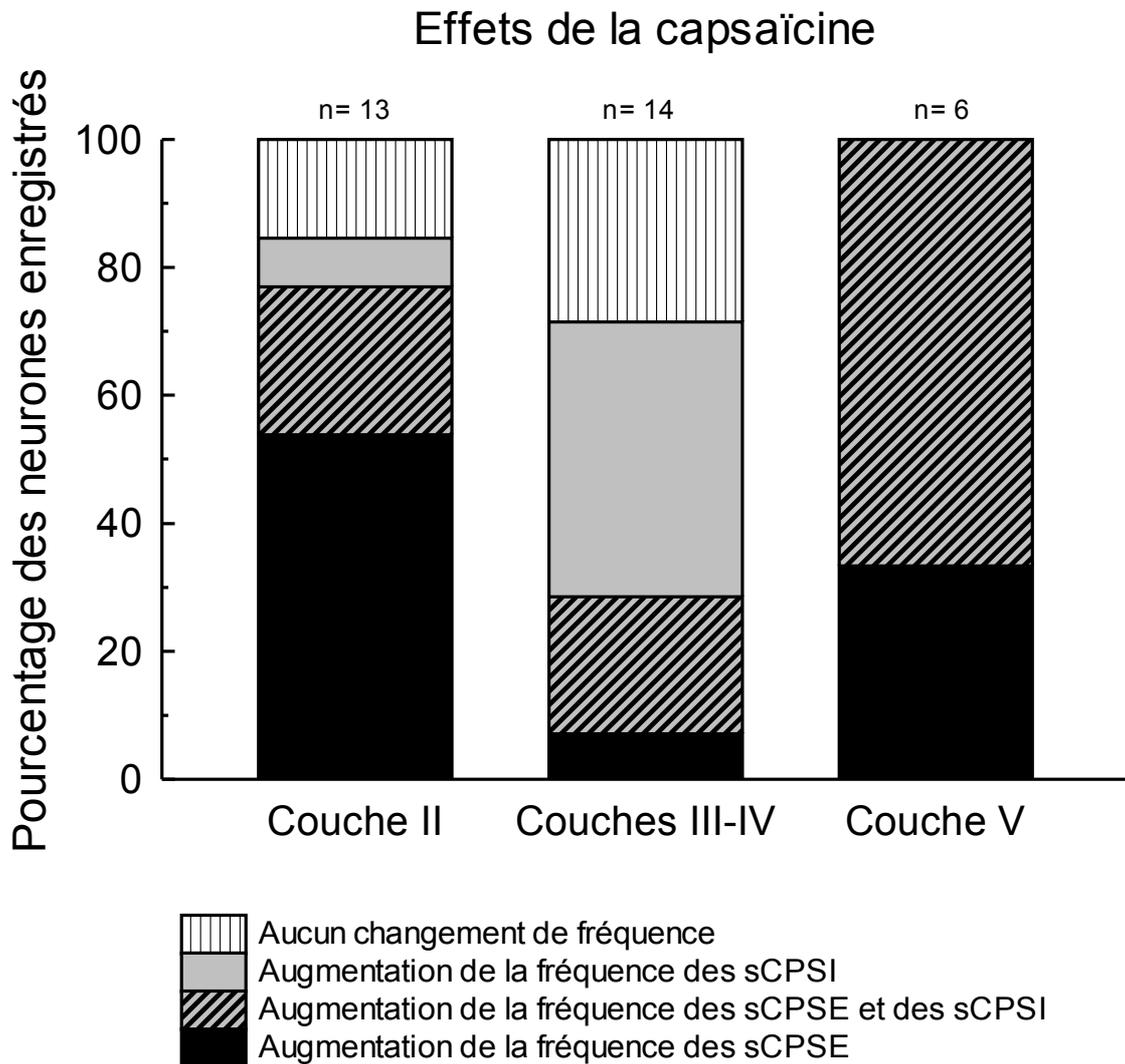


Figure 19. Résumé des effets de la capsaïcine sur les fréquences des sCPSE et sCPSI enregistrés dans un même neurone.

Les neurones testés ont reçu deux applications de capsaïcine espacées de 20 minutes, la première lors de l'enregistrement des sCPSE et la seconde lors de l'enregistrement des sCPSI.

enregistré dans un même neurone ses effets sur les fréquences des sCPSE à un potentiel de maintien de -60 mV et sur les fréquences des sCPSI à un potentiel de 0 mV. Les résultats obtenus sont résumés sous la forme d'un graphique dans la figure 19.

Dans 54% (7/13) des neurones de la couche II, 7% (1/14) des neurones des couches III-IV et 33% (2/6) des neurones de la couche V nous avons observé un effet de la capsaïcine exclusivement sur les fréquences des sCPSE. Par ailleurs 8% (1/13) des neurones de la couche II, 43% (6/14) des neurones des couches III-IV et 0% (0/6) des neurones de la couche V ont présenté une augmentation des fréquences des sCPSI, sans que la fréquence des sCPSE ne soit affectée. Finalement, nous avons noté que dans 23% (3/13) des neurones de la couche II, 21% (3/14) des neurones des couches III-IV et 67% (4/6) des neurones des couches V, la capsaïcine augmentait à la fois la fréquence des sCPSE et celle des sCPSI.

Ces proportions sont significativement différentes entre les différentes couches (Test table de contingence TT, $p < 0.05$). Ainsi les effets de la capsaïcine se caractérisent par une augmentation prédominante de la transmission excitatrice dans la couche II, de la transmission inhibitrice dans les couches III-IV, alors que dans la couche V, une forte proportion de neurones (67%) présente une augmentation simultanée de la fréquence des sCPSE et des sCPSI.

4. Effet de la capsaïcine sur les patrons d'inhibition des neurones

Une analyse des cinétiques des sCPSI a été faite sur une période de 300 s après la fin de l'application de capsaïcine dans le cas où la capsaïcine a induit une augmentation de la fréquence des sCPSI. La distribution cumulée τ_D des sCPSI obtenue après capsaïcine a été comparée à la distribution cumulée τ_D des sCPSI avant l'application de capsaïcine par un test de Kolmogorov-Smirnov. Nous avons aussi procédé à l'ajustement gaussien de ces distributions. La figure 20a illustre un exemple de cette analyse pour des neurones. Nous avons ainsi pu déterminer suite à l'application de la capsaïcine si les fréquences des sCPSI GABAergiques et/ou glycinergiques ont augmenté et si le neurone changeait de patron d'inhibition. Les neurones de la couche II (13/13) et des couches III-IV (10/10) qui ont une augmentation de sCPSI conservent le même patron d'inhibition après l'application de capsaïcine, ce qui suggère que dans le cas des neurones classés « GABA/glycine » à la fois les sCPSI GABA et les sCPSI glycine ont eu une augmentation de fréquence (figure 20b).

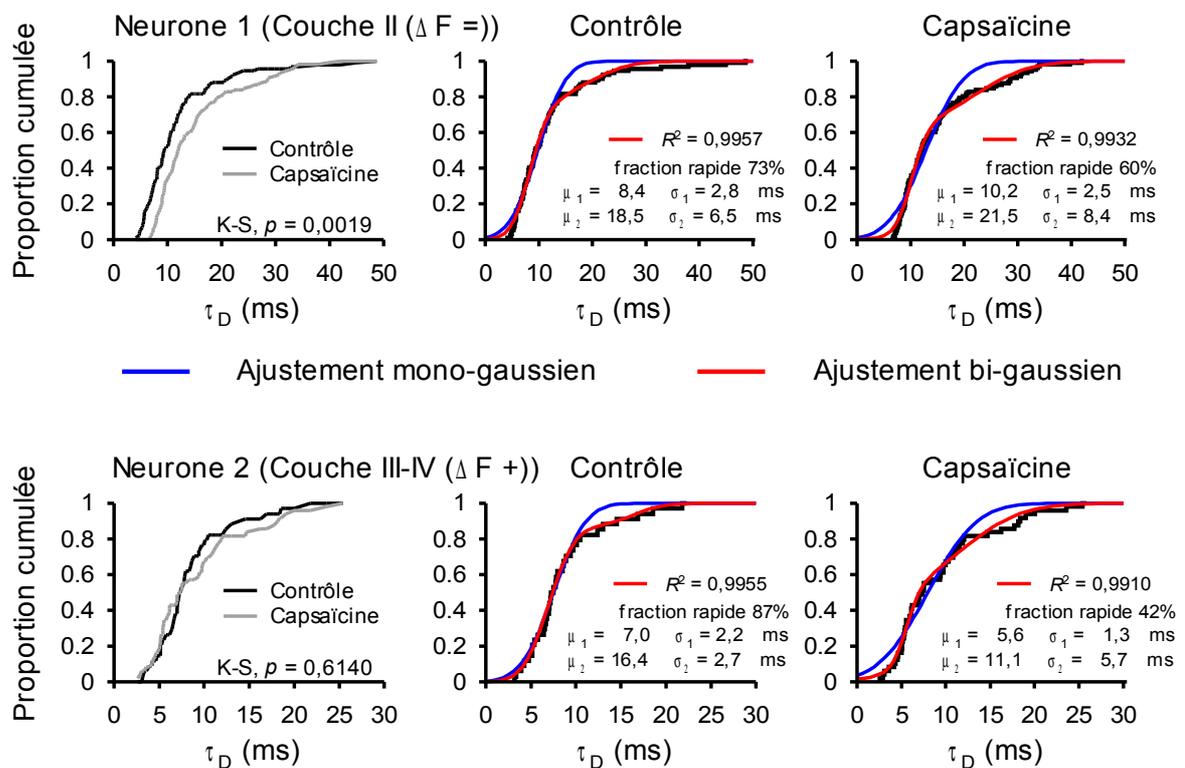


Figure 20a. Analyse des effets de la capsaïcine sur les patrons d'inhibition des neurones. Le neurone 1 de la couche II est classé « GABA/glycine » et n'a pas eu d'augmentation de fréquence des sCPSI suite à l'application de capsaïcine. La distribution cumulée τ_D est ajustée par deux composantes gaussiennes avant et après l'application de capsaïcine, ce neurone reste classé « GABA/glycine » après l'application de capsaïcine. Le neurone 2 est classé « GABA/glycine » et a eu une augmentation de fréquence des sCPSI suite à l'application de capsaïcine. La distribution cumulée τ_D est ajustée par deux composantes gaussiennes avant et après l'application de capsaïcine, ce neurone reste classé « GABA/glycine » suite à l'augmentation de fréquence des sCPSI. L'augmentation de fréquence des sCPSI concernait à la fois les sCPSI GABA et les sCPSI glycine.

Figure 20b. Effet de la capsaïcine en fonction des patrons d'inhibition des neurones

Couche	« glycine »	« GABA/glycine »	« GABA »
II (n)	10	7	11
$\Delta F (+)$	6/10	3/7	4/7
III-IV (n)	4	4	8
$\Delta F (+)$	3/4	3/4	4/8

(n) : nombre de neurones avec un patron d'inhibition « glycine », « GABA/glycine » et « GABA », $\Delta F (+)$: fraction de neurone avec une augmentation de la fréquence des sCPSI suite à l'application de capsaïcine.

5. Conclusion

La capsaïcine n'a jamais induit de courant entrant ou sortant tonique détectable dans les neurones de la corne dorsale. Ceci suggère que les neurones enregistrés n'exprimaient pas de récepteurs TRPV1 fonctionnels.

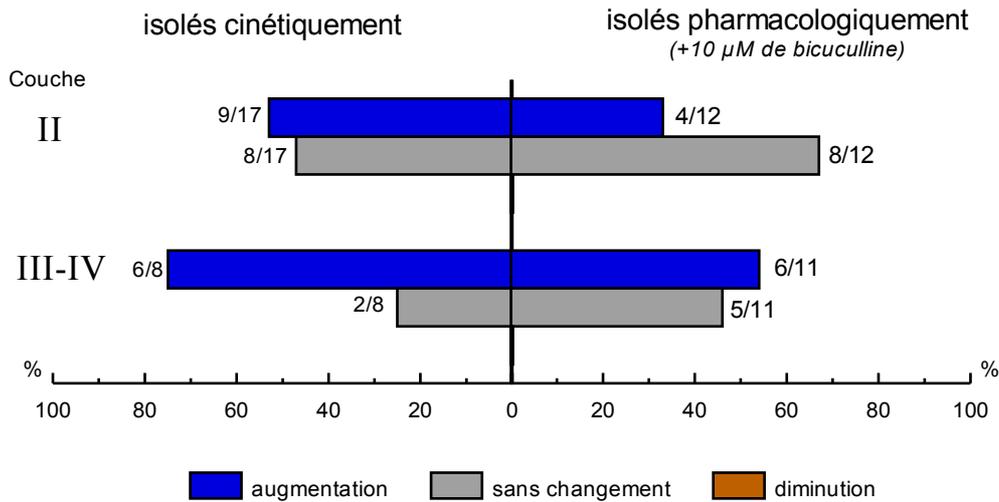
Nos résultats concernant les sCPSE confirment que seule une sous-population de neurones de la couche II reçoit des informations directement à partir des afférences nociceptives exprimant les récepteurs TRPV1. Ils montrent également que les afférences nociceptives exprimant TRPV1 ne projettent pas directement vers les couches III-IV et V.

Ainsi, les augmentations de fréquence des sCPSE observées dans les couches III-IV et V, ainsi que les changements de fréquence des sCPSI dans l'ensemble des couches II à V, dépendent de l'activation préalable de neurones de la couche II. Ces résultats indiquent l'existence d'un réseau polysynaptique transférant l'information nociceptive de la couche II vers les couches profondes (III-V) sous la forme d'une stimulation des transmissions synaptiques excitatrices et inhibitrices. Les augmentations de fréquence des sCPSI induites par l'application de capsaïcine concernaient à la fois la transmission GABAergique et la transmission glycinergique. De plus, lorsqu'un neurone reçoit à la fois des entrées glycinergiques et GABAergiques, l'augmentation de fréquence des deux types de sCPSI est similaire. Ceci indique qu'un mécanisme commun est à l'origine de l'augmentation de ces deux types de transmissions synaptiques.

6. Recrutement des transmissions inhibitrices suite à l'activation des afférences TRPV1

L'application de capsaïcine induit à la fois une augmentation de la transmission GABAergique et de la transmission glycinergique. Nous avons voulu savoir s'il existait des différences dans les modes de recrutement des interneurons GABAergiques et glycinergique suite à l'application de capsaïcine. Pour cela, nous avons enregistré des neurones des couches II et III-IV et appliqué de la capsaïcine en présence de bloquants de la transmission GABAergique pour isoler la transmission glycinergique ou soit en présence de bloquant de la transmission glycinergique pour isoler la transmission GABAergique, nous avons enregistré des neurones des couches II et III-IV et appliqué de la capsaïcine.

sCPSI Glycine



sCPSI GABAergique

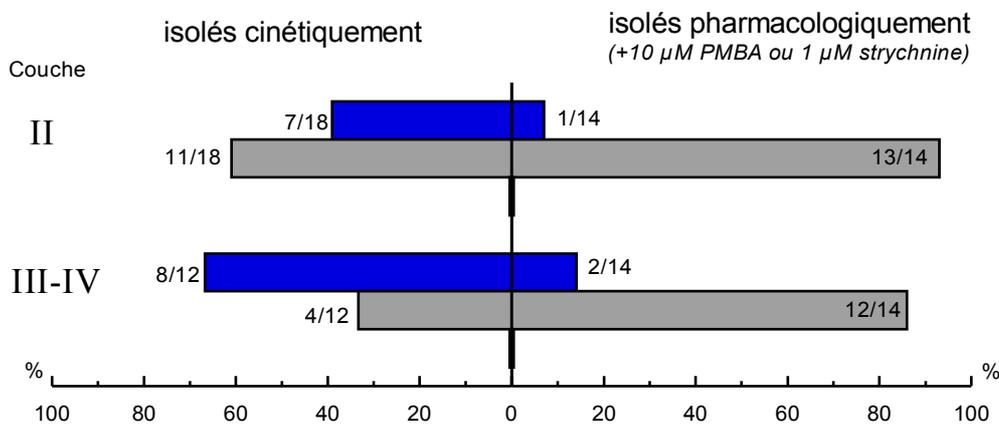


Figure 21. Comparaison des effets de l'application de capsaïcine sur les transmissions inhibitrices rapides isolées pharmacologiquement ou identifiées par leurs caractéristiques cinétiques.

La fraction des neurones enregistrés ayant présenté une augmentation, pas de changement ou une diminution de la fréquence des courants postsynaptiques inhibiteurs spontanés (sCPSI) suite à l'application de capsaïcine est indiquée pour chaque couche condition d'enregistrement. La partie gauche correspond aux neurones pour lesquels la présence de sCPSI glycine (haut) ou de sCPSI GABA (bas) a été révélée par l'analyse des τ_D . La partie droite correspond aux neurones enregistrés soit en présence de bicuculline (10 μM) pour isoler les sCPSI glycine (haut), soit en présence de bloquants des récepteurs de la glycine (PMBA (10 μM) ou strychnine (1 μM)) pour isoler les sCPSI GABA. Dans le cas des sCPSI GABAergiques, la proportion de neurones présentant une augmentation de fréquence des sCPSI isolés pharmacologiquement est significativement plus faible que celle des sCPSI GABAergiques isolés sur les critères cinétiques (tableau de contingence, $p = 0,04$ et $p = 0,03$). La différence n'est pas significative pour les sCPSI glycinergiques ($p = 0,23$ et $p = 0,66$).

a) Effet sur la transmission glycinergique

En présence de bicuculline (10 μ M), qui bloque la transmission GABAergique impliquant des récepteurs GABA_A, la capsaïcine a induit une augmentation de fréquence des sCPSI glycinergiques dans 33% (4/12) des neurones de la couche II et dans 55% (6/11) des neurones des couches III-IV. Ces proportions sont comparables à celles observées pour les neurones classés « glycine » et « GABA/glycine » dans la couche II (52%, 9/17) et dans les couches III-IV (75%, 6/8) en l'absence de bicuculline. Un test de table de contingence (TT) montre que ces proportions ne sont pas significativement différentes ($p = 0,23$ pour la couche II et $p = 0,66$ pour les couches III-IV; figure 21).

b) Effet sur la transmission GABAergique

Après blocage de la transmission glycinergique par de la strychnine (1 μ M) l'application de capsaïcine a induit une augmentation de fréquence des sCPSI GABAergiques dans une fraction très faible des neurones des couches II (11%, 1/9) et III-IV (17%, 1/6).

De même, après blocage spécifique des récepteurs de la glycine avec du PMBA (10 μ M), phenylbenzene ω -phosphono- α -amino acid (Saitoh et al., 1994) un antagoniste très spécifique des récepteurs de la glycine, l'application de capsaïcine a induit une augmentation de fréquence des sCPSI GABAergiques dans une faible proportion de neurones des couches III-IV (13%, 1/8), et n'a induit aucun changement de fréquence dans les neurones de la couche II ($n = 0/5$).

Lorsqu'on regroupe les résultats obtenus en présence de strychnine ou de PMBA on remarque que dans la couche II seuls 7% (1/14) des neurones ont présenté une augmentation de fréquence des sCPSI GABAergiques. Cette proportion est significativement différente de celle des neurones qui a eu une augmentation de sCPSI GABAergiques en l'absence de bloquant de la glycine (neurones classés « GABA/glycine » et « GABA »), soit 39% (7/18; test TT, $p = 0,04$). Dans les couches III-IV 14% (2/14) des neurones ont eu une augmentation des sCPSI GABAergiques, ce qui est significativement différent de la proportion de neurones (67%, 8/12) présentant une augmentation de la fréquence des sCPSI GABAergiques en l'absence de bloquants (test TT, $p = 0,03$).

Ainsi, le blocage des récepteurs de la glycine empêche l'augmentation de fréquence des sCPSI GABAergiques dans les couches II et III-IV suite à l'application de capsaïcine

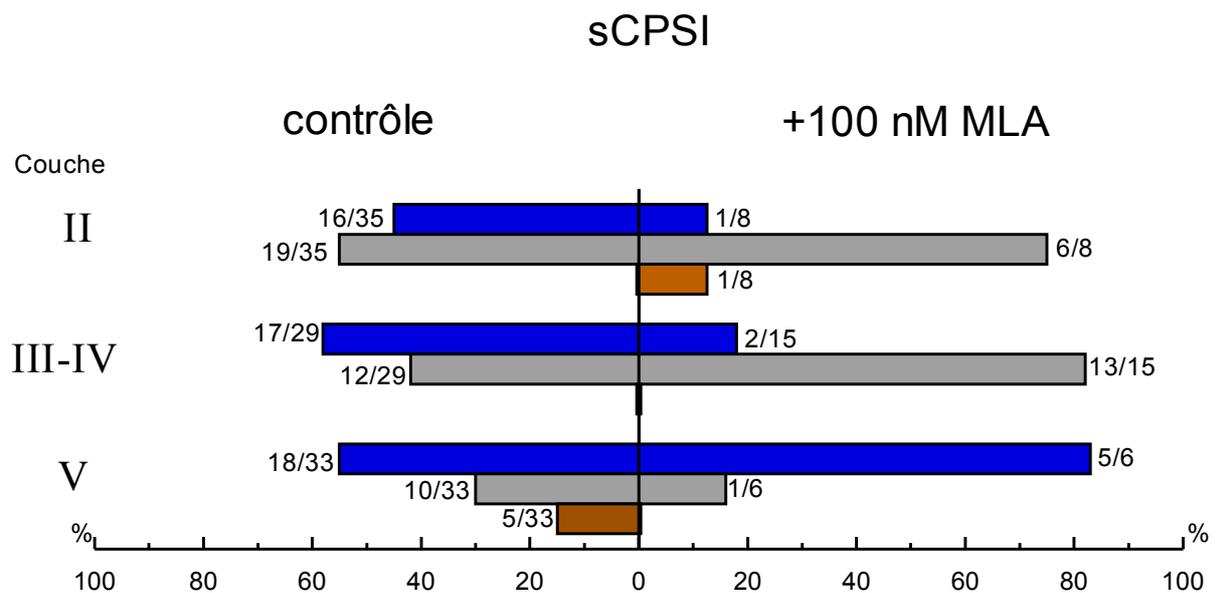
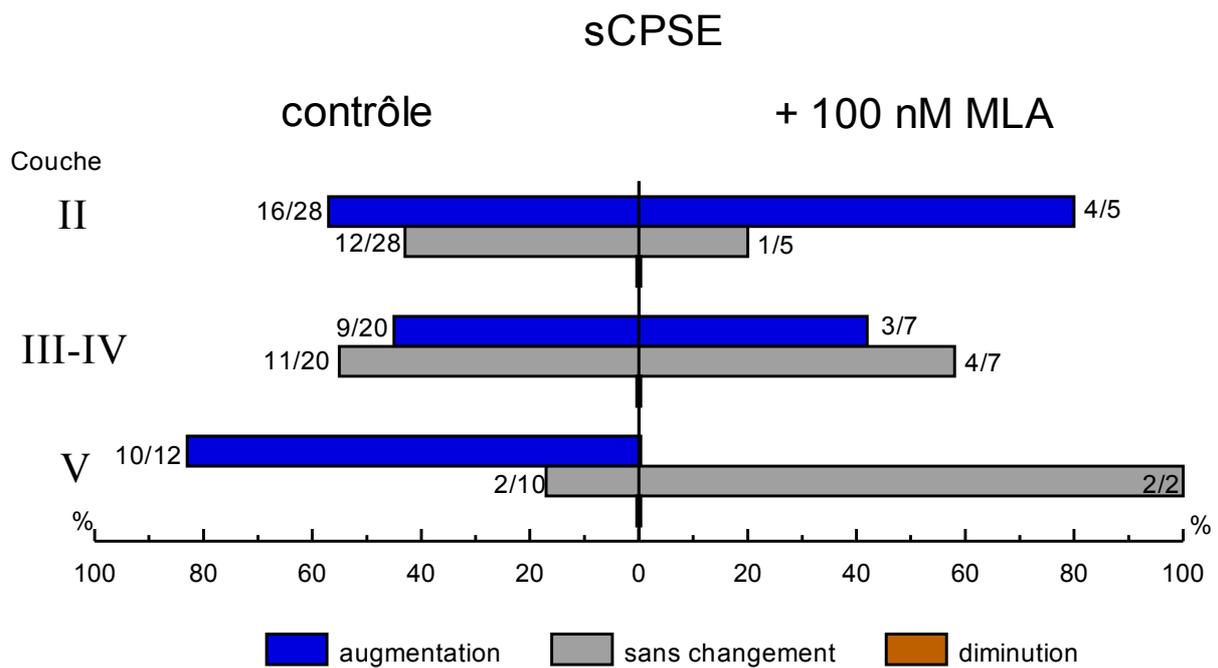


Figure 22. Effet de la capsaïcine en présence de methyllycaconitine (MLA, 100 nM), un antagoniste sélectif des récepteurs nicotiques $\alpha 7$.

La fraction de neurones ayant présenté une augmentation, aucun changement ou une diminution de fréquence des courants postsynaptiques spontanés inhibiteurs (sCPSI) suite à l'application de capsaïcine est indiquée pour chaque condition d'enregistrement. La partie à gauche représente les résultats obtenus en l'absence de MLA, celle de droite les proportions en présence de MLA (100 nM) dans le bain.

alors que le blocage des récepteurs GABA_A n'a pas d'incidence sur la proportion de neurones dans lesquels on observe une augmentation de la fréquence des sCPSI glycinergiques. Ces résultats sont résumés dans la figure 21.

7. Implication d'une transmission cholinergique dans l'effet de la capsaïcine

La strychnine est également un bloquant des récepteurs nicotiques $\alpha 7$ de l'acétylcholine (Matsubayashi et al., 1998; Renna et al., 2007). Nous avons donc voulu vérifier si l'effet de la strychnine impliquait aussi le blocage de récepteurs $\alpha 7$. Ainsi, nous avons caractérisé les effets de la stimulation des récepteurs TRPV1 par la capsaïcine en l'absence ou en présence de methyllycaconitine (MLA, 100 nM), un antagoniste sélectif des récepteurs $\alpha 7$.

En présence de MLA dans le milieu extracellulaire, seuls 13% (1/8) des neurones de la couche II ont présenté des augmentations de fréquence de sCPSI (figure 22).

Cette proportion est significativement différente de celle obtenue en absence de MLA, à savoir 45% (16/35 test de TT, $p < 0,0001$). Cette différence s'explique aussi par la présence d'une baisse de fréquence des sCPSI dans 13% (1/8) des neurones de la couche II suite à l'application de capsaïcine, alors que l'on ne détecte jamais de baisse de fréquence des sCPSI en l'absence de MLA. En présence de MLA, on observe dans 13% (2/15) des neurones des couches III-IV une augmentation de la fréquence des sCPSI suite à l'application de capsaïcine. Cette proportion est significativement différente de la proportion contrôle soit 58% (17/29 test de TT, $p = 0,004$). Dans la couche V, 83% ($n=5/6$) des neurones ont eu une augmentation de la fréquence des sCPSI suite à l'application de capsaïcine, mais aucun des neurones n'a présenté de baisse de fréquence suite à l'application de capsaïcine. Ces proportions sont significativement différentes de celles obtenues en l'absence de MLA soit 55% (18/33) d'augmentation et 15% (5/33) de baisse (test de TT, $p < 0,0001$).

En ce qui concerne la transmission excitatrice, la capsaïcine a induit des augmentations de fréquence des sCPSE dans 80% (4/5) des neurones de la couche II, et 43% (3/7) dans la couche III-IV. Ces proportions ne sont pas différentes de celles obtenues en absence de MLA, à savoir 57% pour la couche II (test de TT, $p = 0,34$) et 45% pour la couche III-IV (test de TT, $p = 0,63$) (figure 22).

L'ensemble de ces données suggère que les récepteurs nicotiques $\alpha 7$ sont impliqués dans le recrutement des interneurons inhibiteurs, mais pas des interneurons excitateurs,

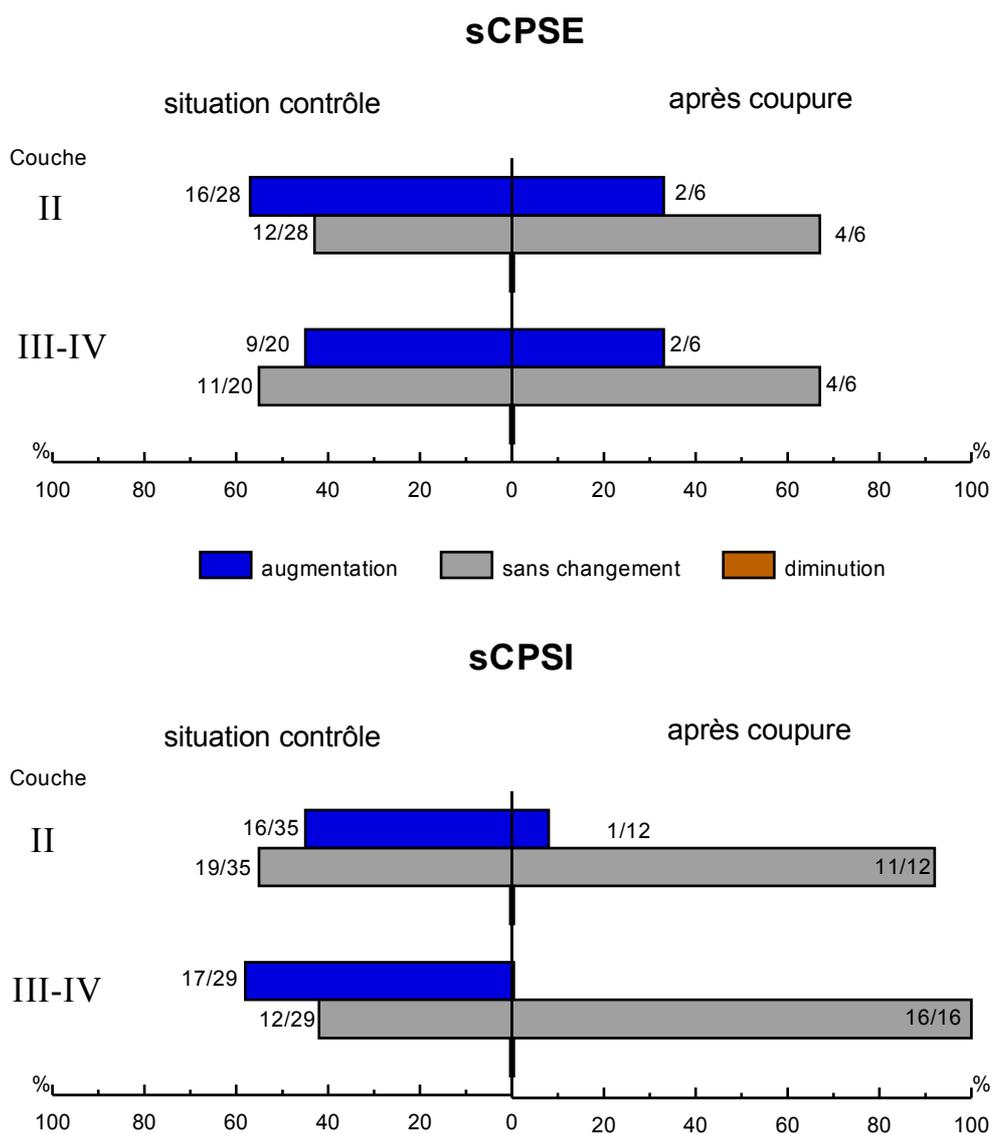


Figure 23. Effet de la capsaïcine sur des tranches de moelle épinière ayant subi une section mécanique entre les couches IV et V.

La fraction de neurones ayant présenté une augmentation, aucun changement ou une diminution de fréquence des courants postsynaptiques spontanés excitateurs (sCPSE) ou inhibiteurs (sCPSI) suite à l'application de capsaïcine est indiquée pour chaque condition d'enregistrement. La partie de gauche représente les neurones enregistrés en l'absence de section, celle de droite les neurones enregistrés après section entre les couches IV et V. Pour les sCPSE les proportions de neurones ne sont pas significativement différentes en absence de section ou après section. Une différence significative est observée dans le cas des sCPSI ($p = 0,02$ et $p < 0,0001$).

suite une à stimulation par la capsaïcine des afférences primaires exprimant le récepteur TRPV1

8. *Rôle de la couche V dans le contrôle de la transmission inhibitrice dans les couches II et III-IV*

La stimulation par la capsaïcine de la transmission GABAergique dans la couche II et dans les couches III-IV dépend fortement de l'activation de récepteurs de la glycine. Un tel phénomène, c'est-à-dire la stimulation d'une transmission synaptique inhibitrice par un neurotransmetteur inhibiteur, implique nécessairement l'existence d'un mécanisme de désinhibition. Ce phénomène d'inhibition d'un interneurone inhibiteur doit forcément se matérialiser par la diminution de la fréquence de sCPSI (GABAergiques et/ou glycinergiques) dans une sous-population de neurones au sein du réseau recruté par la capsaïcine. Un tel phénomène de désinhibition pourrait avoir lieu dans la couche V, puisque c'est la seule région de la CDME que nous avons étudiée dans laquelle nous avons observé une baisse de fréquence des sCPSI. En l'occurrence il s'agissait d'une diminution de la fréquence des sCPSI-glycine dans 15% (5/33) des neurones de la couche V. Si cette désinhibition observée dans la couche V est responsable de la modulation de la transmission inhibitrice dans les couches II et III-IV, il doit exister des relations synaptiques entre la couche V et les couches II et III-IV.

Pour vérifier l'existence d'un tel lien synaptique entre les neurones de la couche V et ceux des couches plus superficielles, nous avons réalisé, sous loupe binoculaire, une section mécanique à l'aide d'une lame de rasoir entre les couches IV et V. Après section, l'application de capsaïcine a induit une augmentation de fréquence des sCPSE dans 33% (2/6) neurones dans la couche II et dans 33% (2/6) des neurones des couches III-IV. Ces proportions ne sont pas significativement différentes de celles observées dans les mêmes couches dans les tranches de ME sans section à savoir 57% dans la couche II et 45% dans les couches III-IV (test TT, $p = 0,27$ et $p = 0,49$; figure 23).

Par contre, après section entre les couches IV et V, seule une faible proportion (8%, 1/12) des neurones de la couche II présentait encore une augmentation de fréquence des sCPSI suite à l'application de capsaïcine. De plus cette augmentation concernait exclusivement des sCPSI GABAergiques. Cette proportion est significativement différente de la proportion contrôle de 45% en l'absence de section (test de TT, $p = 0,02$). Dans les mêmes conditions, aucune variation de fréquence des sCPSI n'a été observée dans les neurones des

couches III-IV (0/16), alors que dans les tranches intactes 58% des neurones présentaient une augmentation de fréquence des sCPSI; cette différence de proportion est significative (test de TT, $p < 0,0001$; figure 23).

Ces résultats suggèrent que l'augmentation de fréquence des sCPSI GABAergiques et glycinergiques dans les neurones des couches III-IV, et celle de la transmission glycinergique et d'une partie de la transmission GABAergique dans la couche II, nécessitent un relais neuronal situé dans une couche plus profonde que la couche IV, probablement dans la couche V.

9. Conclusion

L'application de capsaïcine induit une augmentation de la fréquence de sCPSI des neurones des couches II et III-IV. Cette augmentation de fréquence dépend de l'activation de récepteurs de la glycine et de récepteurs nicotiques $\alpha 7$ de l'acétylcholine. De plus cette augmentation implique un mécanisme de désinhibition situé dans les couches plus profondes que la couche IV, et probablement dans la couche V.

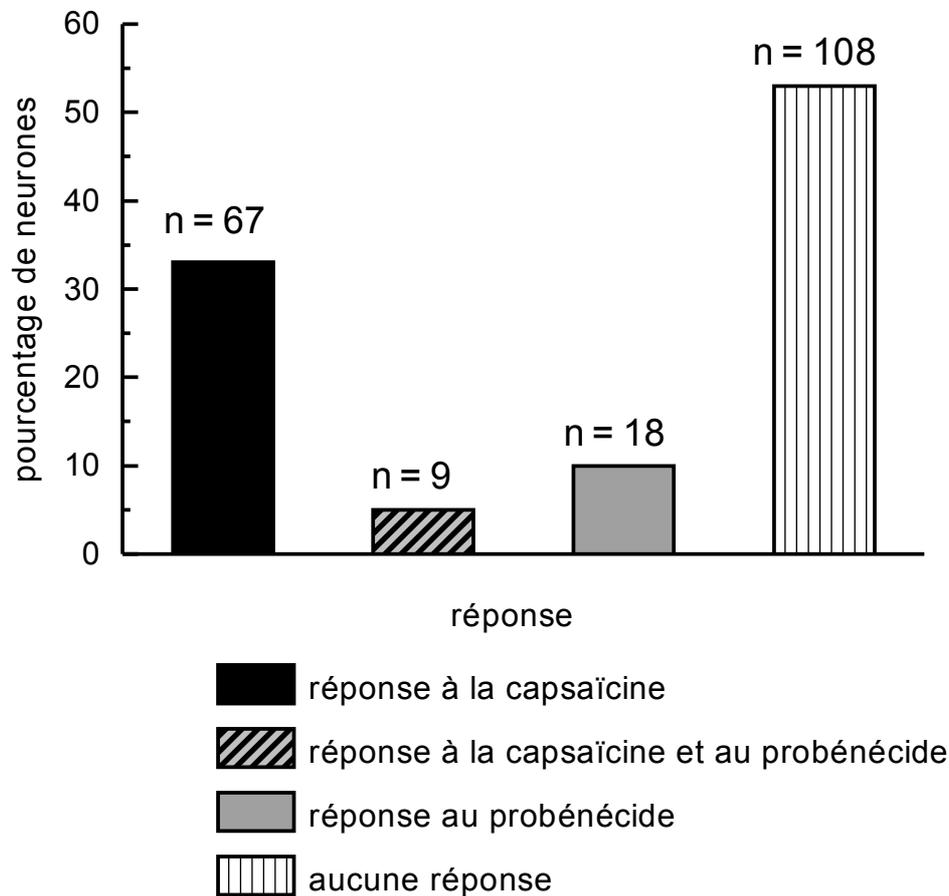


Figure 24. Imagerie du calcium intracellulaire dans les neurones des ganglions rachidiens de rats âgés de 21-25 jours.

Les neurones (n = 202) de cultures de DRG (n = 10) de rats ont été exposés à des applications de capsaïcine (1 μ M, 2 s) et de probénécide (100 μ M, 10 s). Près de la moitié des neurones répondent par une augmentation de calcium intracellulaire soit après application de capsaïcine uniquement (barre noire), soit uniquement après application de probénécide (barre grise), soit, pour certains, suite à l'application de capsaïcine ou de probénécide (barre hachurée).

III. Effet de la stimulation des canaux TRPV2

L'intégration des informations provenant des afférences TRPV1 dans la CDME fait intervenir des augmentations de fréquence de sCPSE et sCPSI dans les couches II, III-IV et V de la CDME. Nous avons voulu savoir si cela était aussi le cas pour d'autres afférences sensorielles primaires (ASP). Un contingent d'ASP, n'exprimant pas TRPV1, exprime par contre des canaux TRPV2 notamment au niveau de leurs terminaisons centrales. Ces fibres sont myélinisées et se caractérisent aussi par des projections centrales vers les couches III-IV de la CDME et sont impliquées dans la mécanoeception (Lawson et al., 2008).

Le canal TRPV2 est activable par un agoniste spécifique, le probénécide (Bang et al., 2007). Nous avons voulu savoir si les fréquences des sCPSE et des sCPSI des neurones des couches II, III-IV et V pouvaient être modulées par l'activation de TRPV2. Puis nous avons essayé de déterminer si les neurones appartenant au réseau de traitement de l'information dépendant de l'activation des fibres exprimant TRPV1 appartiennent également au réseau dépendant de l'activation des fibres exprimant TRPV2.

1. *Distribution des canaux TRPV2 dans les DRG*

Chez la souris adulte, des études en imagerie du calcium intracellulaire sur des cultures primaires de neurones de ganglions trijumeaux révèlent que l'activation fonctionnelle des canaux TRPV1 et TRPV2 se traduit par des augmentations du calcium libre intracellulaire suite à l'application de capsaïcine ou de probénécide. En utilisant cette approche, nous avons voulu savoir comment se répartissait l'expression de TRPV1 et TRPV2 parmi les neurones de DRG de rats mâles âgés de 21-26 jours (figure 24).

L'étude en imagerie du calcium libre intracellulaire a porté sur 403 cellules de DRG dans des cultures (n = 10) âgées de 12 à 48 heures. Pour confirmer que les cellules enregistrées étaient des neurones, nous avons appliqué localement un milieu extracellulaire contenant 50 mM K⁺ pendant 2 secondes. Dans le cas d'une membrane dont la perméabilité au repos est dominée par les ions K⁺, cette multiplication par 10 de la concentration externe de K⁺ induit théoriquement une dépolarisation de l'ordre de 60 mV, suffisante pour activer les canaux Ca²⁺ sensibles au potentiel. Les cellules qui ont eu une augmentation de calcium intracellulaire qui dure au moins 10 secondes suite à l'application de KCl sont considérées

comme étant des neurones. Les autres cellules sont classées comme étant des cellules non neuronales. La répartition des types cellulaires dans notre échantillon était : 51% de neurones (202/403) et 49% (201 /403) de cellules non neuronales. Pour mettre en évidence l'expression fonctionnelle de récepteurs TRPV1 une application de capsaïcine (500 nM pendant 4 s) a été effectuée. Une application de probénécide (100µM pendant 10 s) permet de mettre en évidence l'expression fonctionnelle des récepteurs TRPV2. Chaque application est espacée au minimum de 5 minutes pour limiter les phénomènes de désensibilisation des récepteurs et permettre une bonne reproductibilité des réponses (figure 24). Aucune cellule non neuronale n'a répondu à la capsaïcine et une seule (1/201) a répondu au probénécide. Dans 54% (108/202) des neurones nous n'avons observé aucune augmentation transitoire de la concentration de calcium intracellulaire suite à l'application de capsaïcine ou de probénécide. Dans 33% des neurones (67/202) seule la capsaïcine a produit une augmentation de calcium intracellulaire. Dans 9% (18/202) des neurones seule l'application de probénécide a produit une augmentation de calcium intracellulaire. Parmi les 202 neurones testés, 4% (9/202) ont répondu à la fois à la capsaïcine et au probénécide.

Ces résultats suggèrent l'existence de fibres sensorielles exprimant soit uniquement TRPV1, soit uniquement TRPV2, et qu'un sous-contingent de fibres sensorielles exprime à la fois TRPV1 et TRPV2.

2. Effet de la stimulation des canaux TRPV2 sur les transmissions synaptiques rapides

a) Transmission excitatrice

L'application de probénécide (500 µM pendant 90 secondes) n'a pas induit de changement de fréquence des sCPSE dans les neurones de la couche II (14/14). Par contre dans 50% (5/10) des neurones des couches III-IV et 100% (7/7) de ceux de la couche V, l'application de probénécide a induit une augmentation de fréquence des sCPSE. Nous n'avons jamais observé de baisse de fréquence des sCPSE. Aucune variation de fréquence des mCPSE n'a été détectée suite à l'application de probénécide pour les neurones des couches II (2/2), III-IV (4/4) ou V (5/5).

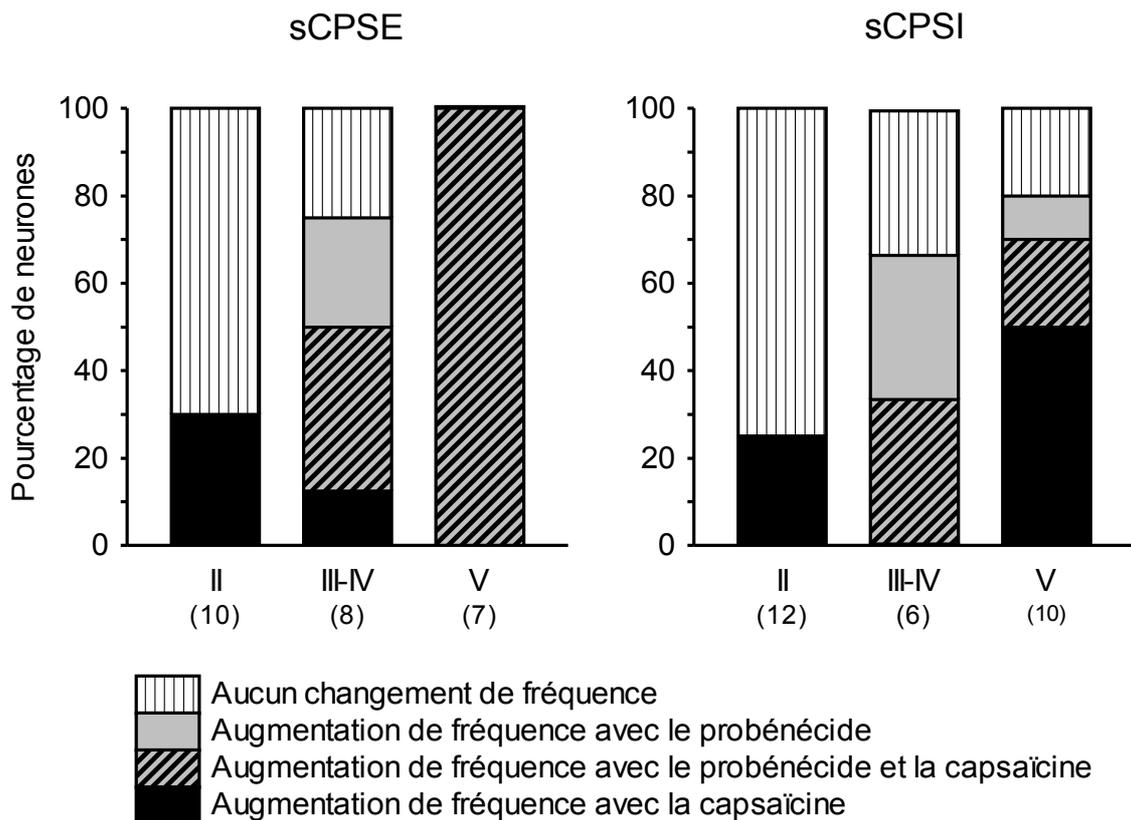


Figure 26. Co-activation des neurones de la CDME par l'application de probénécide et de capsaïcine.

La proportion des neurones présentant une augmentation de fréquence des sCPSE (colonne de gauche) ou des sCPSI (colonne de droite) est représentée en fonction des agonistes utilisés pour les stimuler. La proportion de neurones répondant uniquement à l'application de capsaïcine est représentée en noir, et celle répondant uniquement au probénécide en gris. Les barres hachurées en oblique correspondent à la proportion de neurones répondant à la fois à l'application de probénécide et de capsaïcine. Les barres hachurées verticalement indiquent la proportion de neurones ne présentant aucune réponse. Dans ces expériences il n'a jamais été observé de baisse de fréquence des sCPSE et sCPSI suite à l'application de capsaïcine ou de probénécide.

Remarque : les concentrations de probénécide utilisées lors des expériences d'imagerie du calcium et d'électrophysiologie ne sont pas les mêmes car les systèmes d'application sont différents (voir Matériels et Méthodes).

b) Transmission inhibitrice

L'application de probénécide n'a pas induit de changement de fréquence des sCPSI dans les neurones de la couche II (13/13). Par contre dans 57% (4/7) des neurones des couches III-IV et 27% (3/11) de ceux de la couche V, l'application de probénécide a induit une augmentation de fréquence des sCPSI. Nous n'avons jamais observé de baisse de fréquence de sCPSI. Aucune variation de fréquence des mCPSI n'a été détectée suite à l'application de probénécide pour les neurones des couches II (4/4), III-IV (2/2) ou V (7/7) (figure 25).

c) Co-activation par la capsaïcine et le probénécide

Afin de déterminer si le neurone enregistré pouvait recevoir des informations provenant non seulement des afférences TRPV2, mais aussi des afférences TRPV1, nous avons appliqué successivement le probénécide et la capsaïcine (figure 26).

Couche II

Aucun neurone de la couche II, sensible (3/10) ou non (7/10) à la capsaïcine, n'a répondu à l'application de probénécide par une augmentation de fréquence des sCPSE (0/10) ou de sCPSI (0/12, dont 3/12 étaient sensibles à la capsaïcine) (figure 26).

Couches III-IV

Dans les couches III-IV, 13% (1/8) des neurones ont présenté une augmentation des sCPSE suite à l'application de capsaïcine, 37,5% (3/8) après application de probénécide et de capsaïcine, et 25% (2/8) suite à l'application de probénécide. Un quart des neurones (2/8) n'a pas présenté de changement de fréquence des sCPSE en réponse à la capsaïcine ou au probénécide. Concernant la transmission inhibitrice dans les couches III-IV, 33% des neurones (2/6) ont montré une augmentation de fréquence des sCPSI suite à l'application du probénécide mais pas de la capsaïcine, et 33% (2/6) ont répondu à la fois au probénécide et à la capsaïcine. Un tiers des neurones (2/6) n'a pas montré de changement de fréquence des sCPSI, ni à la suite de l'application de probénécide, ni après l'application de capsaïcine. De

plus, nous n'avons jamais observé de situation où le neurone répondait exclusivement à la capsaïcine par une augmentation de fréquence des sCPSI (figure 26).

Couche V

Dans la couche V, tous les neurones testés (7/7) ont présenté une augmentation de la fréquence des sCPSE suite à l'application du probénécide et de la capsaïcine. En ce qui concerne les transmissions inhibitrices, 80% des neurones (8/10) ont présenté des augmentations de fréquence des sCPSI. De manière intéressante, dans la couche V certains neurones ont eu des augmentations de fréquence des sCPSI uniquement en réponse à l'un des deux agonistes, 50% (5/10) suite à l'application de la capsaïcine et 10% (1/10) suite à l'application du probénécide. Par ailleurs 20% des neurones (2/10) ont répondu à la fois au probénécide et à la capsaïcine par une augmentation de fréquence des sCPSI (figure 26).

Conclusion

Ces résultats indiquent que la stimulation des afférences primaires exprimant des récepteurs TRPV1 ou TRPV2 peuvent stimuler des transmissions excitatrices et inhibitrices dans les couches profondes de la CDME. Certains de ces neurones sont communs à un même réseau de la CDME et répondent par une augmentation de fréquence des sCPSI ou des sCPSE suite à la stimulation des afférences exprimant TRPV1 ou TRPV2. De manière intéressante, les neurones de la couche II ne reçoivent aucune information synaptique excitatrice ou inhibitrice après stimulation des afférences sensorielles exprimant les récepteurs TRPV2.

3. Effet des applications de probénécide en présence de MLA

Nous avons pu mettre en évidence que l'activation des récepteurs $\alpha 7$ nicotiniques permettait l'augmentation des sCPSI dans les couches II et III-IV suite à l'application de capsaïcine. Nous avons voulu savoir si des récepteurs $\alpha 7$ nicotiniques étaient impliqués dans le traitement de l'information sensorielle provenant des afférences TRPV2.

En présence de MLA, l'application de probénécide induit des augmentations de fréquences des sCPSE et des sCPSI dans 40% (2/5) et 42% (3/7) de neurones de la couche II. De plus, dans un faible contingent de neurones de la couche II (20%, 1/5), nous avons observé une baisse de fréquences des sCPSE. Des résultats préliminaires dans les couches III-IV montrent qu'aucun neurone n'a de variation de fréquence des sCPSE suite à l'application de probénécide (0/2), et que 50% (1/2) des neurones ont une augmentation de la fréquence des

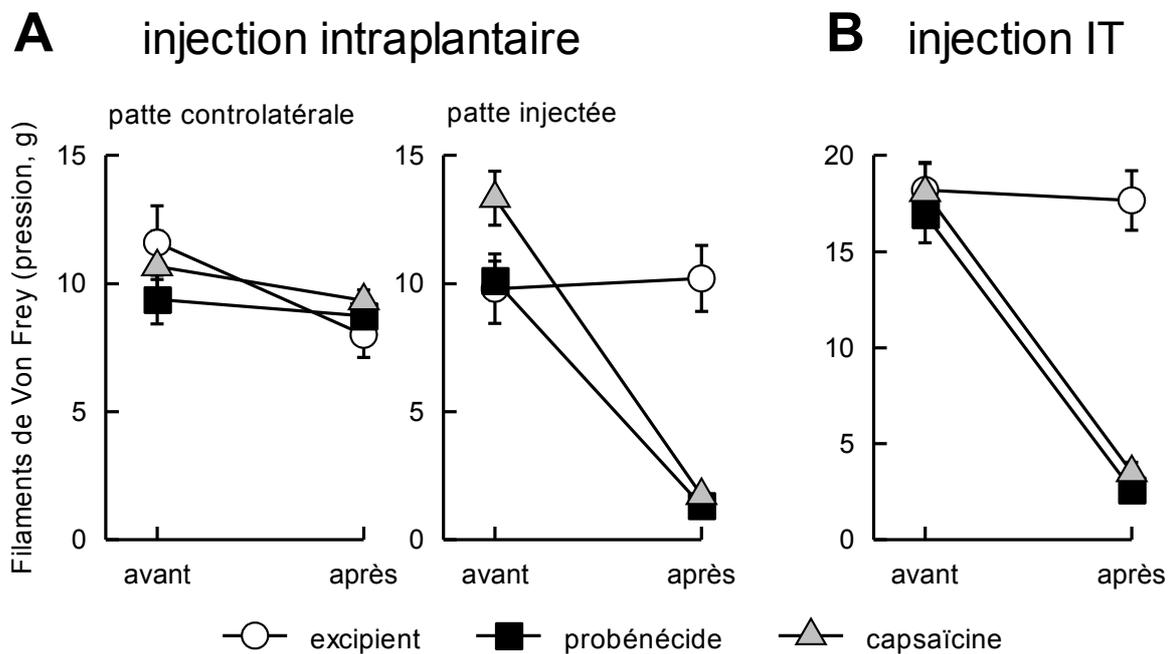


Figure 27. Effet de l'injection intraplantaire ou intrathécale de capsaïcine ou de probénécide sur la sensibilité mécanique nociceptive.

La sensibilité mécanique nociceptive est évaluée par le test des filaments de Von Frey. La valeur de la ligne de base est présentée par la colonne « avant » et les valeurs obtenues après l'injection par la colonne « après ». Chaque point représente la moyenne (\pm erreur-type) de la pression. **(A)** Dans le cas des injections intraplantaires (100 μ L), les deux pattes (controlatérale ou ipsilatérale à l'injection) ont été testées. Un groupe d'animaux ($n = 5$) a reçu une injection d'excipient, un deuxième groupe ($n = 6$) une injection de capsaïcine (1 mM) et un troisième ($n = 8$) une injection de probénécide (20 mM). Les deux substances ont induit une baisse significative et similaire du seuil de sensibilité nociceptive mécanique ($p < 0,001$). **(B)** Dans le cas des injections intrathécales (10 μ L), les deux pattes ont été testées et une moyenne des deux seuils de retrait a été calculée. Les animaux ont reçu une injection d'excipient ($n = 13$), de capsaïcine (50 μ M) ($n = 15$) ou de probénécide (20 mM) ($n = 16$). Les deux substances ont induit une baisse significative et similaire du seuil de sensibilité nociceptive mécanique ($p < 0,001$).

sCPSI. Par contre, dans la couche V, 66% (2/3) des neurones ont une augmentation de la fréquence des sCPSE et 66% (2/3) des neurones ont une augmentation de la fréquence des sCPSI suite à l'application de probénécide. Dans les couches III-IV et V il n'a jamais été observé de baisses de fréquence des sCPSE ou des sCPSI suite à l'application de probénécide.

4. Effets comportementaux induits par le probénécide et la capsaïcine

L'ensemble des résultats électrophysiologiques montrent que dans la CDME les afférences sensorielles exprimant TRPV1 ou TRPV2 activent des sous-réseaux distincts ou des sous-réseaux partiellement communs. Nous avons voulu déterminer si cette situation pouvait-être corrélée avec des manifestations comportementales, différentes ou communes, suite à l'injection intrathécale de capsaïcine ou de probénécide.

L'injection intraplantaire ou intrathécale de capsaïcine chez le rat induit une hyperalgésie thermique et une allodynie mécanique (Simone et al., 1991). Les effets d'une injection périphérique et/ou centrale de probénécide n'ont jamais été étudiés chez le rat *in vivo*. Par conséquent, nous avons comparé les effets induits par le probénécide et par la capsaïcine suite à leur injection intraplantaire ou intrathécale chez des rats mâles Sprague-Dawley âgés de 4 semaines dans des tests nociceptifs thermiques et mécaniques.

a) Effet d'injections intrathécales

Sensibilité mécanique

La sensibilité mécanique a été évaluée à l'aide de filaments de Von Frey avant et après l'injection intrathécale des différentes substances. L'injection d'excipient (n = 13) n'a pas induit de changement significatif de sensibilité mécanique. La valeur (\pm erreur-type) des seuils mécaniques était de $18,1 \pm 1,4$ g avant l'injection et de $17,7 \pm 1,5$ g après l'injection de l'excipient. La différence observée n'est pas significative (test de Wilcoxon, $p = 0,78$). L'injection de probénécide (n = 16) a induit une baisse significative du seuil mécanique de $16,9 \pm 1,5$ g à $2,3 \pm 0,4$ g (test de Wilcoxon, $p < 0,001$). La capsaïcine a également produit un abaissement significatif des seuils mécaniques de $18,1 \pm 3,5$ g à $1,5 \pm 0,5$ g (test de Wilcoxon, $p < 0,001$) (figure 27).

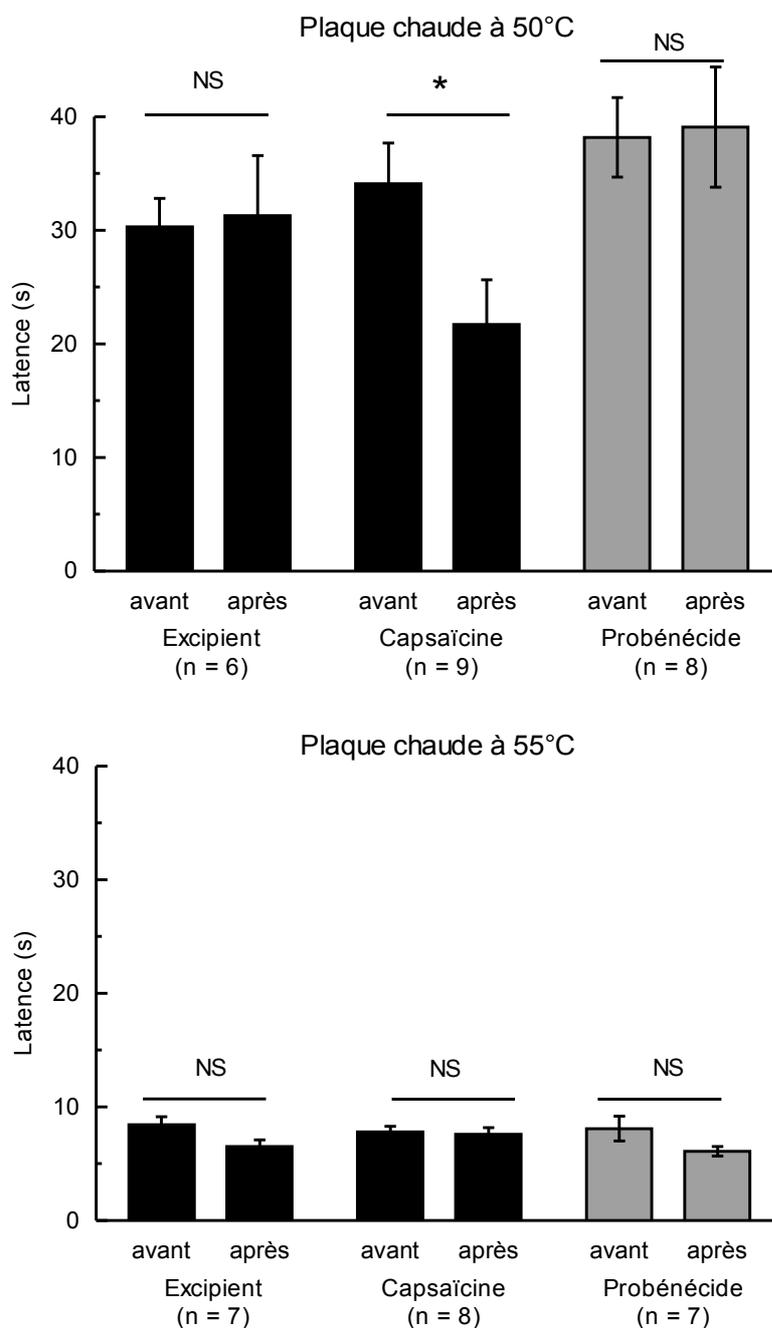


Figure 28. Evaluation de la sensibilité nociceptive thermique au chaud suite à l'injection intrathécale de capsaïcine ou de probénécide.

Après avoir déposé l'animal sur la plaque chaude, on mesure le temps de latence (s) qui s'écoule avant l'apparition d'un comportement de léchage ou de saut. Chaque barre représente la moyenne (\pm erreur-type) des temps de latence pour un groupe d'animaux, avant ou après injection intrathécale (10 μ L) d'excipient, de capsaïcine (50 μ M) ou de probénécide (20 mM). Les diagrammes du haut et du bas représentent respectivement les données obtenues sur une plaque chaude à 50°C et sur une plaque chaude à 55°C. NS : différence non significative ; * : $p < 0,05$.

Sensibilité thermique

Les résultats sont analysés avec une ANOVA à deux facteurs.

La sensibilité thermique nociceptive au chaud a été évaluée grâce au test de la plaque chaude. Deux températures ont été utilisées, 50°C et 55°C. A 55°C, les temps de latence de réaction nociceptive (léchage, sursaut) moyens sont compris entre 6 et 9 secondes. Il n'y a pas de différences significatives dans les valeurs des temps de latence entre les différents groupes et avant et après injection IT d'excipient, de capsaïcine ou de probénécide ($p > 0,05$) (figure 28).

A 50°C, les temps de latence moyens sont compris entre 30 et 40 secondes. Le groupe qui a reçu une injection d'excipient passe d'un temps de latence moyen de $30,2 \pm 2,5$ à $31,3 \pm 5,3$ secondes ($n = 6$, test de Wilcoxon, $p = 0,67$), ce qui n'est pas significativement différent. Suite à l'injection de probénécide ($n = 8$), il n'y a pas de différence significative entre les temps moyens de latence, $38,3 \pm 3,5$ et $39,1 \pm 5,3$ secondes (test de Wilcoxon, $p = 0,86$). Dans le cas de l'injection de capsaïcine, le temps moyen de latence est significativement réduit; il passe de $34,1 \pm 1,4$ à $21,7 \pm 3,8$ secondes ($p = 0,03$). Les moyennes des temps de latence ne sont pas significativement différentes les unes des autres ($p > 0,05$), sauf celle du groupe capsaïcine après injection ($p = 0,012$) (figure 28).

b) Effet d'injections intraplantaire

Suite à l'injection intraplantaire des différentes substances, les animaux sont testés avec les filaments de Von Frey. L'injection intraplantaire d'excipient ($n = 5$) n'a pas induit de changement significatif de sensibilité mécanique (test de Wilcoxon, $p = 0,78$). Le seuil de retrait est de $9,8 \pm 1,4$ g en conditions contrôle et de $10,2 \pm 1,3$ g après l'injection d'excipient. Dans le cas de l'injection de probénécide ($n = 8$), la valeur moyenne des seuils mécaniques est passée de $10,1 \pm 0,8$ g à $1,3 \pm 0,1$ g. Cette baisse est importante et significative (test de Wilcoxon, $p < 0,011$). En ce qui concerne l'injection de capsaïcine, elle a également induit une baisse importante et significative de sensibilité mécanique des seuils. La valeur moyenne du seuil mécanique est passée de $13,3 \pm 1,1$ g à $1,7 \pm 0,2$ g, (test de Wilcoxon, $p = 0,026$). Ces données indiquent que l'activation des canaux TRPV1 et TRPV2 présents sur les terminaisons périphériques des afférences nociceptives induit une allodynie mécanique (figure 27).

Conclusion

Le probénécide, comme la capsaïcine, induisent des effets comparables sur la sensibilité mécanique qu'ils soient injectés dans la voûte plantaire en périphérie ou de manière intrathécale. L'activation des récepteurs TRPV1 ou TRPV2, par la capsaïcine et le probénécide, induit une allodynie mécanique importante. Par contre seule l'activation des récepteurs TRPV1, mais pas celle des récepteurs TRPV2, conduit à la mise en place d'une hyperalgésie thermique au chaud.

Discussion

Les résultats que nous avons obtenus apportent un certain nombre d'éléments nouveaux concernant le fonctionnement des réseaux de neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (CDME), à savoir :

- L'existence d'un transfert de l'information nociceptive de la couche II vers les couches profondes III-IV et V sous la forme d'une augmentation de la transmission excitatrice. Il faut noter que de telles relations fonctionnelles entre la couche II et les couches III-IV n'avaient pas été décrites auparavant.
- Une augmentation de la transmission inhibitrice GABAergique et glycinergique dans toutes les couches de la CDME suite à une stimulation des afférences primaires exprimant TRPV1. Nos résultats suggèrent fortement que cette augmentation est contrôlée par :
 - l'activation d'interneurones cholinergiques qui libèrent de l'acétylcholine agissant sur des récepteurs $\alpha 7$ nicotiniques.
 - un mécanisme de désinhibition se situant dans les couches profondes (plus profondes que la couche IV).
 - la mise en jeu de récepteurs-canaux de la glycine.
- Une remontée de l'information des couches profondes vers les couches superficielles, sous la forme d'une augmentation de la transmission inhibitrice.

Ainsi, l'ensemble de nos données indique l'existence d'interactions réciproques entre couches superficielles et profondes dans le traitement de l'information nociceptive. Par ailleurs les informations nociceptives provenant des afférences TRPV1 et TRPV2 sont traitées par un réseau de neurones en partie commun aux deux types d'afférences, mais également par des réseaux propres à chacune d'entre elles. De manière intéressante, l'activation des afférences TRPV2 n'induit aucun changement de la transmission synaptique excitatrice ou inhibitrice dans la couche II et le degré de convergence des informations provenant des afférences TRPV1 et TRPV2 augmente en allant des couches superficielles vers les couches profondes. Ceci est particulièrement marqué dans les couches III-IV et V.

Ces propriétés d'intégration au niveau de la CDME peuvent être mises en relation avec les effets comportementaux induits par l'activation des afférences sensorielles qui expriment au niveau central TRPV1 et TRPV2. En effet, l'injection de capsaïcine, un agoniste TRPV1, induit une hyperalgésie thermique et une hyperalgésie mécanique, alors que l'injection de probénécide, un agoniste TRPV2, ne provoque que la mise en place d'une hyperalgésie mécanique.

Dans les pages qui suivent, nous allons placer nos résultats dans le contexte de la littérature scientifique et nous allons discuter de leurs rôles éventuels dans le traitement de l'information nociceptive par les réseaux de neurones de la CDME.

1. Transmissions excitatrice et inhibitrice dans la CDME.

Nos résultats confirment que tous les neurones des couches II-V de la CDME reçoivent des entrées excitatrices glutamatergiques qui activent des récepteurs de type AMPA/kainate. En effet, l'ensemble des sCPSE enregistrés sont bloqués par l'acide kynurénique (2 mM) ou le CNQX (10 μ M), deux antagonistes des récepteurs AMPA/kainate du glutamate. En ce qui concerne la transmission inhibitrice, nous confirmons également l'existence de transmissions GABAergique et glycinergique dans l'ensemble des couches II à V.

1. Etude des fréquences moyennes des sCPSE et des sCPSI

L'étude des moyennes des fréquences des CPSE et CPSI en condition contrôle démontre qu'il existe des différences significatives entre les couches de la CDME (voir résultats, figure 11). Les neurones de la couche II se distinguent de ceux des autres couches par des fréquences de CPSE et CPSI plus faibles. Dans les couches III-IV les valeurs de fréquences moyennes sont situées entre celles enregistrées dans la couche II et celles observées dans la couche V. Ces différences de fréquence pourraient s'expliquer par des degrés d'innervation synaptique différents entre les neurones des couches II, III-IV ou V ou par des différences dans les probabilités de libération des neurotransmetteurs à partir des terminaisons nerveuses au sein des différentes couches (Lu et Perl, 2005; Schneider, 2008). Les arborisations dendritiques des neurones de la couche II sont principalement confinées dans leur couche d'origine (Yasaka et al., 2010). Par contre, les arborisations dendritiques des neurones des couches profondes sont plus étendues et franchissent souvent les limites entre

les différentes couches. Ceci pourrait leur permettre de recevoir un plus grand nombre de contacts synaptiques (Brown, 1982).

De manière globale, le blocage par la TTX des canaux Na^+ responsables de la genèse des potentiels d'action diminue la fréquence des CPSE et des CPSI. Une partie des sCPSE et sCPSI observés dans la CDME pourrait donc dépendre de l'activité de décharge de potentiels d'action en l'absence de stimulation sensorielle. Cependant, la présence d'un effet de la TTX ne permet pas de conclure directement à l'implication de potentiels d'action, mais au moins à l'implication de dépolarisations membranaires dépendantes de l'ouverture de canaux Na^+ voltage-dépendants dont les amplitudes seraient suffisantes pour faciliter la libération synaptique de neurotransmetteurs.

2. Caractérisation des transmissions inhibitrices

Les transmissions inhibitrices dépendent au moins de deux neurotransmetteurs, le GABA et la glycine. Dans la littérature sur la CDME, les caractéristiques des transmissions inhibitrices ont été principalement étudiées sur des courants miniatures (i.e. enregistrés en présence de TTX, ce qui bloque l'activité des réseaux de neurones) et en présence de bloquants pharmacologiques pour isoler soit la transmission GABAergique, soit la transmission glycinergique.

Nous avons choisi de caractériser les propriétés des transmissions inhibitrices en l'absence de TTX et de bloquants pharmacologiques pour ne pas perturber le réseau, et dans le but de déterminer s'il existait des effets différentiels de la capsaïcine sur les transmissions GABAergiques et glycinergiques enregistrées dans un même neurone. Pour répondre à cette question, il a fallu tout d'abord mettre au point un système d'analyse permettant de séparer clairement les sCPSI-GABA et les sCPSI-glycine dans les neurones recevant les deux types d'entrées. Pour mettre au point cette analyse, nous avons comparé les propriétés de courants isolés pharmacologiquement à celles des courants enregistrés en l'absence de bloquants pharmacologiques. Dans notre approche la séparation entre les sCPSI-GABA et les sCPSI-glycine se fonde sur des différences dans les profils de distribution des constantes de temps de désactivation (τ_D) des sCPSI et non pas sur la valeur moyenne des τ_D des CPSI.

a) sCPSI glycine isolés pharmacologiquement

L'étude de la composante glycinergique isolée pharmacologiquement montre que dans la couche II, il existe deux familles de sCPSI-glycine. Les sCPSI-glycine rapides ont des τ_D inférieurs à 11 ms, alors que les sCPSI-glycine lents ont des τ_D supérieurs à 12 ms. Il est intéressant de noter que la population de sCPSI-glycine lents est absente dans les couches III-IV et V. De plus, dans la couche II, les neurones qui présentent des sCPSI-glycine lents présentent également et systématiquement des sCPSI-glycine rapides.

Les différences de cinétique des τ_D des sCPSI-glycine pourraient notamment s'expliquer par l'expression de la sous-unité $\alpha 3$ des récepteurs de la glycine dans certains neurones de la couche II. Cette sous-unité confère aux sCPSI-glycine des cinétiques de τ_D plus lentes (Rajalu et al., 2009). La sous-unité $\alpha 3$ n'étant pas exprimée dans les couches profondes, cela expliquerait pourquoi dans les couches III-IV et V on n'enregistre que des sCPSI glycine rapides (Harvey et al., 2004).

b) sCPSI GABA isolés pharmacologiquement

L'analyse des τ_D des sCPSI GABAergiques isolés pharmacologiquement met également en évidence l'existence de sCPSI-GABA rapides et de sCPSI-GABA lents. Contrairement aux sCPSI glycine rapides et lents, les deux types de courants GABA ne coexistent jamais dans un même neurone des couches II-V. Par contre, au sein d'une même couche (II ou III-V), on peut trouver des neurones ayant des sCPSI GABA lents ou des sCPSI GABA rapides (voir figure 12). Lors de la maturation postnatale de la CDME, une production tonique de neurostéroïdes $3\alpha 5\alpha$ réduits potentialise la transmission GABAergique en augmentant l'affinité des récepteurs $GABA_A$ pour le GABA (Keller et al., 2001; Inquimbert et al., 2008). Cette modulation disparaît après 14 jours postnataux pour les neurones des couches III-IV et après 21 jours pour les neurones de la couche II à cause de la diminution de production locale de neurostéroïdes $3\alpha 5\alpha$ réduits (Inquimbert et al., 2008). Nous avons observé des sCPSI-GABA lents à des stades de développement auxquels il n'y a plus de production locale de neurostéroïdes $3\alpha 5\alpha$ réduits suffisante pour potentialiser les récepteurs $GABA_A$ (Inquimbert et al., 2008). Le décours lent des sCPSI GABA est donc probablement dû à une autre cause.

Chez la souris âgée de 18 à 36 jours, il a également été décrit des mCPSI GABA rapides et lents pour les neurones de la couche II (Takahashi et al., 2006). Les τ_D des mCPSI-GABA lents sont augmentés en présence de Propofol (un anesthésique) ou de Midazolam (une benzodiazépine), alors que les τ_D des mCPSI-GABA rapides sont insensibles au Propofol et au Midazolam, suggérant que les compositions en sous-unités des récepteurs GABA_A qui sous-tendent ces deux types de sCPSI sont différentes. De manière intéressante, dans le thalamus deux populations de neurones se distinguant par les cinétiques de leurs mCPSI-GABA ont été décrites (Mozrzymas et al., 2007). La première population se caractérise par des τ_D lents (>25 ms) et exprimerait des récepteurs GABA_A constitués des sous-unités $\alpha 3$, $\beta 2$ et $\gamma 2$. L'autre population de neurones du thalamus se caractérise par des τ_D rapides (<25 ms) et correspondrait à la présence de récepteurs GABA_A constitués de l'assemblage des sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 2$ et $\gamma 2$. Dans la CDME, les neurones des couches I-V expriment majoritairement les sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 2$, $\beta 3$ et $\gamma 2$ du récepteur GABA_A, mais les neurones des couches III-IV expriment aussi la sous-unité $\alpha 1$ (Bohlhalter et al., 1996). Ainsi, la présence de τ_D GABA rapides et de τ_D GABA lents pourrait indiquer des compositions différentes en sous-unités GABA_A pour les neurones des couches II et III-IV de la CDME.

Les différences de cinétiques des sCPSI GABA pourraient également être dues à des états de phosphorylation différents des sous-unités $\beta 2$ ou $\beta 3$ par des protéines kinase différentes (PKA et PKC) (McDonald et al., 1998; Kittler et Moss, 2003).

c) sCPSI en l'absence de bloquants pharmacologiques

Il n'est pas possible de déterminer la nature (GABA ou glycine) des sCPSI en tenant juste compte d'une valeur seuil de τ_D pour séparer les sCPSI-glycine et les sCPSI-GABA. Nous avons établi une séparation avec plus de critères restrictifs. Ces critères portent sur les propriétés des distributions cumulées des τ_D des sCPSI (voir ci-dessus). Les résultats de la méthode d'analyse en composantes gaussiennes des τ_D ont mis en évidence trois types de neurones différents dans les différentes couches de la CDME (Tableau 7). Le premier type de neurone reçoit principalement des sCPSI-glycine, (« glycine »). Le second type de neurone (« GABA/glycine ») se caractérise par le fait qu'il reçoit à la fois des sCPSI-GABA et des

sCPSI-glycine dans des proportions plus ou moins équivalentes. Le troisième type de neurone reçoit principalement des sCPSI-GABA (« GABA »). En utilisant cette approche, nous concluons que les neurones des couches II et III-IV sont principalement sous inhibition spontanée GABAergique, alors que les neurones des couches V sont principalement sous inhibition spontanée glycinergique.

Ces résultats fonctionnels complètent des données de la littérature sur les connexions inhibitrices dans la CDME. En effet les connexions inhibitrices entre interneurons de la couche II sont uniquement GABAergiques (Lu et Perl, 2005), ce qui est cohérent avec l'absence de neurones glycinergiques, c'est-à-dire exprimant le transporteur neuronal de la glycine, GlyT2, dans cette couche (Zeilhofer et al., 2005; Hossaini et al., 2007). Les connexions inhibitrices internes aux couches III-IV utilisent à la fois le GABA et la glycine comme neurotransmetteurs (Schneider, 2008). Ceci est compatible avec la présence de neurones contenant du GABA et de la glycine dans ces couches (Todd et Spike, 1993) et avec la présence d'une forte population de neurones exprimant GlyT2 (Zeilhofer et al., 2005; Hossaini et al., 2007). Par conséquent, la transmission glycinergique observée dans la couche II proviendrait de neurones situés dans les couches plus profondes (III-V). Cette observation est également en accord avec nos résultats qui montrent que dans les couches superficielles l'augmentation de la transmission glycinergique suite à l'application de capsaïcine dépend des couches plus profondes puisqu'elle disparaît lorsqu'on pratique une section mécanique entre la couche IV et la couche V.

2. Stimulation sélective des afférences nociceptives

Notre objectif était de stimuler un contingent de fibres nociceptives sans stimuler de fibres non-nociceptives. Une telle stimulation peut par exemple être réalisée en utilisant un agoniste d'un récepteur exprimé seulement par des fibres nociceptives.

1. Avantage des stimulations pharmacologiques

Nous avons préféré l'utilisation d'une stimulation pharmacologique sélective plutôt que des protocoles de stimulation électrique des racines dorsales, car ces dernières recrutent les afférences sensorielles primaires (ASP) en fonction de leurs propriétés d'excitabilité plutôt que des modalités sensorielles qu'elles véhiculent. De plus, l'activation des fibres C par une

stimulation électrique ne peut se faire qu'après recrutement préalable des fibres de type A. Par ailleurs, il faut noter que toutes les fibres C et A δ ne sont pas des nocicepteurs et que 20% des fibres A β véhiculent des informations nociceptives (Djouhri et Lawson, 2004).

On peut distinguer différentes catégories d'ASP d'après les types de canaux TRP qu'elles expriment. L'application d'un agoniste sélectif d'un type de canal TRP, exprimé par une catégorie précise d'ASP, représente donc une méthode de stimulation plus sélective qu'une stimulation électrique pour recruter un type particulier de fibres sensorielles. De plus l'application de tels agonistes sélectifs permet de mimer une stimulation somatosensorielle *in vitro* sur des tranches aiguës de ME qui conservent des terminaisons centrales d'ASP fonctionnelles (Nakatsuka et al., 2002), ce qui s'avère particulièrement intéressant dans nos expériences d'électrophysiologie sur tranches aiguës de ME.

Dans notre étude nous avons choisi de stimuler deux types de nocicepteurs, l'un exprimant TRPV1 et l'autre exprimant TRPV2.

2. *Fibres afférentes exprimant TRPV1 et TRPV2*

a) TRPV1

Le canal TRPV1 est exprimé par un contingent de fibres de petit diamètre, majoritairement de type C, non peptidergiques et projetant vers la couche II externe (Guo et al., 1999). Le canal TRPV1 est activable par un agoniste sélectif, la capsaïcine (Caterina et al., 1997).

La stimulation chimique avec de la capsaïcine permet de recruter un contingent d'ASP comme le ferait une stimulation nociceptive de type chaleur nociceptive. En effet l'injection intradermale de capsaïcine chez l'humain est décrite comme procurant une sensation de brûlure (LaMotte et al., 1991; Willis, 2009). Les récepteurs TRPV1 sont exprimés à la fois aux terminaisons centrales et périphériques des neurones sensoriels primaires et leur activation conduit aux mêmes manifestations comportementales nociceptives (Spicarova et Palecek, 2008). La capsaïcine déclenche la mise en place d'une hyperalgésie thermique au chaud et d'une allodynie mécanique chez l'humain et le rat (Torebjork et al., 1992). Les résultats des tests nociceptifs que nous avons réalisés chez l'animal entier confirment que les

injections de capsaïcine en périphérie ou au niveau central induisent la même baisse des seuils nociceptifs mécaniques.

b) TRPV2

Le canal TRPV2 possède une homologie de séquence de 50% avec TRPV1 (Caterina et al., 1999). Il est exprimé par des ASP myélinisées de type A δ (et peut être A β) qui projettent principalement vers les couches III-IV (Lewinter et al., 2004). Le canal TRPV2 peut être sélectivement activé par le probénécide (Bang et al., 2007). L'homologie de séquence du canal TRPV2 avec le canal TRPV1 a conduit dans un premier temps à considérer que TRPV2 était un canal permettant de détecter les chaleurs nociceptives pour des températures supérieures à 52°C. Cette propriété a été mise en évidence *in vitro* sur des récepteurs TRPV2 recombinants (Caterina et al., 1999) mais n'a jamais été vérifiée physiologiquement *in situ*. Chez le rat adulte, le canal TRPV2 est trouvé dans les neurones sensoriels ayant des fibres myélinisées mais n'exprimant pas le canal TRPV1 (Lewinter et al., 2004). Dans une préparation peau-nerf-DRG-ME de souris, il a été montré que le récepteur TRPV2 est exprimé par 62% des fibres mécanosensibles myélinisées, qui sont par ailleurs insensibles à la chaleur, ainsi que par un faible contingent (16%) de nocicepteurs polymodaux (Lawson et al., 2008). Le canal TRPV2 est donc un bon marqueur des fibres mécanosensibles, alors que le canal TRPV1 est préférentiellement exprimé par des fibres sensibles au chaud nociceptif (Rau et al., 2007).

En accord avec ces considérations, nos données montrent qu'une injection intrathécale de probénécide, qui active sélectivement TRPV2, induit une allodynie mécanique sans indice détectable d'hyperalgésie thermique au chaud.

De manière intéressante, l'expression de canaux TRPV2 au niveau des terminaisons périphériques des neurones sensoriels viscéraux semble indispensable à la détection des changements osmotiques dans la cavité intestinale (Mihara et al., 2010) et d'autres études indiquent un rôle direct de TRPV2 dans la détection de distensions de la membrane cellulaire (Tominaga et Caterina, 2004). Ces données suggèrent que TRPV2 pourrait jouer un rôle dans l'osmosensibilité et la mécanotransduction dans les neurones sensoriels primaires viscéraux.

c) Coexistence de TRPV1 et TRPV2

Nous avons réalisé des expériences d'imagerie du calcium intracellulaire sur des cultures de DRG de rats âgés de plus de 21 jours et nous avons évalué les réponses de ces neurones à des applications de capsaïcine et de probénécide. Nos résultats suggèrent l'existence de contingents distincts de neurones sensoriels exprimant soit uniquement TRPV1

(33%), soit uniquement TRPV2 (9%). Cependant un très faible contingent (4%) de neurones répond à la fois à l'application de capsaïcine et de probénécide et coexprime donc TRPV1 et TRPV2. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus sur des neurones des ganglions trijumeaux de souris adultes chez lesquelles seul un faible contingent (2%) de neurones possède à la fois TRPV1 et TRPV2, alors que 40% des neurones expriment uniquement des canaux TRPV1 et 20% uniquement des canaux TRPV2 (Bang et al., 2007).

Au plan immunocytochimique il n'y a apparemment pas de coexistence de TRPV1 et TRPV2 sur les ASP chez le rat adulte (Lewinter et al., 2004). Cependant, TRPV2 semble jouer un rôle important dans le développement des neurones sensoriels durant la période embryonnaire et notamment dans le guidage des axones des ASP depuis les DRG vers la ME (Shibasaki et al., 2010). En effet, à E12,5, 90% des neurones des DRG expriment TRPV2, et aucun n'exprime TRPV1. Par contre, à partir de E14,5, parmi les neurones qui expriment TRPV2 (90% de la population totale), 30% expriment également TRPV1. A P0, l'expression de TRPV2 diminue (68% de neurones l'expriment), et la proportion de neurones qui coexpriment TRPV1 et TRPV2 passe à 40%. Il semble donc que TRPV2 soit nécessaire au bon développement des axones des neurones TRPV1 vers la CDME. Etant donné que chez la souris adulte (Lawson et al., 2008) et chez le rat âgé de 3 à 4 semaines (nos résultats) TRPV2 et TRPV1 sont essentiellement trouvés dans des populations de neurones sensoriels distinctes, on peut penser que les neurones coexprimant TRPV1 et TRPV2 sont une population particulière de neurones en lien avec un état de développement des ASP. En effet, la mise en place des projections des fibres TRPV1 vers la ME s'effectue jusqu'à P30 (Guo et al., 1999) et TRPV2 pourrait jouer un rôle dans ce processus. Ainsi, il est possible que le faible contingent de neurones de DRG (9%) coexprimant TRPV1 et TRPV2 chez le rat à P21-P25, et que nous avons mis en évidence dans nos expériences d'imagerie du calcium intracellulaire, corresponde à des neurones qui sont encore en train d'établir des contacts synaptiques avec des neurones de la CDME.

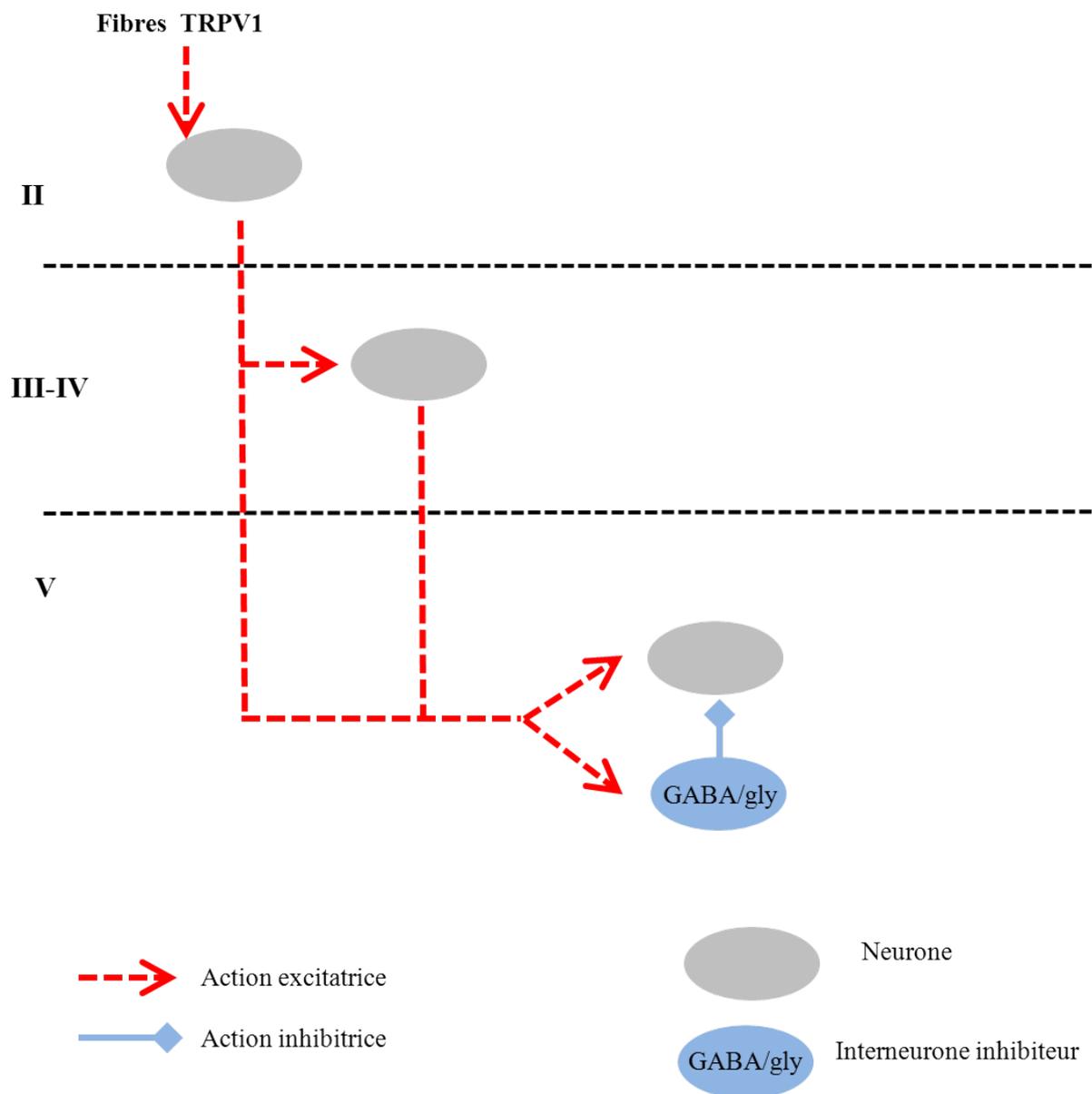


Figure 29. Voie TRPV1 excitatrice.

Les afférences primaires exprimant TRPV1 contacte spécifiquement des interneurons de la couche II. Un réseau polysynaptique excitateur transmet l'information nociceptive TRPV1 vers les couches III-IV et V.

(GABA = interneurone GABAergique, glycine = interneurone glycine, GABA /gly = d'interneurone inhibiteurs GABAergique et/ou glycinergique).

3. Effet de la stimulation de TRPV1

Dans nos expériences, la capsaïcine n'a jamais induit de courant entrant ou sortant mesurable (détectable) dans les neurones enregistrés ($n = 214$). Cette observation suggère que les neurones de la CDME n'expriment pas le récepteur TRPV1 au niveau de leur corps cellulaire. Par contre, nos expériences sur les CPSE et CPSI miniatures, enregistrés en présence de TTX (mCPSE et mCPSI), montrent qu'une sous-population de neurones (30%) de la couche II reçoit des entrées excitatrices à partir de neurones glutamatergiques qui expriment des récepteurs TRPV2 à leurs terminaisons synaptiques. Il est probable que ces terminaisons correspondent à des terminaisons d'ASP exprimant TRPV1 car ces données électrophysiologiques sont en accord avec les marquages immunocytochimiques qui montrent que TRPV1 est localisé principalement sur des ASP qui terminent dans les couches I-II (Guo et al., 1999). L'expression de TRPV1 par des neurones intrinsèques de la CDME est l'objet de controverses. Néanmoins, dans l'éventualité où certains interneurons glutamatergiques de la couche II exprimeraient TRPV1 à leurs terminaisons (Zhou et al., 2009), il est clair que ces interneurons ne projettent pas vers les couches III-V de la CDME, car nous n'avons jamais observé d'augmentation de fréquence des mCPSE dans les couches III-IV ou V suite à l'application de capsaïcine. Il a été suggéré qu'une sous-population d'interneurones pouvait exprimer TRPV1 dans un modèle de culture organotypique de ME de souris (Ferrini et al., 2010). Cependant une étude récente, utilisant des souris génétiquement modifiées pour exprimer des gènes rapporteurs sous le promoteur de TRPV1, montre que les neurones intrinsèques de la CDME n'expriment pas TRPV1 in situ (Cavanaugh et al., 2010).

L'ensemble de nos données montre que l'application de capsaïcine constitue un moyen de stimuler sélectivement des neurones de la couche II de la CDME sans stimuler directement des neurones des couches profondes (III-V).

Il faut souligner qu'en l'absence de TTX, 57%, 45% et 83% des neurones de couches II, III-IV et V présentent une augmentation de fréquence de sCPSE, ce qui indique que l'information nociceptive, acheminée par des fibres exprimant TRPV1 vers une sous-population de neurones de la couche II, est ensuite transmise par des interactions polysynaptiques excitatrices vers les couches III-IV et V (figure 29). Ces résultats montrent l'existence de relations synaptiques fonctionnelles entre la couche II et les couches plus profondes qui interviennent dans le traitement de l'information nociceptive provenant des ASP nociceptives exprimant TRPV1. Des relations fonctionnelles entre des neurones de la

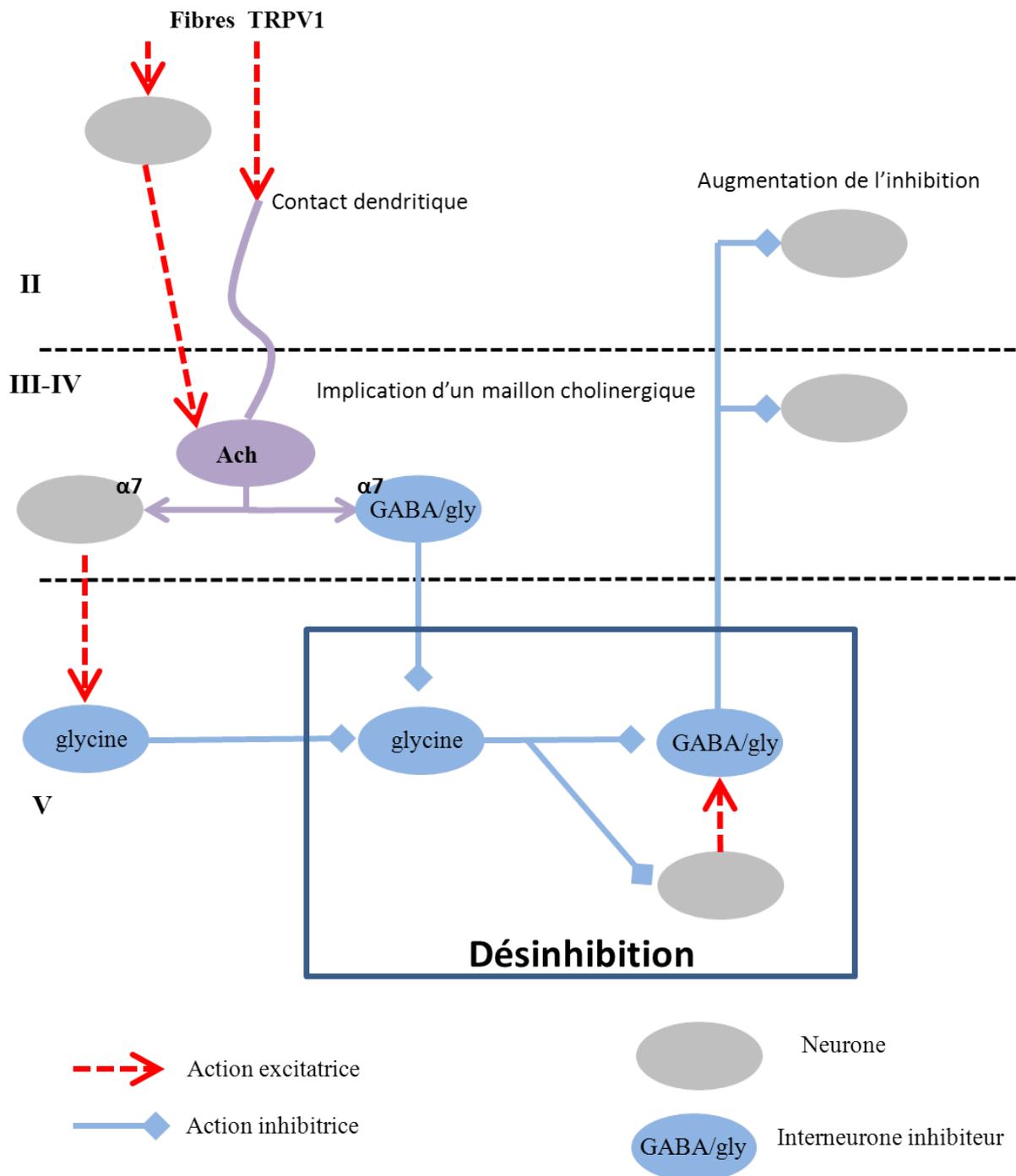


Figure 30. Voie TRPV1 inhibitrice

La stimulation des afférences sensorielles exprimant TRPV1 induit une large augmentation de la transmission inhibitrice GABAergique et glycinergique. Cette augmentation dépend du recrutement d'une transmission cholinergique activant des récepteurs nicotinique $\alpha 7$. L'implication d'un interneurone cholinergique permet le recrutement d'un système désinhibition. Cette désinhibition implique des neurones des couches de la couche V et l'activation de récepteur canaux de la glycine. Ce mécanisme de désinhibition synaptique permet le recrutement d'interneurone inhibiteurs GABAergique et/ou glycinergique.

(GABA = interneurone GABAergique, glycine = interneurone glycine, GABA /gly = d'interneurone inhibiteurs GABAergique et/ou glycinergique).

couche II et de la couche V avaient déjà été montrées (Nakatsuka et al., 2002). Nos résultats confirment ces données et sont les premières à montrer l'existence des relations fonctionnelles entre les neurones de la couche II et des neurones des couches III-IV, ces dernières n'étant pas classiquement considérées comme intervenant dans le traitement de l'information nociceptive (Brown, 1982).

1. *Effet sur la transmission inhibitrice*

L'application de capsaïcine induit également une augmentation de fréquence des sCPSI dans plus de la moitié des neurones des couches II-V, (45%, 58% et 55% pour les couches II, III-IV et V respectivement). Le réseau neuronal hypothétique impliqué dans ce phénomène est illustré dans la figure 30 et discuté dans les paragraphes ci-dessous.

En présence de TTX, la capsaïcine n'induit de variations de fréquence des mCPSI dans aucune des couches de la CDME, ce qui suggère que les interneurons inhibiteurs n'expriment pas TRPV1 à leurs terminaisons synaptiques. De plus, il est important de noter que les patrons d'inhibition (« glycine », « GABA/glycine », « GABA ») des neurones qui présentent une augmentation de fréquence des sCPSI ne changent pas suite à l'application de capsaïcine pour les neurones des couches II et III-IV. Ceci indique que la capsaïcine augmente à la fois les transmissions glycinergiques et GABAergiques. Les corps cellulaires des interneurons glycinergiques sont majoritairement localisés dans les couches III-V, mais sont très rares dans la couche II (Hossaini et al., 2007). Ainsi les augmentations de fréquence de sCPSI glycinergiques observées dans une fraction importante de neurones de la couche II (61%) semblent impliquer l'activation de neurones glycinergiques situés dans les couches III-V. En accord avec cette hypothèse, il a été montré chez le rat adulte qu'une injection intraplantaire de capsaïcine induit une expression de c-Fos dans des neurones des couches profondes (III-IV) exprimant des ARNm de la GAD67 et de GlyT2, c'est-à-dire dans des interneurons GABAergiques et/ou glycinergiques (Hossaini et al., 2010).

2. Mise en évidence d'un mécanisme de désinhibition

Nos données indiquent que l'augmentation de fréquence des sCPSI GABAergiques induite par la capsaïcine est placée sous le contrôle d'une activité glycinergique. Un tel phénomène nécessite par conséquent l'existence d'un mécanisme de désinhibition.

Cette désinhibition a certainement lieu dans les couches plus profondes que la couche IV. L'existence d'une désinhibition synaptique doit se traduire par une diminution de la fréquence des sCPSI suite à une application de capsaïcine. Un tel phénomène n'a jamais été observé dans les couches II-IV. Par contre, une faible fraction (15%) de neurones de la couche V présente une baisse de fréquence des sCPSI suite à l'application de capsaïcine. Le phénomène de désinhibition pourrait donc concerner une sous-population de neurones de la couche V, mais on ne peut pas tout à fait exclure la contribution d'une désinhibition dans la couche VI, qui n'a pas été incluse dans notre étude. Les neurones subissant cette désinhibition pourraient à leur tour faciliter l'activité d'interneurones inhibiteurs situés dans les couches II et III-IV ou d'interneurones de la couche V projetant vers les couches II et III-IV. Le rôle fondamental de la couche V (ou éventuellement des couches plus profondes) dans le contrôle de la transmission synaptique inhibitrice dans les couches II et III-IV est confirmé par le fait que l'augmentation de fréquence des sCPSI suite à l'application de capsaïcine est fortement diminuée dans la couche II ou est absente dans les couches III-IV, après avoir interrompu les communications synaptiques entre les couches profondes et les couches I-IV par une section mécanique. (Voir résultats, partie II).

3. Intervention d'un maillon cholinergique

Les proportions de neurones répondant à l'application de capsaïcine par des augmentations de fréquence des sCPSI dans les couches II et III-IV sont significativement réduites en présence de methyllycaconitine (MLA, 100 nM), un antagoniste des récepteurs nicotiques $\alpha 7$. Ainsi la présence de MLA reproduit l'effet de la section mécanique entre les couches IV et V. La baisse de fréquence des sCPSI induite par la capsaïcine dans la couche V est également abolie en présence de MLA. Ces résultats suggèrent l'implication d'un maillon cholinergique et de récepteurs nicotiques $\alpha 7$ dans la stimulation de la transmission synaptique inhibitrice dans les couches II-IV par la capsaïcine. Par contre ce maillon ne

semble pas indispensable dans les augmentations de fréquence des sCPSE induites par la capsaïcine dans les couches II, III-IV et V.

Les neurones cholinergiques de la CDME de rat ont leur corps cellulaire localisé dans les couches III-IV (Todd et Spike, 1993; Olave et al., 2002; Ribeiro da Silva et De Koninck, 2009). Leurs dendrites s'étendent principalement vers les couches I-II et reçoivent des synapses à partir d'ASP myélinisées et non-myélinisées (Olave et al., 2002).

Dans la ME l'existence d'une transmission synaptique rapide cholinergique a été décrite dans la couche X et les colonnes intermédiolatérales (Bradaia et Trouslard, 2002; Bradaia et al., 2005). Cette transmission utilise des récepteurs postsynaptiques nicotiques de type $\alpha 7$ (Bradaia et al., 2005). De plus, dans la CDME de rat on trouve une forte densité de sites de liaison de l' α -bungarotoxine, un ligand à forte affinité pour les récepteurs de l'acétylcholine de type $\alpha 7$, dans les couches II-III. Une partie de ces sites se trouve sur des neurones intrinsèques de la CDME, car ils persistent après rhizotomie dorsale (Ninkovic et Hunt, 1983). Par ailleurs, il a été montré que certains interneurons inhibiteurs de la CDME expriment au niveau de leurs corps cellulaires des récepteurs nicotiques $\alpha 7$ fonctionnels et que l'activation de ces récepteurs induit une augmentation de la fréquence des sCPSI dans la couche V (Takeda et al., 2007).

L'augmentation de fréquence des sCPSI dans les couches II et III-IV suite à la stimulation des canaux TRPV1 semble donc nécessiter le recrutement d'interneurones cholinergiques localisés dans les couches III-IV de la CDME, la libération endogène d'acétylcholine et l'activation de récepteurs nicotiques de type $\alpha 7$. Il est important de noter que l'augmentation de fréquence des sCPSE dans les couches II et III-IV ne semble pas dépendre de l'activation de récepteurs $\alpha 7$, car elle persiste en présence de MLA.

4. Conclusion

L'ensemble de nos résultats démontre l'existence d'un réseau neuronal réalisant des interactions synaptiques fonctionnelles entre des sous-populations de neurones des différentes couches de la CDME. Nos données suggèrent que les afférences nociceptives exprimant TRPV1 contactent des neurones de la couche II, puis l'information nociceptive est transmise aux couches profondes III-V, ce qui semble en accord avec des études indiquant l'existence

de relations anatomiques entre les couches superficielles et profondes de la CDME (Light et Kavookjian, 1988; Bráz et Basbaum, 2009). Cette information est intégrée dans les couches profondes où un phénomène de désinhibition participe en retour à l'augmentation de la transmission inhibitrice dans les couches III-IV et dans la couche II. Ainsi, le contrôle de l'inhibition synaptique en réponse à une stimulation nociceptive dépend de relations synaptiques réciproques entre les couches superficielles et profondes. (Figures 29 et 30).

4. Rôles physiologiques possibles de l'inhibition activée par la stimulation des afférences TRPV1

1. Inhibition des neurones de projection nociceptifs

Un des rôles que l'on pourrait attribuer à l'augmentation de fréquence des transmissions inhibitrices rapides dans la CDME en réponse à des stimulations nociceptives serait de limiter l'excitation des neurones responsables de la transmission des informations nociceptives vers les centres supra-spinaux. La perte de cette inhibition au niveau de la CDME conduit en effet à la mise en place d'un abaissement des seuils nociceptifs (Yaksh, 1989) et contribue à la mise en place d'états de douleur persistants (Coull et al., 2005; Zeilhofer et Zeilhofer, 2008).

2. Modulation des champs récepteurs

Dans la CDME, certains neurones reçoivent à la fois des informations en provenance d'afférences nociceptives et non-nociceptives. Ces neurones sont dits à convergence (voir Introduction). On en trouve dans toutes les couches mais surtout dans la couche V (Guirimand et Le Bars, 1996) L'augmentation de la transmission inhibitrice dans la couche V, mais aussi dans les couches II-IV, suite à l'application de capsaïcine pourrait donc sous-tendre une modulation de la taille des champs récepteurs de ces neurones. Un changement de la taille des zones excitatrices et inhibitrices des champs récepteurs de ces neurones a été montré et dépend de l'activité synaptique inhibitrice au niveau spinal (Guirimand et Le Bars, 1996). Par analogie, on pourrait spéculer qu'un processus similaire pourrait aussi moduler les champs récepteurs des neurones nociceptifs spécifiques et des neurones non-nociceptifs.

3. *Dépolarisation des afférences primaires*

On trouve des synapses axo-axoniques GABAergiques sur les terminaisons centrales des afférences sensorielles primaires (Ribeiro da Silva et De Koninck, 2009). Ces synapses participent à l'inhibition présynaptique des afférences primaires. Cette inhibition met en jeu l'activation de récepteurs GABA_A présynaptiques qui induit une dépolarisation associée à un shunt de résistance membranaire au niveau des terminaisons des afférences primaires sensorielles. Ce phénomène, appelé dépolarisation des afférences primaires (PAD pour primary afferent depolarization), induit un blocage des potentiels d'action afférents et conduit ainsi à la réduction de la transmission de l'information sensorielle vers les neurones des couches de la CDME (Eccles et al., 1963).

La PAD concerne les fibres non nociceptives de gros diamètres suite à l'activation de fibres non nociceptives (Eccles et al., 1961). Ce phénomène s'observe aussi dans les fibres C suite à l'activation de fibres de types A (Fitzgerald et Woolf, 1981). De plus la stimulation des fibres C peut induire une PAD dans des fibres de type A (Zimmermann, 1968). Dans certaines conditions de stimulation intense ou de plasticité centrale, la PAD peut avoir une amplitude suffisante pour atteindre le seuil de déclenchement des potentiels d'action dans la fibre afférente primaire et par conséquent induire une excitation antidromique directe de ces fibres sensorielles (Willis, 2009).

Nos résultats montrent une augmentation de la transmission inhibitrice dans les couches II et III-IV de la CDME suite à l'activation de fibres (A δ /C) sensibles à la capsaïcine. Cette augmentation de la transmission inhibitrice rend compte de l'activation d'interneurones GABAergiques dont certains pourraient être impliqués dans la PAD des afférences sensorielles primaires.

Une majorité d'afférences nociceptives contacte des neurones de la couche II. La mise en place du phénomène de PAD, suite à une stimulation nociceptive provenant des afférences TRPV1, permettrait de limiter la transmission des informations nociceptives depuis la périphérie vers la CDME. Au sein des couches III-V de la CDME il a été montré que des interneurones GABAergiques/glycinergiques établissent des synapses axo-axoniques GABAergiques avec des fibres A β et des synapses glycinergiques axo-somatiques avec des neurones intrinsèques. Ainsi les informations nociceptives pourraient inhiber l'arrivée

d'informations non-nociceptives, et ainsi diminuer le phénomène de « gate-control », c'est-à-dire l'inhibition de la transmission de l'information nociceptive par des informations non nociceptives (Melzack et Wall, 1965).

4. *Activation de neurones nociceptifs par des neurones non nociceptifs*

La forte augmentation de la transmission inhibitrice dans la CDME suite à l'activation des afférences nociceptives TRPV1 pourrait représenter un moyen pour les informations nociceptives d'inhiber des réseaux qui maintiennent une séparation entre les modalités sensorielles nociceptives et non-nociceptives ou alternativement de renforcer cette séparation. Dans des conditions physiologiques de base, l'information non-nociceptive acheminée par les fibres A β n'active pas les neurones impliqués dans le codage et la transmission de l'information nociceptive. Cette séparation des modalités est maintenue probablement par l'action d'interneurones inhibiteurs (Miraucourt et al., 2009; Takazawa et MacDermott, 2010b). Cependant, dans certaines conditions de douleur ou de désinhibition (physiologiques ou pharmacologiques (strychnine et bicuculline)), les informations non-nociceptives vont pouvoir accéder aux neurones qui traitent en temps normal l'information nociceptive dans les couches I-II. Ceci pourrait notamment rendre compte du développement des états d'allodynie (Schoffnegger et al., 2008).

5. *Analésie induite par une stimulation nociceptive*

Il a été montré que la stimulation d'afférences nociceptives par la capsaïcine induit une augmentation de l'inhibition dans la couche V, qui permet la désinhibition d'une sous population de neurones dans le noyau Accumbens. La désinhibition de ces neurones permet l'activation de contrôles descendant inhibiteurs situés dans le tronc cérébral et conduit ainsi à une analésie (Tambeli et al., 2009). Ce phénomène a été désigné sous le nom de *Nociceptive stimulation induced analgesia* (NSIA) et implique entre autres l'activation de récepteurs GABA_B et de récepteurs opioïdes de type μ dans la CDME. La NSIA peut en partie rendre compte des effets antinociceptifs observés chez l'homme après l'application périphérique de capsaïcine (Torebjork et al., 1992).

5. Effet de la stimulation de TRPV2

L'application de probénécide (500 μ M pendant 90 secondes) a induit des changements de fréquence des sCPSE dans 50% des neurones des couches III-IV et dans 100% des neurones de la couche V. De même, le probénécide a induit des changements de fréquence de sCPSI dans 57% des neurones des couches III-IV et dans 27% des neurones de la couche V. Par contre, nous n'avons jamais observé des changements de fréquence de sCPSE ou de sCPSI dans la couche II suite à l'application de probénécide. Ces données indiquent que les afférences exprimant TRPV2 sont capables d'induire l'activation de transmissions excitatrices et inhibitrices dans une sous-population de neurones des couches III-IV et V, mais pas de transmettre, ni directement ni indirectement, des informations vers la couche II, du moins dans des conditions physiologiques de base.

1. Réseau commun activé par des afférences TRPV1 et TRPV2 et réseaux distincts

Ainsi, nos données suggèrent que les neurones de la couche II semblent traiter uniquement des informations provenant des afférences TRPV1. Les couches III-IV se distinguent de la couche II par la présence de neurones répondant à la fois à la capsaïcine et/ou au probénécide. Il existe une convergence partielle des informations excitatrices provenant des fibres TRPV1 et TRPV2 dans 37,5% des neurones de la couche III-IV. De plus on trouve dans les couches III-IV des interneurons qui traitent uniquement les informations provenant des fibres TRPV1 (13% des neurones) et d'autres celles provenant des fibres TRPV2 (25% des neurones). De façon intéressante, tous les neurones de la couche V (100%) ont présenté une augmentation de la fréquence des sCPSE en réponse à une application de capsaïcine et de probénécide. Ceci suggère une convergence totale des informations excitatrices activées par les stimulations des fibres TRPV1 et TRPV2 dans la couche V. En ce qui concerne les transmissions inhibitrices, il n'existe qu'une convergence partielle des informations provenant des fibres TRPV1 et des fibres TRPV2 dans les couches III-IV (33% des neurones) et la couche V (20% des neurones) (figure 31).

2. Implications physiologiques

L'activation des terminaisons centrales des afférences TRPV1 par l'injection intrathécale de capsaïcine induit une hyperalgésie thermique et un abaissement des seuils nociceptifs mécaniques. Par contre, seule une baisse de seuils nociceptifs mécaniques a été

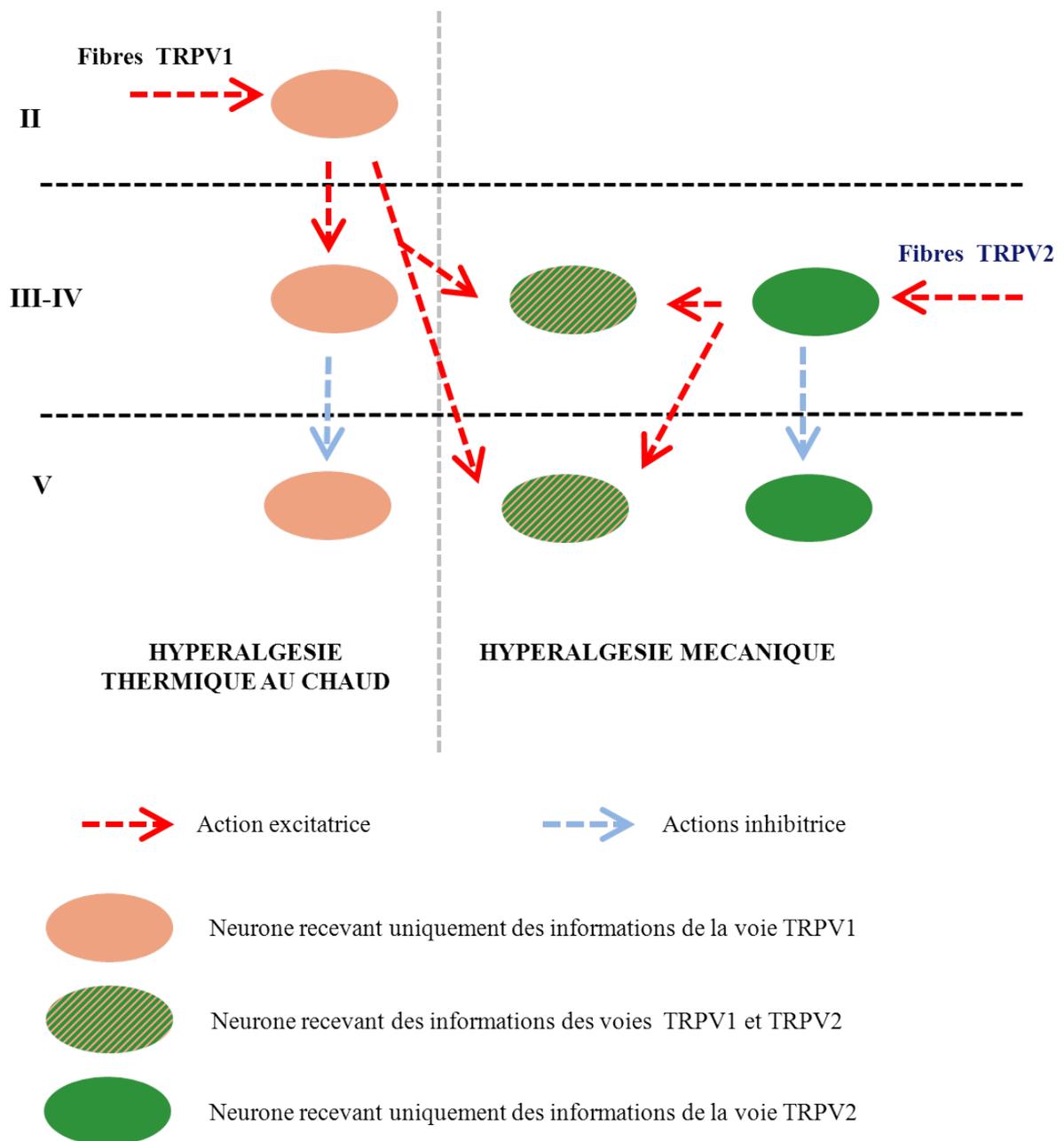


Figure 31. Voies TRPV1 et TRPV2, implication fonctionnelle.

Les neurones de la CDME qui reçoivent uniquement des informations provenant des afférences TRPV1 sont impliqués dans la mise en place de l'hyperalgésie thermique au chaud.

Les neurones des couches III-IV et V qui reçoivent des informations provenant des afférences TRPV2 et TRPV1 sont impliqués dans la mise en place de l'hyperalgésie mécanique.

détectée suite à l'activation des terminaisons centrales TRPV2 par l'injection intrathécale de probénécide. Ces effets comportementaux sont observés rapidement après les injections intrathécales des agonistes TRPV1 ou TRPV2 (< 15 minutes) et sont tout à fait comparables aux effets rapides et persistants sur la transmission synaptique obtenus suite à l'application de ces agonistes lors des expériences d'électrophysiologie sur tranche de ME. En rapprochant les données comportementales de celles obtenues en électrophysiologie, nous faisons l'hypothèse que les neurones répondant uniquement à la capsaïcine pourraient être impliqués dans la mise en place de l'hyperalgésie thermique, alors que les neurones qui répondent à la fois à la capsaïcine et au probénécide ou uniquement au probénécide seraient impliqués dans la mise en place d'une baisse des seuils mécaniques (figure 31).

Conclusion générale

Nos résultats démontrent l'existence de communications synaptiques réciproques entre la couche II et les couches profondes III-V de la corne dorsale. Ces interactions sont impliquées dans le traitement de l'information nociceptive.

Nous avons pu identifier un réseau excitateur glutamatergique polysynaptique transférant de l'information depuis la couche II vers les couches III-IV et V, suite à la stimulation des afférences nociceptives TRPV1. Ceci démontre un transfert d'information de la couche II vers les couches profondes (III-V) sous la forme d'une excitation synaptique.

L'augmentation de l'excitation dans la corne dorsale va également induire le recrutement d'interneurones inhibiteurs GABAergiques et glycinergiques et permettre une forte augmentation de fréquence des sCPSI dans toutes les couches (II-V). Cette augmentation de transmission inhibitrice nécessite un relai synaptique dans la couche V et un phénomène de désinhibition. L'augmentation de la transmission inhibitrice dans les couche II et III-V est donc liée à l'activité de la couche V. Cette augmentation dépend aussi de l'activation de récepteurs nicotiques $\alpha 7$.

Les neurones uniquement activés par les afférences TRPV1 semblent impliqués dans la mise place des états d'hyperalgésie thermique au chaud. Les neurones qui sont à la fois activés par les afférences exprimant TRPV1 ou TRPV2, ou uniquement par les afférences TRPV2, participent quant à eux à la mise en place d'une baisse de la sensibilité nociceptive mécanique.

L'ensemble de nos résultats devrait contribuer à une meilleure compréhension de la structure des réseaux d'interneurones spinaux impliqués dans le traitement de l'information nociceptive et met en évidence l'importance des relations synaptiques entre les différentes couches de la corne dorsale lors de ce processus. Une meilleure connaissance de la structure et du fonctionnement de ces réseaux permettra d'aborder l'étude des phénomènes de plasticité fonctionnelle s'opérant dans des situations de douleurs inflammatoires ou neuropathiques.

Tableau 8. Fréquence de base (Hz) des courants postsynaptiques.

Courants	Couches	Situation contrôle	Carragénine	Comparaison
CPSE	II	1,27 ± 1,09 (28)	0,6 ± 0,09 (5)	NS
CPSE	III-IV	3,03 ± 2,61 (20)	1,0 ± 0,37 (9)	**
CPSI	II	1,00 ± 1,51 (35)	0,5 ± (6)	NS
CPSI	III-IV	2,00 ± 3,21 (29)	1,15 ± (9)	NS

Fréquence moyenne (\pm écart-type, nombre de neurones enregistrés) des courants synaptiques excitateurs (CPSE) et inhibiteurs (CPSI) spontanés, enregistrés dans les couches II, III-IV et V de la corne dorsale de la moelle épinière. (Comparaison, NS : non significatif, ** = significatif ($p = 0,001538$)).

Perspectives

Nos données indiquent l'existence de relations synaptiques fonctionnelles entre les couches superficielles et profondes de la CDME lors du traitement de l'information nociceptive provenant des APS exprimant TRPV1. Les informations nociceptives provenant des afférences TRPV1 et TRPV2 sont traitées dans des réseaux distincts de neurones et dans un réseau commun localisé dans les couches III-IV et V de la CDME. Des changements plastiques ou des modulations fonctionnelles de l'activité synaptique au sein de ces réseaux de neurones pourraient être impliqués dans le développement des états douloureux aigus et chroniques, dans les situations inflammatoires et/ou neuropathiques.

Changement de plasticité lors d'états douloureux

Pour savoir si de tels changements plastiques peuvent avoir lieu lors de douleurs inflammatoires aiguës nous avons enregistré les sCPSE et sCPSI dans des neurones des couches II et III-IV de la CDME dans des tranches aiguës de ME de rats ayant reçu une injection intraplantaire bilatérale d'un agent inflammatoire, la carragénine (voir Matériels et Méthodes). Ce modèle de douleur inflammatoire périphérique se caractérise par la présence d'une hyperalgésie thermique et d'une allodynie mécanique (Poisbeau et al., 2005). Un allongement des τ_D GABAergiques des neurones des couches II et des couches III-IV, dû à l'action de neurostéroïdes synthétisés localement dans la CDME, indique que l'état inflammatoire se répercute sur les propriétés de la transmission synaptique inhibitrice GABAergique dans la CDME (Inquimbert et al., 2008). D'autre part, une perte d'efficacité de l'inhibition glycinergique a été montrée dans ces états de douleurs inflammatoires sous l'effet de production locale de prostaglandine E2 (Harvey et al., 2004; Zeilhofer et Zeilhofer, 2008). Par contre les conséquences de l'inflammation sur les propriétés des sCPSE ont été moins étudiées. Nos résultats préliminaires indiquent une tendance à un abaissement général des fréquences des sCPSE et des sCPSI (Tableau 8). Néanmoins, d'un point de vue statistique, seule la baisse de fréquence des sCPSE dans les couches III-IV est significative chez l'animal présentant une douleur inflammatoire. Ces données préliminaires indiquent que l'état inflammatoire se répercute également sur les propriétés de la transmission synaptique excitatrice dans la CDME. Si les propriétés des transmissions synaptiques changent lors d'états de douleurs inflammatoires il est probable qu'il y ait des modifications du traitement de l'information nociceptive provenant des fibres TRPV1 et TRPV2. Il serait donc intéressant

de faire des expériences d'électrophysiologie similaires à celles réalisées chez l'animal sain pour déterminer si les fractions de neurones des différentes couches qui répondent à la capsaïcine et au probénécide sont différentes de celles obtenues dans la situation physiologique de base.

Nos résultats obtenus chez l'animal sain montrent qu'une forte augmentation de la transmission inhibitrice dans les couches superficielles de la CDME est impliquée dans le traitement de l'information nociceptive et dépend entre autres de l'activation de récepteurs nicotiques $\alpha 7$ de l'acétylcholine. Il serait intéressant de déterminer le rôle de ces récepteurs dans les douleurs inflammatoires. Des études neuropharmacologiques récentes montrent en effet que, dans un modèle de douleur inflammatoire périphérique induite par l'injection d'adjuvant complet de Freund (CFA), dans lequel il y a mise en place d'une allodynie mécanique importante (Medhurst et al., 2008; Liu et al., 2009), des injections intrathécales d'agonistes des récepteurs $\alpha 7$, provoquent une forte diminution de l'hyperalgésie mécanique. Il serait donc intéressant de caractériser les effets de stimulations et de blocages des récepteurs $\alpha 7$ sur l'activité de ces réseaux activés par le probénécide chez l'animal ayant reçu une injection périphérique de CFA. Une attention particulière sera portée aux réponses des neurones de la couche II car, dans la situation physiologique de base, les neurones de la couche II ne reçoivent pas d'information provenant des afférences TRPV2. Mais ces neurones pourraient recevoir des informations à partir d'une voie activée par le probénécide dans la situation de douleur inflammatoire.

Les modèles animaux de douleur neuropathique se caractérisent par des allodynies mécaniques importantes dépendantes de l'activation de fibres $A\beta$ (Kuner, 2010). Ces fibres se projettent majoritairement dans les couches III-IV de la CDME. Il a été mis en évidence que, chez des animaux neuropathiques et chez des animaux inflammatoires, des informations véhiculées par les fibres non-nociceptives de type $A\beta$ sont acheminées vers les neurones des couches I-II de la CDME, alors qu'en situation physiologique de base ce n'est pas le cas (Baba et al., 1999; Torsney et MacDermott, 2006; Schoffnegger et al., 2008). Les fibres $A\beta$ projettent vers les couches III-IV tout comme les fibres exprimant des récepteurs TRPV2. De plus l'activation des récepteurs TRPV2 induit une hyperalgésie mécanique. Il serait donc intéressant de tester si les neurones répondant par une augmentation de fréquence de sCPSE à l'application de probénécide reçoivent également des entrées synaptiques à partir des afférences $A\beta$ et si ces entrées sont modulables présynaptiquement par les récepteurs TRPV2.

Une activation sélective des fibres A β pourrait être réalisée par des stimulations électriques de faible intensité des racines dorsales restées attachées à la tranche de ME. En effet, les fibres A β étant fortement myélinisées leur seuil d'activation est plus faible que celui des fibres A δ et C. Elles seront donc les premières et les seules fibres recrutées par des intensités de stimulation électrique faibles.

De manière générale, la caractérisation de modèles de douleurs à court terme (carragénine), et à long terme (CFA, neuropathie) permettra de mieux comprendre les phénomènes de plasticité qui s'opèrent au niveau des réseaux de la CDME et qui sous-tendent le développement et le maintien de l'hyperalgésie thermique et/ou de l'allodynie mécanique.

Bibliographie

- Al Ghamdi KS, Polgar E, Todd AJ (2009) Soma size distinguishes projection neurons from neurokinin 1 receptor-expressing interneurons in lamina I of the rat lumbar spinal dorsal horn. *Neuroscience* 164:1794-1804.
- Alvarez FJ, Fyffe RE (2000) Nociceptors for the 21st century. *Curr Rev Pain* 4:451-458.
- Averill S, McMahon SB, Clary DO, Reichardt LF, Priestley JV (1995) Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons. *Eur J Neurosci* 7:1484-1494.
- Baba H, Doubell TP, Woolf CJ (1999) Peripheral inflammation facilitates Abeta fiber-mediated synaptic input to the substantia gelatinosa of the adult rat spinal cord. *J Neurosci* 19:859-867.
- Bang S, Kim KY, Yoo S, Lee S-H, Hwang SW (2007) Transient receptor potential V2 expressed in sensory neurons is activated by probenecid. *Neurosci Lett* 425:120-125.
- Baron R (2006) Mechanisms of disease: neuropathic pain--a clinical perspective. *Nat Clin Pract Neurol* 2:95-106.
- Battaglia G, Rustioni A (1988) Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. *J Comp Neurol* 277:302-312.
- Bernard JF, Villanueva L (2010) Architecture fonctionnelle des systèmes nociceptifs. In: Douleurs : physiologie, physiopathologie et pharmacologie (Bouhassira D, Calvino B, eds): Arnette.
- Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-356.
- Bohlhalter S, Weinmann O, Mohler H, Fritschy JM (1996) Laminar compartmentalization of GABAA-receptor subtypes in the spinal cord: an immunohistochemical study. *J Neurosci* 16:283-297.
- Bradaia A, Trouslard J (2002) Fast synaptic transmission mediated by alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in lamina X neurones of neonatal rat spinal cord. *J Physiol* 544:727-739.
- Bradaia A, Seddik R, Schlichter R, Trouslard J (2005) The rat spinal cord slice: Its use in generating pharmacological evidence for cholinergic transmission using the alpha7 subtype of nicotinic receptors in the central autonomic nucleus. *J Pharmacol Toxicol Methods* 51:243-252.
- Braz JM, Nassar MA, Wood JN, Basbaum AI (2005) Parallel "pain" pathways arise from subpopulations of primary afferent nociceptor. *Neuron* 47:787-793.
- Bráz JM, Basbaum AI (2009) Triggering genetically-expressed transneuronal tracers by peripheral axotomy reveals convergent and segregated sensory neuron-spinal cord connectivity. *Neuroscience* 163:1220-1232.
- Brown AG (1982) The dorsal horn of the spinal cord. *Q J Exp Physiol* 67:193-212.
- Bullitt E, Lee CL, Light AR, Willcockson H (1992) The effect of stimulus duration on noxious-stimulus induced c-fos expression in the rodent spinal cord. *Brain Res* 580:172-179.
- Burgess PR, Perl ER (1967) Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. *J Physiol* 190:541-562.
- Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398:436-441.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288:306-313.
- Cavanaugh DJ, Chesler AT, Jackson AC, Sigal YM, Yamanaka H, Grant R, O'Donnell D, Nicoll RA, Shah NM, Julius D, Basbaum AI (2010) Trpv1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells. *J Neurosci* 31:5067-5077.

- Cervero F, Laird JM (1996) Mechanisms of touch-evoked pain (allodynia): a new model. *Pain* 68:13-23.
- Chen KH, Yang CH, Cheng JT, Wu CH, Sy WD, Lin CR (2010) Altered neuronatin expression in the rat dorsal root ganglion after sciatic nerve transection. *J Biomed Sci* 17:41.
- Colvin LA, Duggan AW (1998) Primary afferent-evoked release of immunoreactive galanin in the spinal cord of the neuropathic rat. *Br J Anaesth* 81:436-443.
- Colvin LA, Duggan AW (2001) The effect of conduction block on the spinal release of immunoreactive-neuropeptide Y (ir-NPY) in the neuropathic rat. *Pain* 91:235-240.
- Cortright DN, Szallasi A (2004) Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. An update. *Eur J Biochem* 271:1814-1819.
- Coull JA, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sik A, De Koninck P, De Koninck Y (2003) Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 424:938-942.
- Coull JAM, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, Koninck YD (2005) BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438:1017-1021.
- Cronin JN, Bradbury EJ, Lidieth M (2004) Laminar distribution of GABA_A- and glycine-receptor mediated tonic inhibition in the dorsal horn of the rat lumbar spinal cord: effects of picrotoxin and strychnine on expression of Fos-like immunoreactivity. *Pain* 112:156-163.
- Daniele CA, MacDermott AB (2009) Low-threshold primary afferent drive onto GABAergic interneurons in the superficial dorsal horn of the mouse. *J Neurosci* 29:686-695.
- Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA (2000) Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405:183-187.
- Derjean D, Bertrand S, Le Masson G, Landry M, Morisset V, Nagy F (2003) Dynamic balance of metabotropic inputs causes dorsal horn neurons to switch functional states. *Nat Neurosci* 6:274-281.
- Djouhri L, Lawson SN (2004) Ab-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res Brain Res Rev* 46:131-145.
- Doly S, Fischer J, Conrath M (2004) The vanilloid receptor-1 (TRPV1) is expressed in some rat dorsal horn NK1 cells. *Brain Res* 1004:203-207.
- Eccles JC, Kozak W, Magni F (1961) Dorsal root reflexes of muscle group I afferent fibres. *J Physiol* 159:128-146.
- Eccles JC, SCHMIDT R, WILLIS WD (1963) PHARMACOLOGICAL STUDIES ON PRESYNAPTIC INHIBITION. *J Physiol* 168:500-530.
- Eckert WA, McNaughton KK, Light AR (2003) Morphology and axonal arborization of rat spinal inner lamina II neurons hyperpolarized by mu-opioid-selective agonists. *J Comp Neurol* 458:240-256.
- Ferrini F, Salio C, Vergnano AM, Merighi A (2007) Vanilloid receptor-1 (TRPV1)-dependent activation of inhibitory neurotransmission in spinal substantia gelatinosa neurons of mouse. *Pain* 129:195-209.
- Ferrini F, Salio C, Lossi L, Gambino G, Merighi A (2010) Modulation of inhibitory neurotransmission by the vanilloid receptor type 1 (TRPV1) in organotypically cultured mouse substantia gelatinosa neurons. *Pain* 150:128-140.
- Fitzgerald M, Woolf CJ (1981) Effects of cutaneous nerve and intraspinal conditioning of C-fibre afferent terminal excitability in decerebrate spinal rats. *J Physiol* 318:25-39.

- Graham BA, Brichta AM, Callister RJ (2004) In vivo responses of mouse superficial dorsal horn neurones to both current injection and peripheral cutaneous stimulation. *J Physiol* 561:749-763.
- Grudt TJ, Perl ER (2002) Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *J Physiol* 540:189-207.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440-3450.
- Guirimand F, Le Bars D (1996) Physiologie de la nociception. *Ann Fr Anesth Reanim* 15:1048-1079.
- Guler AD, Lee H, Iida T, Shimizu I, Tominaga M, Caterina M (2002) Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci* 22:6408-6414.
- Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X, Elde R (1999) Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci* 11:946-958.
- Harvey RJ, Depner UB, Wassle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K, Schutz B, Abo-Salem OM, Zimmer A, Poisbeau P, Welzl H, Wolfer DP, Betz H, Zeilhofer HU, Muller U (2004) GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* 304:884-887.
- Hossaini M, French PJ, Holstege JC (2007) Distribution of glycinergic neuronal somata in the rat spinal cord. *Brain Res* 1142:61-69.
- Hossaini M, Duraku LS, Sarac C, Jongen JL, Holstege JC (2010) Differential distribution of activated spinal neurons containing glycine and/or GABA and expressing c-fos in acute and chronic pain models. *Pain* 151:356-365.
- Hu HJ, Glauner KS, Gereau RWt (2003) ERK integrates PKA and PKC signaling in superficial dorsal horn neurons. I. Modulation of A-type K⁺ currents. *J Neurophysiol* 90:1671-1679.
- Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V (2002) An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8400-8405.
- Hughes DI, Scott DT, Todd AJ, Riddell JS (2003) Lack of evidence for sprouting of Abeta afferents into the superficial laminae of the spinal cord dorsal horn after nerve section. *J Neurosci* 23:9491-9499.
- Hunt SP, Mantyh PW (2001) The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci* 2:83-91.
- Hwang SJ, Burette A, Valtschanoff JG (2003) VR1-positive primary afferents contact NK1-positive spinoparabrachial neurons. *J Comp Neurol* 460:255-265.
- Ikeda H, Stark J, Fischer H, Wagner M, Drdla R, Jager T, Sandkuhler J (2006) Synaptic amplifier of inflammatory pain in the spinal dorsal horn. *Science* 312:1659-1662.
- Inquimbert P, Rodeau J-L, Schlichter R (2007) Differential contribution of GABAergic and glycinergic components to inhibitory synaptic transmission in lamina II and laminae III-IV of the young rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 26:2940-2949.
- Inquimbert P, Rodeau J-L, Schlichter R (2008) Regional differences in the decay kinetics of GABA(A) receptor-mediated miniature IPSCs in the dorsal horn of the rat spinal cord are determined by mitochondrial transport of cholesterol. *J Neurosci* 28:3427-3437.
- Jancso G, Maggi CA (1987) Distribution of capsaicin-sensitive urinary bladder afferents in the rat spinal cord. *Brain Res* 418:371-376.
- Ji RR, Samad TA, Jin SX, Schmoll R, Woolf CJ (2002) p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron* 36:57-68.
- Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413:203-210.

- Kanai Y, Nakazato E, Fujiuchi A, Hara T, Imai A (2005) Involvement of an increased spinal TRPV1 sensitization through its up-regulation in mechanical allodynia of CCI rats. *Neuropharmacology* 49:977-984.
- Kato G, Kawasaki Y, Ji R-R, Strassman AM (2007) Differential wiring of local excitatory and inhibitory synaptic inputs to islet cells in rat spinal lamina II demonstrated by laser scanning photostimulation. *J Physiol* 580:815-833.
- Kato G, Yasaka T, Katafuchi T, Furue H, Mizuno M, Iwamoto Y, Yoshimura M (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* 26:1787-1794.
- Kawamata M, Koshizaki M, Shimada SG, Narimatsu E, Kozuka Y, Takahashi T, Namiki A, Collins JG (2005) Changes in response properties and receptive fields of spinal dorsal horn neurons in rats after surgical incision in hairy skin. *Anesthesiology* 102:141-151.
- Keller AF, Coull JA, Chery N, Poisbeau P, De Koninck Y (2001) Region-specific developmental specialization of GABA-glycine cosynapses in laminae I-II of the rat spinal dorsal horn. *J Neurosci* 21:7871-7880.
- Kim H, Cui L, Kim J, Kim SJ (2009) Transient receptor potential vanilloid type 1 receptor regulates glutamatergic synaptic inputs to the spinothalamic tract neurons of the spinal cord deep dorsal horn. *Neuroscience* 160:508-516.
- Kittler JT, Moss SJ (2003) Modulation of GABA_A receptor activity by phosphorylation and receptor trafficking: implications for the efficacy of synaptic inhibition. *Curr Opin Neurobiol* 13:341-347.
- Knotkova H, Pappagallo M, Szallasi A (2008) Capsaicin (TRPV1 Agonist) therapy for pain relief: farewell or revival? *Clin J Pain* 24:142-154.
- Kuner R (2010) Central mechanisms of pathological pain. *Nat Med* 16:1258-1266.
- Labrakakis C, MacDermott AB (2003) Neurokinin receptor 1-expressing spinal cord neurons in lamina I and III/IV of postnatal rats receive inputs from capsaicin sensitive fibers. *Neurosci Lett* 352:121-124.
- LaMotte RH, Lundberg LE, Torebjork HE (1992) Pain, hyperalgesia and activity in nociceptive C units in humans after intradermal injection of capsaicin. *J Physiol* 448:749-764.
- LaMotte RH, Shain CN, Simone DA, Tsai EF (1991) Neurogenic hyperalgesia: psychophysical studies of underlying mechanisms. *J Neurophysiol* 66:190-211.
- Landry M, Bouali-Benazzouz R, El Mestikawy S, Ravassard P, Nagy F (2004) Expression of vesicular glutamate transporters in rat lumbar spinal cord, with a note on dorsal root ganglia. *J Comp Neurol* 468:380-394.
- Lawson JJ, McIlwrath SL, Woodbury CJ, Davis BM, Koerber HR (2008) TRPV1 unlike TRPV2 is restricted to a subset of mechanically insensitive cutaneous nociceptors responding to heat. *J Pain* 9:298-308.
- Le Bars D, Chitour D (1983) Do convergent neurones in the spinal dorsal horn discriminate nociceptive from non-nociceptive information? *Pain* 17:1-19.
- Le Bars D, Catten SW (2009) What is a wide-dynamic-range cell. In: *Science of pain*, 3 Edition (Basbaum AI, ed), pp 332-337. San Diego: Elsevier.
- Lewinter RD, Skinner K, Julius D, Basbaum AI (2004) Immunoreactive TRPV-2 (VRL-1), a capsaicin receptor homolog, in the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 470:400-408.
- Light AR, Perl ER (1979) Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers. *J Comp Neurol* 186:133-150.
- Light AR, Durkovic RG (1984) Features of laminar and somatotopic organization of lumbar spinal cord units receiving cutaneous inputs from hindlimb receptive fields. *J Neurophysiol* 52:449-458.
- Light AR, Kavookjian AM (1988) Morphology and ultrastructure of physiologically identified substantia gelatinosa (lamina II) neurons with axons that terminate in deeper dorsal horn laminae (III-V). *J Comp Neurol* 267:172-189.

- Light AR, Lee S (2009) Physiology of spinal cord. In: Science of pain, 3 Edition (Basbaum AI, ed), pp 311-331. San Diego: Elsevier.
- Lima D, Coimbra A (1983) The neuronal population of the marginal zone (lamina I) of the rat spinal cord. A study based on reconstructions of serially sectioned cells. *Anat Embryol (Berl)* 167:273-288.
- Liu YL, Lin HM, Zou R, Wu JC, Han R, Raymond LN, Reid PF, Qin ZH (2009) Suppression of complete Freund's adjuvant-induced adjuvant arthritis by cobra toxin. *Acta Pharmacol Sin* 30:219-227.
- Lopez-Garcia JA, King AE (1994) Membrane properties of physiologically classified rat dorsal horn neurons in vitro: correlation with cutaneous sensory afferent input. *Eur J Neurosci* 6:998-1007.
- Lu Y, Perl ER (2003) A specific inhibitory pathway between substantia gelatinosa neurons receiving direct C-fiber input. *J Neurosci* 23:8752-8758.
- Lu Y, Perl ER (2005) Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II). *J Neurosci* 25:3900-3907.
- Luz LL, Szucs P, Pinho R, Safronov BV (2010) Monosynaptic excitatory inputs to spinal lamina I anterolateral-tract-projecting neurons from neighbouring lamina I neurons. *J Physiol* 588:4489-4505.
- Lynn B (1984) Effect of neonatal treatment with capsaicin on the numbers and properties of cutaneous afferent units from the hairy skin of the rat. *Brain Res* 322:255-260.
- Mackie M, Hughes DI, Maxwell DJ, Tillakaratne NJK, Todd AJ (2003) Distribution and colocalisation of glutamate decarboxylase isoforms in the rat spinal cord. *Neuroscience* 119:461-472.
- Matsubayashi H, Alkondon M, Pereira EF, Swanson KL, Albuquerque EX (1998) Strychnine: a potent competitive antagonist of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 284:904-913.
- Maxwell DJ, Fyffe RE, Rethelyi M (1983) Morphological properties of physiologically characterized lamina III neurones in the cat spinal cord. *Neuroscience* 10:1-22.
- McDonald BJ, Amato A, Connolly CN, Benke D, Moss SJ, Smart TG (1998) Adjacent phosphorylation sites on GABAA receptor beta subunits determine regulation by cAMP-dependent protein kinase. *Nat Neurosci* 1:23-28.
- McGlone F, Spence C (2010) The cutaneous senses: touch, temperature, pain/itch, and pleasure. *Neurosci Biobehav Rev* 34:145-147.
- McGlone F, Reilly D (2010) The cutaneous sensory system. *Neurosci Biobehav Rev* 34:148-159.
- Medhurst SJ, Hatcher JP, Hille CJ, Bingham S, Clayton NM, Billinton A, Chessell IP (2008) Activation of the alpha7-nicotinic acetylcholine receptor reverses complete Freund adjuvant-induced mechanical hyperalgesia in the rat via a central site of action. *J Pain* 9:580-587.
- Melzack R, Wall PD (1965) Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150:971-979.
- Mihara H, Boudaka A, Shibasaki K, Yamanaka A, Sugiyama T, Tominaga M (2010) Involvement of TRPV2 activation in intestinal movement through nitric oxide production in mice. *J Neurosci* 30:16536-16544.
- Millan MJ (1999) The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57:1-164.
- Millan MJ (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66:355-474.
- Miracourt LS, Dallel R, Voisin DL (2007) Glycine Inhibitory Dysfunction Turns Touch into Pain through PKCgamma Interneurons. *PLoS ONE* 2:e1116.
- Miracourt LS, Moisset X, Dallel R, Voisin DL (2009) Glycine inhibitory dysfunction induces a selectively dynamic, morphine-resistant, and neurokinin 1 receptor-independent mechanical allodynia. *J Neurosci* 29:2519-2527.
- Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ (2002) Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci* 22:6724-6731.

- Mozrzymas JW, Barberis A, Vicini S (2007) GABAergic currents in RT and VB thalamic nuclei follow kinetic pattern of alpha3- and alpha1-subunit-containing GABAA receptors. *Eur J Neurosci* 26:657-665.
- Nakatsuka T, Furue H, Yoshimura M, Gu JG (2002) Activation of central terminal vanilloid receptor-1 receptors and alpha beta-methylene-ATP-sensitive P2X receptors reveals a converged synaptic activity onto the deep dorsal horn neurons of the spinal cord. *J Neurosci* 22:1228-1237.
- Neumann S, Braz JM, Skinner K, Llewellyn-Smith IJ, Basbaum AI (2008) Innocuous, not noxious, input activates PKCgamma interneurons of the spinal dorsal horn via myelinated afferent fibers. *J Neurosci* 28:7936-7944.
- Ninkovic M, Hunt SP (1983) Alpha-bungarotoxin binding sites on sensory neurones and their axonal transport in sensory afferents. *Brain Res* 272:57-69.
- Olave MJ, Puri N, Kerr R, Maxwell DJ (2002) Myelinated and unmyelinated primary afferent axons form contacts with cholinergic interneurons in the spinal dorsal horn. *Exp Brain Res* 145:448-456.
- Patwardhan AM, Scotland PE, Akopian AN, Hargreaves KM (2009) Activation of TRPV1 in the spinal cord by oxidized linoleic acid metabolites contributes to inflammatory hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:18820-18824.
- Perl E, R (1984) *Handbook of physiology: the nervous system-sensory processes, Pain and nociception*. Washington, D.C.
- Petkó M, Veress G, Vereb G, Storm-Mathisen J, Antal M (2004) Commissural propriospinal connections between the lateral aspects of laminae III-IV in the lumbar spinal cord of rats. *J Comp Neurol* 480:364-377.
- Poisbeau P, Patte-Mensah C, Keller AF, Barrot M, Breton JD, Luis-Delgado OE, Freund-Mercier MJ, Mensah-Nyagan AG, Schlichter R (2005) Inflammatory pain upregulates spinal inhibition via endogenous neurosteroid production. *J Neurosci* 25:11768-11776.
- Polgar E, Fowler JH, McGill MM, Todd AJ (1999) The types of neuron which contain protein kinase C gamma in rat spinal cord. *Brain Res* 833:71-80.
- Polgar E, Gray S, Riddell JS, Todd AJ (2004) Lack of evidence for significant neuronal loss in laminae I-III of the spinal dorsal horn of the rat in the chronic constriction injury model. *Pain* 111:144-150.
- Polgar E, Hughes DI, Riddell JS, Maxwell DJ, Puskar Z, Todd AJ (2003) Selective loss of spinal GABAergic or glycinergic neurons is not necessary for development of thermal hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Pain* 104:229-239.
- Prescott SA, Sejnowski TJ, Koninck YD (2006) Reduction of anion reversal potential subverts the inhibitory control of firing rate in spinal lamina I neurons: towards a biophysical basis for neuropathic pain. *Mol Pain* 2:32.
- Rajalu M, Muller UC, Caley A, Harvey RJ, Poisbeau P (2009) Plasticity of synaptic inhibition in mouse spinal cord lamina II neurons during early postnatal development and after inactivation of the glycine receptor alpha3 subunit gene. *Eur J Neurosci* 30:2284-2292.
- Randic M, Jiang MC, Cerne R (1993) Long-term potentiation and long-term depression of primary afferent neurotransmission in the rat spinal cord. *J Neurosci* 13:5228-5241.
- Rau KK, Jiang N, Johnson RD, Cooper BY (2007) Heat sensitization in skin and muscle nociceptors expressing distinct combinations of TRPV1 and TRPV2 protein. *J Neurophysiol* 97:2651-2662.
- Renna JM, Strang CE, Amthor FR, Keyser KT (2007) Strychnine, but not PMBA, inhibits neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed by rabbit retinal ganglion cells. *Vis Neurosci* 24:503-511.
- Rexed B (1952) The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 96:414-495.

- Ribeiro-da-Silva A, De Koninck Y (2008) The Senses: a Comprehensive Reference Volume 5, Pain. In: (Bushnell MC, Basbaum AI, eds), pp 279-310: Elsevier Inc., Oxford, UK.
- Ribeiro da Silva A, De Koninck Y (2009) Morphological and neurochemical organization of the spinal cord horn. In: Science of pain, 3 Edition (Basbaum AI, ed), pp 311-331. San Diego: Elsevier.
- Ruscheweyh R, Sandkuhler J (2002) Lamina-specific membrane and discharge properties of rat spinal dorsal horn neurones in vitro. *J Physiol* 541:231-244.
- Saitoh T, Ishida M, Maruyama M, Shinozaki H (1994) A novel antagonist, phenylbenzene omega-phosphono-alpha-amino acid, for strychnine-sensitive glycine receptors in the rat spinal cord. *Br J Pharmacol* 113:165-170.
- Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S, Bonventre JV, Woolf CJ (2001) Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature* 410:471-475.
- Sandkühler J (2009) Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev* 89:707-758.
- Santos SFA, Luz LL, Szucs P, Lima D, Derkach VA, Safronov BV (2009) Transmission efficacy and plasticity in glutamatergic synapses formed by excitatory interneurons of the substantia gelatinosa in the rat spinal cord. *PLoS One* 4:e8047.
- Schneider SP (2003) Spike frequency adaptation and signaling properties of identified neurons in rodent deep spinal dorsal horn. *J Neurophysiol* 90:245-258.
- Schneider SP (2008) Local Circuit Connections Between Hamster Laminae III and IV Dorsal Horn Neurons. *J Neurophysiol* 99:1306-1318.
- Schoffnegger D, Ruscheweyh R, Sandkühler J (2008) Spread of excitation across modality borders in spinal dorsal horn of neuropathic rats. *Pain* 135:300-310.
- Scholz J, Woolf CJ (2007) The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci* 10:1361-1368.
- Shibasaki K, Murayama N, Ono K, Ishizaki Y, Tominaga M (2010) TRPV2 enhances axon outgrowth through its activation by membrane stretch in developing sensory and motor neurons. *J Neurosci* 30:4601-4612.
- Simone DA, Sorkin LS, Oh U, Chung JM, Owens C, LaMotte RH, Willis WD (1991) Neurogenic hyperalgesia: central neural correlates in responses of spinothalamic tract neurons. *J Neurophysiol* 66:228-246.
- Spicarova D, Palecek J (2008) The Role of Spinal Cord Vanilloid (TRPV1) Receptors in Pain Modulation. *Physiol Res* 57:S69-S77.
- Szentagothai J (1964) Neuronal and Synaptic Arrangement in the Substantia Gelatinosa Rolandi. *J Comp Neurol* 122:219-239.
- Takahashi A, Tokunaga A, Yamanaka H, Mashimo T, Noguchi K, Uchida I (2006) Two types of GABAergic miniature inhibitory postsynaptic currents in mouse substantia gelatinosa neurons. *Eur J Pharmacol* 553:120-128.
- Takazawa T, MacDermott AB (2010a) Glycinergic and GABAergic tonic inhibition fine tune inhibitory control in regionally distinct subpopulations of dorsal horn neurons. *J Physiol* 588:2571-2587.
- Takazawa T, MacDermott AB (2010b) Synaptic pathways and inhibitory gates in the spinal cord dorsal horn. *Ann N Y Acad Sci* 1198:153-158.
- Takeda D, Nakatsuka T, Gu JG, Yoshida M (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.
- Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J, Obata K, Kaneko T (2003) Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J Comp Neurol* 467:60-79.
- Tambeli CH, Levine JD, Gear RW (2009) Centralization of noxious stimulus-induced analgesia (NSIA) is related to activity at inhibitory synapses in the spinal cord. *Pain* 143:228-232.

- Todd AJ (1996) GABA and glycine in synaptic glomeruli of the rat spinal dorsal horn. *Eur J Neurosci* 8:2492-2498.
- Todd AJ (2010) Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci* 11:823-836.
- Todd AJ, Sullivan AC (1990) Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 296:496-505.
- Todd AJ, Spike RC (1993) The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal horn. *Prog Neurobiol* 41:609-645.
- Tominaga M (2007) The Role of TRP Channels in Thermosensation.
- Tominaga M, Caterina MJ (2004) Thermosensation and pain. *J Neurobiol* 61:3-12.
- Torebjork HE, Lundberg LE, LaMotte RH (1992) Central changes in processing of mechanoreceptive input in capsaicin-induced secondary hyperalgesia in humans. *J Physiol* 448:765-780.
- Torsney C, MacDermott AB (2006) Disinhibition opens the gate to pathological pain signaling in superficial neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord. *J Neurosci* 26:1833-1843.
- Ueda M, Kuraishi Y, Sugimoto K, Satoh M (1994) Evidence that glutamate is released from capsaicin-sensitive primary afferent fibers in rats: study with on-line continuous monitoring of glutamate. *Neurosci Res* 20:231-237.
- Uta D, Furue H, Pickering AE, Rashid MH, Mizuguchi-Takase H, Katafuchi T, Imoto K, Yoshimura M (2010) TRPA1-expressing primary afferents synapse with a morphologically identified subclass of substantia gelatinosa neurons in the adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 31:1960-1973.
- Valtschanoff JG, Rustioni A, Guo A, Hwang SJ (2001) Vanilloid receptor VR1 is both presynaptic and postsynaptic in the superficial laminae of the rat dorsal horn. *J Comp Neurol* 436:225-235.
- Vega JA, Garcia-Suarez O, Montano JA, Pardo B, Cobo JM (2009) The Meissner and Pacinian sensory corpuscles revisited new data from the last decade. *Microsc Res Tech* 72:299-309.
- Villanueva L, Bourgeois L (2010) Système de modulation de la douleur. In: *Douleurs : physiologie, physiopathologie et pharmacologie* (Bouhassira D, Calvino B, eds): Arnette.
- Walpole CS, Bevan S, Bovermann G, Boelsterli JJ, Breckenridge R, Davies JW, Hughes GA, James I, Oberer L, Winter J, et al. (1994) The discovery of capsazepine, the first competitive antagonist of the sensory neuron excitants capsaicin and resiniferatoxin. *J Med Chem* 37:1942-1954.
- Watson C, Paxinos G, Gulgun K (2008) *The Spinal Cord*. Oxford.
- Willis WD (2009) The role of TRPV1 receptors in pain evoked by noxious thermal and chemical stimuli. *Exp Brain Res* 196:5-11.
- Woodbury CJ, Koerber HR (2003) Widespread projections from myelinated nociceptors throughout the substantia gelatinosa provide novel insights into neonatal hypersensitivity. *J Neurosci* 23:601-610.
- Woodbury CJ, Kullmann FA, McIlwrath SL, Koerber HR (2008) Identity of myelinated cutaneous sensory neurons projecting to nociceptive laminae following nerve injury in adult mice. *J Comp Neurol* 508:500-509.
- Woolf CJ, Salter MW (2000) Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288:1765-1769.
- Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE (1992) Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 355:75-78.
- Yaksh T (2006) central pharmacology of nociceptive transmission. In: *Textbook of pain* (Elsevier, ed), pp 371-415. London.
- Yaksh TL (1987) Spinal opiates: a review of their effect on spinal function with emphasis on pain processing. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 85:25-37.

- Yaksh TL (1989) Behavioral and autonomic correlates of the tactile evoked allodynia produced by spinal glycine inhibition: effects of modulatory receptor systems and excitatory amino acid antagonists. *Pain* 37:111-123.
- Yasaka T, Tiong SY, Hughes DI, Riddell JS, Todd AJ (2010) Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach. *Pain* 151:475-488.
- Yasaka T, Kato G, Furue H, Rashid MH, Sonohata M, Tamae A, Murata Y, Masuko S, Yoshimura M (2007) Cell-type-specific excitatory and inhibitory circuits involving primary afferents in the substantia gelatinosa of the rat spinal dorsal horn in vitro. *J Physiol* 581:603-618.
- Zeilhofer HU, Zeilhofer UB (2008) Spinal dis-inhibition in inflammatory pain. *Neurosci Lett* 437:170-174.
- Zeilhofer HU, Studler B, Arabadzisz D, Schweizer C, Ahmadi S, Layh B, Bösl MR, Fritschy J-M (2005) Glycinergic neurons expressing enhanced green fluorescent protein in bacterial artificial chromosome transgenic mice. *J Comp Neurol* 482:123-141.
- Zhang DX, Owens CM, Willis WD (1991) Two forms of inhibition of spinothalamic tract neurons produced by stimulation of the periaqueductal gray and the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 65:1567-1579.
- Zheng J, Lu Y, Perl ER (2010) Inhibitory neurones of the spinal substantia gelatinosa mediate interaction of signals from primary afferents. *J Physiol* 588:2065-2075.
- Zhou H-Y, Zhang H-M, Chen S-R, Pan H-L (2007) Increased nociceptive input rapidly modulates spinal GABAergic transmission through endogenously released glutamate. *J Neurophysiol* 97:871-882.
- Zhou H-Y, Zhang H-M, Chen S-R, Pan H-L (2008) Increased C-fiber nociceptive input potentiates inhibitory glycinergic transmission in the spinal dorsal horn. *J Pharmacol Exp Ther* 324:1000-1010.
- Zhou H-Y, Chen S-R, Chen H, Pan H-L (2009) The glutamatergic nature of TRPV1-expressing neurons in the spinal dorsal horn. *J Neurochem* 108:305-318.
- Zigmond M (1999) *Fundamental Neuroscience*.
- Zimmermann M (1968) Dorsal root potentials after C-fiber stimulation. *Science* 160:896-898.
- Zou X, Lin Q, Willis WD (2001) NMDA or non-NMDA receptor antagonists attenuate increased Fos expression in spinal dorsal horn GABAergic neurons after intradermal injection of capsaicin in rats. *Neuroscience* 106:171-182.
- Zwick M, Davis BM, Woodbury CJ, Burkett JN, Koerber HR, Simpson JF, Albers KM (2002) Glial cell line-derived neurotrophic factor is a survival factor for isolectin B4-positive, but not vanilloid receptor 1-positive, neurons in the mouse. *J Neurosci* 22:4057-4065.