

THÈSE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE  
L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ  
SPÉCIALITÉ NEUROSCIENCES

Institut des neurosciences cellulaires et intégratives

Présentée par  
**Lou CATHENAUT**

**Plasticité de la transmission synaptique inhibitrice  
dans le système nociceptif spinal  
et sa modulation par l'inflammation**

Sous la co-direction de **M. Sylvain Hugel**, Chargé de recherche au CNRS  
et de **M Rémy Schlichter**, Professeur de l'Université de Strasbourg

Membres du jury

<b>M. Daniel Voisin</b>	Professeur de l'Université de Bordeaux	Rapporteur externe
<b>M. Pascal Fossat</b>	Professeur de l'Université de Bordeaux	Rapporteur externe
<b>Mme. Ipek Yalcin</b>	Directrice de recherche au CNRS, Strasbourg	Rapporteuse interne
<b>M. Yves De Koninck</b>	Professeur de l'Université de Laval, Québec	Examineur

Soutenue le 15 Décembre 2021



Ce travail de thèse a été réalisé grâce à un contrat doctoral de 3 ans ainsi qu'à l'obtention du prix de recherche Gisèle Guilbaud 2020 de la SFETD pour mon projet intitulé « *Balance excitation/inhibition et traitement de l'information nociceptive dans la corne dorsale de la moelle épinière : un rôle clé de la plasticité à court-terme des transmissions synaptiques inhibitrice* ». Ce prix a permis le financement d'une partie de la 4<sup>ème</sup> année de thèse.

Ce travail a également été l'objet d'un soutien de fin de thèse par EURIDOL (ANR-17-EURE-0022)



# REMERCIEMENTS

Tout d'abord, un grand merci à l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse :

**Ypek Yalcin** d'avoir accepté d'être rapporteur interne

**Pascal Fossat** et **Daniel Voisin** d'avoir accepté d'être rapporteurs externes

**Yves De Koninck** pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je vous remercie tous, de vous être déplacés et du temps que vous avez accordé à mon travail. C'est un honneur pour moi de vous avoir comme examinateurs de mon travail de thèse.

Durant ces 4 années de thèse, j'ai rencontré des personnes enrichissantes tant sur le plan scientifique que personnel, je vous adresse donc mes remerciements :

Un grand merci à **Rémy Schlichter** de m'avoir donné la chance d'intégrer l'équipe. Quand je repense au premier entretien pour un stage d'été, j'étais très loin d'imaginer l'aventure qui allait suivre... Merci également pour tes conseils, discussions, ta réactivité et ton soutien. Merci donc au directeur de thèse que tu as été, au chef d'équipe et à la personne que tu es.

Merci également aux autres membres de l'équipe :

**Perrine** pour ton encadrement lors du master, tes remarques et conseils toujours précieux. Merci pour tes gâteaux et sucreries dont on se goinfrait toujours avec plaisir !

**Jean-Louis** pour tes chantonnements résonnants dans le couloir et ta bonne humeur sans faille, participant à la bonne ambiance de l'équipe.

**Catherine** et **Chantal**, je n'ai pas eu souvent l'occasion de manipuler avec vous, mais vous avez toujours répondu présentes lorsque j'avais besoin de vous. Je vous remercie pour cela.

Aux collègues et amis, un grand merci également :

**Louise**, on en aura passé des moments à refaire le monde... De l'écologie à l'égalité homme-femme en passant par les chiens qui mettent des anoraks : chaque jour de patch donnait naissance à une nouvelle version du monde. La plupart de nos réflexions résonnent encore dans mon esprit. Merci d'avoir participé à mon bien être au labo et rdv dans quelques années dans les Alpilles pour donner naissance à une de nos moultes versions de la vie.

**Lucien**, du haut de tes 18 ans, tu m'auras bien fait rire. Ton énergie de jeune poney fringuant a dynamisé l'ambiance au labo et même lors de manip' de patch pourries, tu as participé à ma bonne humeur. Merci d'avoir sorti sans filtre, bon nombre de blagues douteuses, dont la majorité germaient dans ma tête sans que j'ose les sortir moi-même... *(je peux l'avouer maintenant)*

**Robin**, tu es arrivé chez nous en tant que petit master et une centaine de tests topito plus tard, tu es déjà thésard 2<sup>ème</sup> année... tu grandis si vite ! Tu as hérité de mon poste de patch et bientôt, tu hériteras de mon bureau et de ma super collection de personnages en pâte à babybel ! Ça a été un plaisir de t'embarquer dans notre sujet de recherche que tu prends en mains et arranges à ta sauce maintenant !

D'après le test « quel thésard es-tu » tu es le thésard parfait avec qui l'encadrement a été un plaisir. Alors merci pour ça et sachant à quel point tu es fort et fiable, j'ai une dernière requête à te demander, prends soin de notre Raïs à nous une fois que je serais partie.

**Patrick**, habitué de la salle de culture et d'imagerie du calcium, pour qui la salle de patch représente une no go zone, c'est au bureau que nos échanges se sont faits, ce fut un plaisir de découvrir et de savourer tes bons cafés fraîchement moulus le matin. Merci pour ces instants qui ont été déterminants lors de la fin de rédaction de ce manuscrit.

Un grand merci également aux anciens, **Charlotte**, **Benjamin** et **Taddy** qui se sont occupés de moi chenille, aujourd'hui, c'est le papillon qui vous remercie.

Je n'aurais jamais rencontré les personnes précédemment citées sans toi, **Léa**. Également nommée Tac (ou Tic je ne sais plus), la gueuse, ou Lou (par certains du labo qui sont ceux qui m'appellent Léa). On ne s'est d'abord pas appréciées, puis nous nous sommes apprivoisées, entraînées, entraînées, et par-dessus tout, on s'est bien marrées. Sans toi, je n'en serais probablement pas là. Parfois je me demande si ces 4 années de thèse n'étaient pas une solution pour t'avoir toujours à mes côtés. Plus qu'une collègue, qu'une amie tu as été ici ma trousse de survie. Nos soirées karaokés, la journée des résultats de la MRT, les fêtes de l'INCI sans parler de la plâtrée de midis et de de soirées, sont des moments à jamais gravés dans mes pensées (*et bientôt dans la peau*). Tel le ying et le yang, je ne suis pas loin d'être ton opposée, et ça a été un plaisir d'apprendre à aimer tes différences. Merci d'être toi, ne change rien (*ps, t'as vu j'ai pas parlé de licornes !*).

A nous deux, on aura quand même réussi à dompter l'indomptable : **Quentin**. Il m'aura fallu au moins 2 ans de dur labeur pour te faire esquisser un sourire, mais j'ai réussi !! De ton côté, toi, tu n'as pas cessé de me faire rire, même dans les moments compliqués de cette aventure qu'est la thèse. Différents sur bien des points, on a finalement fini par devenir complémentaires et une fois apprivoisés, on ne s'est plus lâchés : coéquipier d'exposés, de stage master, de moultes soirée et de la thèse, tu auras toujours été à mes côtés et ça a été un plaisir de partager ces instants avec toi. Alors merci à toi pour ces moments qui ont rendu cette thèse plus fun et douce. Je citerai bien cette merveilleuse blague qui fait de toi le comique du 3<sup>ème</sup> mais j'ai pas le temps, j'ai piscine.

**Léa, Quentin** : J'essaie de me convaincre que ce jour n'arrivera jamais, mais il arrive, et y'a pas à dire, une fois sur l'autre continent, vous aller plus que me manquer...

Bon, on y arrive : **Sylvain**, tout ce que je vais pouvoir écrire ici ne sera pas à la hauteur de ce que je pense. Il n'y a tout simplement pas de mot pour décrire cette thèse à tes cotés. Arrivée en stage d'été, on ne peut pas dire que je me sois présentée avec le starter pack de la thésarde idéale : j'étais là pour ne pas être loin de Léa, je ne comprenais rien au patch, j'avais des notes moyennes, l'écologie me manquait, j'avais peur de faire mal aux souris ou de me faire mordre et je ne savais pas écrire une phrase sans fautes. Alors oui, je savais ce qu'étaient un fossa et un fourmilion mais ce n'est pas le genre de choses qui allaient m'être utiles pour un master ou une thèse en électrophy. Et pourtant, tu m'as donné la chance d'intégrer l'équipe et une belle aventure a commencé. Il y a des rencontres qui changent une vie, et la tienne en fait partie. Tes encouragements, ta patience, ta pédagogie et le fait que tu croyais en moi, ont (presque) fait de ma thèse un long fleuve tranquille et je n'en garde que de bons souvenirs. Alors oui, à l'issue de ces 4 belles années je ne sais toujours pas écrire, mais j'ai plus confiance en moi et ça, c'était quand même pas gagné !! Je me souviens t'avoir dit un jour que la thèse ne serait pas ma vie, que je n'étais pas sûre de vouloir en faire une, que si oui, je ne resterais que 3 ans etc... et aujourd'hui c'est avec amertume que je dois dire au revoir à cette vie. Nos discussions neuro/éco/philo vont terriblement me manquer (surtout celles d'éco... je peux l'avouer maintenant ;)). J'ai eu le meilleur des encadrants et j'ai rencontré une très belle personne. Un grand merci, ne change rien, et une chose est sûre, rendez-vous dans la vie d'après.

Un grand merci à mes amies de toujours, **Amandine, Vic et Fanny**, merci de m'avoir soutenue avant et maintenant, absente pendant cette rédaction, je vous retrouve très vite pour rattraper le temps perdu.

Merci également aux doctorants (les anciens comme les nouveaux) ayant animés les moments intra et extra labo, je ne peux pas tous vous citer, à ceux avec qui j'ai partagé ces moments essentiels aux airs de thérapie, vous saurez vous reconnaître et merci.

Arrivent maintenant les remerciements à la famille :

Un immense merci à mon **Papa**, qui a toujours répondu présent quand j'en avais besoin, dans les bons comme dans les moments plus difficiles. Merci à toi qui as fait de moi la personne que je suis aujourd'hui.

A mon soutien de tous les jours, **Umut**, merci infiniment de m'épauler au quotidien, de m'avoir soutenu chaque jours de cette thèse sans jamais faillir.

**Coco, Joss et Henri, Pierre & Simon, Diane & Alix et Béné**, merci à vous qui m'avez vu et fait grandir.

Aux absents, **Maman, Nathan, Maurice et Mounette**, il n'y a pas un jour où je ne pense pas à vous, à ce que vous m'avez apporté. Vous continuez constamment de m'inspirer d'où vous êtes, et je vous en remercie infiniment.

Merci à vous tous,





# RESUME

Les informations nociceptives en provenance de la périphérie sont acheminées dans la corne dorsale de la moelle épinière par les fibres afférentes primaires de type C et A $\delta$ . Ces fibres codent les intensités des stimulations nociceptives adéquates sous la forme de fréquence de décharge de potentiels d'actions. Ces informations nociceptives sont traitées dans la corne dorsale de la moelle épinière, puis elles sont projetées aux centres supra-spinaux où la perception douloureuse pourra être élaborée. Dans la corne dorsale de la moelle épinière, la lamina II est la cible principale des fibres afférentes de type C et A $\delta$  qui y activent des réseaux d'interneurones excitateurs et inhibiteurs.

Dans d'autres structures du système nerveux, le traitement des informations codées en fréquence de décharge de potentiels d'action implique des phénomènes de plasticité à court-terme qui dépendent de la nature du neurone postsynaptique contacté.

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier les phénomènes de plasticité synaptique à court-terme (STP) des synapses inhibitrices entre les neurones de la lamina II de la corne dorsale de la moelle épinière. Nos objectifs spécifiques étaient de déterminer 1) si ces connexions exprimaient des mécanismes de STP lors d'activations répétées pouvant survenir lors de stimulations nociceptives de faible ou de forte intensité, 2) si ces plasticités différaient selon la nature excitatrice ou inhibitrice du neurone postsynaptique, 3) d'identifier des mécanismes impliqués dans ces STP, et 4) de déterminer si ces STP étaient modifiées en conditions douloureuses. Ces questions ont été abordées en réalisant des enregistrements électrophysiologiques de neurones de la lamina II dans des tranches aiguës de moelle épinière de souris transgéniques exprimant l'eGFP sous le contrôle du promoteur de la GAD65. La plasticité de la transmission synaptique inhibitrice de la lamina II a été étudiée par l'application de stimulations extracellulaires à faible fréquence (5 Hz) ou à fréquence élevée (50 Hz), correspondant aux types de fréquences activant ces réseaux lors de stimulations nociceptives faibles ou intenses. Pour déterminer si les plasticités de ces connexions étaient affectées en conditions douloureuses, nous avons procédé à des enregistrements similaires dans des neurones provenant de souris chez lesquelles une inflammation périphérique a été induite la veille par injection intraplantaire de carragénine.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse indiquent que : 1) les connexions GABAergiques entre les neurones de la lamina II expriment des mécanismes de STP qui diffèrent suivant la fréquence de stimulation du neurone présynaptique (basse ou haute fréquence) ; 2) ces plasticités diffèrent selon la nature du neurone postsynaptique (excitateur ou inhibiteur), même lorsque ces connexions impliquent le même neurone présynaptique, et 3) ces plasticités mettent en jeu l'activation de récepteurs GABA<sub>B</sub> et/ou A1 par des concentrations extracellulaires de leurs ligands endogènes ; 4) ces plasticités sont modifiées en conditions d'inflammation périphérique.

Les plasticités synaptiques à court-terme mises en évidence au cours de cette thèse pourraient avoir un impact sur la balance excitation/inhibition et contribuer au contrôle du gain des informations nociceptives en limitant l'excitation par rapport à l'inhibition. Ces plasticités et leur modulation par les récepteurs GABA<sub>B</sub> et A1 pourraient représenter des cibles pour le développement de stratégies analgésiques.



# SOMMAIRE

Résumé.....	9
Sommaire.....	11
Tables des illustrations et tableaux.....	15
Avant-propos.....	21
<b><u>PARTIE I : ORGANISATION DU SYSTEME NOCICEPTIF SPINAL ET DE LA LAMINA II.</u></b> .....	<b>25</b>
A. <u>Organisation de la moelle épinière.</u> .....	25
1. Organisation de la corne dorsale : les laminae.....	25
2. Organisation de la substance blanche.....	28
B. <u>Les entrées synaptiques vers la corne dorsale : Caractéristiques des fibres afférentes.</u> .....	28
1. Les fibres A $\beta$ .....	29
2. Les fibres A $\delta$ .....	29
3. Les fibres C.....	31
C. <u>Caractéristiques des neurones de la corne dorsale superficielle et en particulier de ceux de la lamina II.</u> .....	32
1. Les neurones excitateurs de la lamina II.....	33
a. Identification des neurones excitateurs.....	33
b. Les interneurones excitateurs aux morphologies identifiées.....	34
Les cellules verticales excitatrices.....	34
Les cellules centrales excitatrices.....	36
Les cellules radiales.....	37
2. Les neurones inhibiteurs de la lamina II.....	37
a. Identification des interneurones inhibiteurs.....	37
b. Les interneurones inhibiteurs aux morphologies identifiées.....	38
Les cellules centrales inhibitrices.....	38
Les cellules en ilot.....	39
Les cellules verticales inhibitrices.....	39
3. Classification neurochimiques des neurones excitateurs et inhibiteurs de la lamina II aux morphologies non identifiées ou variées.....	40
a. Les neurones exprimant la PKC $\gamma$ .....	41
b. Les neurones exprimant la calrétinine.....	41
c. Les neurones exprimant la parvalbumine.....	42
d. Les neurones exprimant le VGLUT3 durant le développement.....	42

4.	Profil de décharge de potentiels d'action des neurones de la lamina II.....	44
a.	Les différents profils de décharge rencontrés dans la lamina II.....	44
b.	Origine des différents profils de décharge de potentiels d'action.....	46
c.	Corrélation entre les caractéristiques électrophysiologiques et morphologiques.....	46
d.	Profil de décharge de potentiel d'action et fonction.....	49
5.	La connectivité des neurones de la lamina II.....	49
a.	Projections des afférences primaires dans la lamina II.....	49
b.	Connexion intra et inter laminaires des neurones de la lamina II.....	51
D.	<u>Les structures supra-spinales</u> .....	53
1.	Transmission des informations non-nociceptives.....	55
a.	La voie des cordons dorsaux.....	55
b.	Les faisceaux spino-cérébelleux.....	55
2.	Transmission des informations nociceptives.....	55
a.	Le faisceau spinothalamique.....	55
b.	Le faisceau spino-réticulo-thalamique.....	57
c.	Le faisceau spino-mésencéphalique.....	57
E.	<u>Les contrôles descendants</u> .....	58
a.	Contrôles descendants inhibiteurs.....	58
b.	Contrôles descendants facilitateurs.....	59
	<b><u>PARTIE II : LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE INHIBITRICE</u></b> .....	60
A.	<u>La transmission synaptique inhibitrice : généralités</u> .....	60
1.	Le GABA : Origine, synthèse, stockage, recapture et dégradation.....	60
a.	Découverte.....	60
b.	Synthèse, stockage, recapture et dégradation.....	61
2.	Les récepteurs du GABA.....	63
a.	Composition des récepteurs GABA <sub>A</sub> .....	63
b.	Agonistes, antagonistes et modulations.....	65
3.	L'inhibition par les récepteurs GABA <sub>A</sub> .....	67
a.	Inhibition shuntante.....	67
b.	L'inhibition hyperpolarisante.....	67
c.	Le gradient des ions chlorure.....	68
B.	<u>La transmission synaptique inhibitrice dans le système nociceptif spinal, et plus particulièrement dans la lamina II</u> .....	70
1.	Importance de la transmission synaptique inhibitrice dans le traitement de l'information nociceptive en conditions physiologiques de bases.....	73
2.	Modifications de la transmission synaptique inhibitrice au cours du développement.....	74

a.	L'importance du potentiel d'équilibre des ions Cl <sup>-</sup> .....	74
b.	Co-transmission GABA/glycine.....	75
c.	Neurostéroïdes.....	75
3.	En condition inflammatoire.....	76
a.	Mécanismes de désinhibition en condition inflammatoire.....	76
	La balance excitation/inhibition.....	76
	La co-transmission GABA/glycine.....	78
b.	Modulation de la transmission inhibitrice en condition inflammatoire.....	79
	Gradient des ions Cl <sup>-</sup> .....	79
	Modification de l'excitabilité par des médiateurs de l'inflammation.....	80
	Neurostéroïdes.....	80
4.	En condition neuropathique.....	81

**PARTIE III : LA PLASTICITE A COURT-TERME.....83**

A.	<u>La plasticité synaptique dépendante de l'activité</u> .....	83
1.	Les différents types de plasticité synaptique dépendante de l'activité.....	83
2.	La plasticité à court-terme : généralités.....	84
3.	Les mécanismes de la plasticité à court-terme dépendante de l'activité.....	87
a.	Les mécanismes de la plasticité à court-terme : implication l'élément présynaptique.....	87
	Changements de la probabilité de libération : hypothèse du « Calcium résiduel ».....	89
	Changements concernant les sites de libération.....	90
	Changement du nombre de vésicules immédiatement libérables (RRP).....	90
	Les messagers rétrogrades.....	90
b.	Les mécanismes de plasticité à court-terme mettant en jeu d'autres éléments que l'élément présynaptique.....	91
	Mécanisme de plasticité à court-terme ayant lieu dans la fente synaptique.....	91
	Implication de la glie dans la plasticité à court-terme.....	91
	Mécanisme de plasticité à court-terme ayant lieu dans le neurone postsynaptique.....	92
	Les propriétés fonctionnelles des récepteurs postsynaptiques.....	92
	Désensibilisation et saturation des récepteurs postsynaptiques.....	92
c.	Plasticité à court-terme cibles-spécifiques.....	93
B.	Implication des récepteurs GABA <sub>B</sub> dans la plasticité à court-terme.....	94
1.	Généralités concernant les récepteurs GABA <sub>B</sub> .....	94
2.	Les récepteurs GABA <sub>B</sub> dans la CDME.....	97
a.	Localisation cellulaire des récepteurs GABA <sub>B</sub> dans la corne dorsale.....	97
	Dans les neurones.....	97
	Dans les astrocytes et les cellules microgliales.....	98

b. Rôle des récepteurs GABA <sub>B</sub> de la corne dorsale dans la nociception.....	99
En condition inflammatoire.....	100
En condition neuropathique.....	101
C. <u>Implication des récepteurs de l'adénosine dans la plasticité à court-terme</u> .....	102
1. Généralité sur l'adénosine et ses récepteurs.....	102
a. L'adénosine.....	102
b. Les récepteurs de l'adénosine.....	102
2. Les récepteurs de l'adénosine dans la CDME.....	103
a. Localisation cellulaire des récepteurs de l'adénosine dans la CDME.....	103
Dans les neurones.....	103
Dans les astrocytes et la microglie.....	103
b. Rôle des récepteurs de l'adénosine dans la CDME dans la nociception..	105
<b>REVUE 1 : Short term plasticity (STP) in the spinal nociceptive system.....</b>	<b>107</b>
<b>RESUME DU MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>125</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>126</b>
Article1 .....	126
Article 2.....	143
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>173</b>
1. Nature excitatrice ou inhibitrice des neurones enregistrés.....	175
2. Les neurones stimulés, leur nombre et leur localisation.....	176
3. Nature des neurones stimulés et enregistrés.....	177
4. Importance des connexions étudiées dans les réseaux de la lamina II.....	180
5. Choix des fréquences de stimulation utilisées dans nos travaux et fréquences auxquelles sont soumis les neurones de la lamina II lors de stimulations nociceptives.....	181
6. Possible impact des plasticités étudiées sur le traitement des informations nociceptives dans la lamina II en conditions physiologiques de base.....	182
7. Possible mise en jeu de plasticités non étudiées au cours de nos travaux.....	184
8. Impact des contrôles modulateurs impliquant les récepteurs GABA <sub>B</sub> et A1.....	184.
9. Un rôle des plasticités et modulations étudiées dans les approches analgésiques non pharmacologiques ?.....	186
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>188</b>
<b>ANNEXES</b>	
<b>REVUE 2 : Stimulation médullaire : revue des hypothèses sur les mécanismes mis en jeu... </b>	<b>190</b>

# TABLES DES ILLUSTRATIONS

## INTRODUCTION

<b>Figure 1</b> : Organisation de la moelle épinière.....	26
<b>Figure 2</b> : Caractéristiques des fibres afférentes et leur projection dans la corne dorsale de la moelle épinière.....	30
<b>Figure 3</b> : Caractéristiques morphologiques et neurochimiques des types neuronaux de la lamina II.....	35
<b>Figure 4</b> : Profil de décharge de potentiels d'action des neurones de la lamina II.....	45
<b>Tableau 1</b> : Principales caractéristiques des types cellulaires de la lamina II.....	47
<b>Figure 5</b> : Neurones excitateurs et inhibiteurs de la corne dorsale de la moelle épinière (I-VI).....	48
<b>Figure 6</b> : Voies directes et indirectes de cheminement des informations nociceptives dans la lamina II.....	54
<b>Figure 7</b> : Représentation schématique des voies de traitement des informations douloureuses.....	56
<b>Figure 8</b> : Voie de synthèse et libération du GABA.....	62
<b>Figure 9</b> : La transmission synaptique inhibitrice GABAergique.....	64
<b>Figure 10</b> : Evolution du gradient des ions Cl <sup>-</sup> au cours du développement et en condition neuropathique et inflammatoire dans les neurones de la CDME.....	69
<b>Encadré 1</b> : Quelques définitions.....	71
<b>Figure 11</b> : Représentation schématique de l'hyperalgésie et de l'allodynie.....	72
<b>Figure 12</b> : Les modèles animaux de douleur.....	77
<b>Figure 13</b> : Plasticité à court-terme et plasticité à long-terme.....	85
<b>Figure 14</b> : Facilitation et dépression à court-terme.....	86
<b>Figure 15</b> : Principaux mécanismes de la plasticité à court-terme.....	88
<b>Figure 16</b> : Structure et caractéristiques principales des récepteurs GABA <sub>B</sub> .....	96
<b>Figure 17</b> : Structure des récepteurs A1 de l'adénosine et caractéristiques principales des récepteurs A1.....	104

## MATERIELS ET METHODES

<b>Figure 18</b> : Enregistrements électrophysiologiques de la transmission GABAergique dans les neurones de la lamina II.....	125
--	-----

## DISCUSSION

**Figure 20** : Connexions potentiellement enregistrées et plasticité de la transmission synaptique GABAergique de la connexion des cellules en ilot et les cellules centrales.....178

**Figure 21** : Connexions GABAergiques potentiellement étudiées: représentation schématique des modulations endogènes par des récepteurs GABA<sub>B</sub> et A1.....179



# ABBREVIATIONS

- A1,2,3** : récepteur de l'adénosine A1, A2,A3
- ACSF** : solution cérébro-spinale artificielle
- AFN** (neurone) : *pour adapting firing neurons*
- ADP** : adénosine-5'-diphosphate
- AMP** : adénosine-5'-monophosphate
- AMPA** : acide  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxalone-propionique
- AMPC** : adénosine monophosphate cyclique
- ARNm** : acide ribonucléique messenger
- ATP** : adénosine-5'-triphosphate
- BDNF** : facteur neurotrophique issu du cerveau (pour *brain-derived neurotrophic factor*)
- [Ca<sup>2+</sup>]<sub>intra</sub>** : Concentration intracellulaire de Ca<sup>2+</sup>
- [Ca<sup>2+</sup>]<sub>intra libre</sub>** : Concentration intracellulaire de Ca<sup>2+</sup> libre
- CB1** : Récepteurs aux cannabinoïdes de type 1
- CCI** : *Chronic Constriction Injury*
- CDME** : Corne dorsale de la moelle épinière
- CFA** : Complete *Freund's* Adjuvant
- CGRP** : Peptide relié au gène calcitonine (pour *Calcitonin gene related peptide*)
- [Cl<sup>-</sup>]<sub>intra</sub>** : concentration intracellulaire en ions Cl<sup>-</sup>
- CNQX** : 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
- CPSE** : Courant postsynaptique excitateur
- CPSI** : Courant postsynaptique inhibiteur
- CPSIe** : Courant postsynaptique inhibiteur évoqué
- CR** : Calrétinine
- DPCPX** : 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine
- DSE** : pour depolarization-induced suppression of excitation
- DSI** : pour depolarization-induced suppression of inhibition
- DYN** : Dynorphine
- EAAT3** : *Excitatory amino-acid transporter 3*
- E<sub>Cl<sup>-</sup></sub>** : Potentiel d'équilibre des ions Cl<sup>-</sup>
- ELFNI** : *extracellular leucine-rich repeat and fibronectin domain containing 1*

**ERK** : *Extracellular signal-regulated kinases*

**GABA** : acide  $\gamma$ -aminobutyrique

**GABA<sub>A</sub>** : récepteur du GABA de type A

**GABA<sub>B</sub>** : récepteur du GABA de type B

**GABA-T** : GABA transaminase mitochondriale

**GAD** : glutamate décarboxylase

**GAD65** : glutamate décarboxylase 65 (*Glutamic Acid Decarboxylase 65*)

**GAD67** : glutamate décarboxylase 67 (*Glutamic Acid Decarboxylase 67*)

**GAD 65::EGFP** : glutamate décarboxylase 65 exprimant une protéine fluorescente verte « augmentée »

**GAT1-3** : *GABA transporteur 1-3*

**GB1** : une sous-unité GABA<sub>B1</sub>

**GB2** : une sous-unité GABA<sub>B2</sub>

**HTMR** : Fibres répondant aux stimulations à haut seuil (pour *High threshold mechanical receptor*)

**IP3** : inositol triphosphate

**KCC2** : le co-transporteur K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>

**LMX1B** : gène pour LIM homeobox transcription factor 1

**MAOB** : Monoamine oxydase B

**ME** : Moelle épinière

**NKCC1** : le co-transporteur Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>

**NMDA** : N-méthyl-D-aspartate

**LPS** : lipopolysaccharides

**PA** : Potentiel d'action

**PAD** : pour *primary afferent depolarisation*

**PAG** : Substance grise périaqueducule

**PAX2** : *paired box gene 2*

**PKA** : protéine kinase A

**PKC** : protéine kinase C

**PKC $\gamma$**  : protéine kinase C de type gamma

**PIP2** : phosphatidylinositol-4,5-diphosphate

**PPR** : "paired-pulse ratio"

**PPSE** : Potentiel postsynaptique excitateur

**PV** : Parvalbumine

**sACSF** : solution cérébro-spinale artificielle enrichie en sucre

**SCS** : Stimulation médullaire (pour *Spinal Cord Stimulation*)

**SOM** : Somatostatine

**SNI** : *Spared Nerve Injury*

**SNL** : *Spinal Nerve Ligation*

**SNT** : *sciatic nerve transection*

**SP** : La substance P

**STP** : Plasticité à court-terme (pour *Short-term synaptic plasticity*)

**ST-F** : Facilitation à court-terme (pour *Short-term synaptic facilitation*)

**ST-D** : Dépression à court-terme (pour *Short-term synaptic depression*)

**rNK1** : Récepteur neurokinine 1

**RRP** : Ensemble de vésicules immédiatement libérables

**RRVP** : pour *ready released vesicle pool*

**RVM** : la partie rostro-ventro-médiale du bulbe rachidien

**SNC** : système nerveux central

**Tac1 et Tac2** : gène codant la neurokinine 1 et 2

**TENS** : Neurostimulation électrique transcutanée (pour *Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation*)

**THDOC** : Tetrahydro désoxycorticostérone

**TFN** (neurone): pour *tonic firing neurons*

**TLR4** : *Toll-Like Receptor 4*

**TLX3** : gènes de *T-cell leukemia homeobox protein 3*

**TRPA1** : *Transient receptor potential A1*

**TRPV1** : Récepteurs ionotropiques activés par des molécules de la famille des vanilloïdes (pour *Transient Receptor Potential Vanilloid type 1*)

**TSPO** : *Translocator Protein of 18 kDa*

**TTX** : *tétradotoxine*

**VGLUT 1,2,3** : Transporteur vésiculaire du glutamate de type 1,2,3

**VIAAT** : Transporteurs vésiculaires d'acides aminés inhibiteurs

**3 $\alpha$ 5 $\alpha$ THP** : Allopregnanolone

**3 $\alpha$ 5 $\beta$ THP** : Prégnanolone

**3 $\alpha$ 5 $\alpha$ THDOC** : tétrahydro-désoxycorticostérone 3 $\alpha$ 5 $\alpha$



# INTRODUCTION



# AVANT PROPOS

La douleur est une sensation qui, dans des conditions physiologiques, à un rôle protecteur permettant de prendre conscience que le corps a -ou risque- une atteinte à son intégrité. La douleur présente donc un rôle biologique et évolutif lorsqu'elle n'est pas pathologique. Le rôle d'alerte de la douleur était déjà noté par Descartes : « *La douleur n'est ni plus ni moins qu'un système d'alarme, dont la seule fonction est de signaler une lésion corporelle* » (Descartes, 1664).

Pour distinguer les processus physiologiques de détection et de traitement de l'information sensorielle des processus psychologiques de perception consciente de la douleur, Sherrington proposa d'utiliser le terme **nociception**. En effet, avant d'être interprétés comme douloureux, les stimuli sensoriels sont détectés et convertis en signaux électriques biologiques (messages nerveux), puis traités par le système nerveux. La détection et la conversion des informations sensorielles sont désignées par le terme de **transduction**, et dans le cas de la nociception, celles-ci sont réalisées par des neurones nommés **nocicepteurs**. Les nocicepteurs acheminent leurs informations **vers la corne dorsale de la moelle épinière**. L'ensemble des structures de la moelle épinière impliquées dans le traitement et la modulation de cette information est désigné sous le terme de **système nociceptif spinal**. Des neurones de ce système véhiculent les informations vers les **centres supra-spinaux** où la perception consciente de **la douleur** pourra survenir.

La sensation de douleur provoque la mise en route de comportements d'évitement et/ou de protection favorisant la guérison. L'inhibition de la douleur peut parfois présenter un avantage, comme par exemple lorsqu'elle favorise un comportement de fuite face à un danger. Dans certaines conditions, comme en situation de douleur neuropathique ou **inflammatoire**, les informations nociceptives sont intensifiées et la douleur exacerbée. Lorsqu'elle perd son rôle d'alarme, la douleur devient pathologique et peut persister, devenant alors chronique.

### *Un rôle clé de la lamina II dans le traitement et la modulation des informations nociceptives*

La **lamina II** est l'une des subdivisions de la corne grise dorsale de la moelle épinière. Des fibres afférentes nociceptives contactent virtuellement tous les neurones de la lamina II, qui sont organisés en réseaux. Des neurones de la lamina II contactent à leur tour les neurones de projections de la lamina I qui projettent après traitement l'information nociceptive vers les centres supra-spinaux. L'absence de neurones de projection dans la lamina II et la forte densité de neurones excitateurs et inhibiteurs locaux indiquent le rôle crucial de cette structure dans le traitement et l'intégration des informations nociceptives.

### *Un rôle attendu de la plasticité à court-terme dans le traitement des informations nociceptives*

Les informations nociceptives sont acheminées par les afférences sous forme de **trains de potentiels d'action** dont la fréquence code l'intensité des stimulations. Dans d'autres structures du système nerveux, l'intégration d'informations codées en fréquence de potentiels d'actions implique un type de plasticité particulier ayant un décours temporel très court (de l'ordre de la milliseconde à quelques minutes) qui est qualifié de **plasticité synaptique à court-terme**. Un rôle important de ce type de plasticité est donc probable dans le système nociceptif spinal. Pourtant, ce type de plasticité n'a pratiquement jamais été étudié dans la corne dorsale de la moelle épinière.

### *L'importance de l'inhibition dans le traitement de l'information nociceptive au niveau spinal*

Environ 25-40% des neurones de la lamina II sont des **neurones inhibiteurs**. Et bien que ces neurones soient minoritaires, l'inhibition est d'une importance fondamentale pour le traitement des informations nociceptives et par conséquent, de la douleur pouvant en résulter. En effet, le blocage de la **transmission synaptique inhibitrice** dans la moelle épinière entraîne des états d'hyperalgésie et d'allodynie chez le rongeur et le blocage des récepteurs du GABA et de la glycine (deux neurotransmetteurs inhibiteurs) permet l'accès d'informations non-nociceptives aux réseaux traitant les informations nociceptives. De plus, de nombreuses études ont mis en évidence des altérations de la transmission synaptique inhibitrice dans le système nociceptif spinal en conditions inflammatoires et neuropathiques, confirmant le rôle majeur de l'inhibition dans le système nociceptif spinal.



**Pour ces raisons, mon projet** de thèse consistait à étudier la plasticité à court-terme dans le système nociceptif spinal, en focalisant mes recherches sur la transmission synaptique inhibitrice GABAergique entre les neurones de la lamina II en conditions de base et lors d'une inflammation périphérique.

L'**introduction** de ma thèse est divisée en trois parties. La première partie présente le **système nociceptif spinal** et détaille plus particulièrement la lamina II. La seconde partie traite de la **transmission synaptique inhibitrice GABAergique**, de son implication dans le système nociceptif spinal, et de ses modifications dans les états pathologiques. La dernière partie de l'introduction présente la **plasticité synaptique à court-terme** dépendant de l'activité, et concernera principalement la **transmission synaptique GABAergique**. Cette dernière partie sera présentée sous forme d'un manuscrit d'article de revue de la littérature traitant de la plasticité synaptique à court-terme dans le système nociceptif spinal (**Revue 1**).

La section **Résultats** de ma thèse comprend un premier article (**Article 1**) issu de ces travaux, intitulé « *Inhibitory interneurons with differential plasticities at their connections tune excitatory/inhibitory balance in the spinal nociceptive system* » sous presse dans la revue Pain, ainsi qu'un deuxième manuscrit (**Article 2**) abordant les mêmes questions en conditions d'inflammation périphérique intitulé : « *Changes in short-term synaptic plasticities of GABAergic transmission with lamina II neurons in inflammatory conditions* ».

En parallèle de mon projet, j'ai réalisé des enregistrements électrophysiologiques en complément des travaux de thèse de Benjamin Léonardon, encadré par le Dr. Perrine Inquimbert. Le manuscrit correspondant est intitulé : « *Modulation of GABAergic synaptic transmission by NMDA receptors in the dorsal horn of the spinal cord* », et ne sera pas présenté dans le cadre de cette thèse.

L'émergence de nouvelles approches analgésiques consistant à appliquer des trains de stimulations électriques sur la peau (Neurostimulation électrique transcutanée, **TENS** pour *Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation*) ou directement sur le système nerveux spinal (**stimulation médullaire**, **SCS** pour *Spinal Cord Stimulation*) donnent des résultats très concluants et produisent un soulagement pour les patients souffrant de douleurs chroniques.

Bien que ces approches soient connues depuis plusieurs dizaines d'années, leurs mécanismes d'action restent mal connus et peu étudiés. Plusieurs études suggèrent que la corne dorsale de la moelle épinière serait un site d'action majeur de ces nouvelles approches, impliquant les neurones GABAergiques de la lamina II ainsi que des mécanismes de plasticité au sein des réseaux spinaux. Certaines des fréquences de stimulation utilisées lors de ces approches non pharmacologiques suggèrent une mise en jeu des mécanismes de plasticité synaptique à court-terme que j'ai étudiés. Par ailleurs, ces mécanismes de plasticité synaptiques à court-terme impliquent des récepteurs GABA<sub>B</sub> et A1 de l'adénosine, or ces récepteurs modulent également l'efficacité de la stimulation médullaire.

Pour cette raison, dans la dernière partie de la discussion de cette thèse seront discutées la possible contribution des mécanismes que j'ai étudiés dans les effets analgésiques de ces procédures non pharmacologiques de stimulation électrique directe de la moelle épinière. Cette partie comprend un projet de manuscrit d'une revue sur ce sujet (**Revue 2, en Annexe**).

# PARTIE I : ORGANISATION DU SYSTEME NOCICEPTIF SPINAL ET DE LA LAMINA II

Les informations sensorielles, nociceptives ou non, en provenance du tronc et des membres sont acheminées vers la corne dorsale de la moelle épinière (**CDME**) par les **fibres afférentes primaires**. Ces informations sont ensuite projetées via des **faisceaux spécifiques**, aux centres **supra-spinaux** donc certains pouvant donner lieu à la perception douloureuse.

Dans cette partie, les différents éléments composants le système nociceptif spinal ainsi que les principales aires cérébrales traitant ces informations et/ou participant à leur interprétation consciente sont présentés.

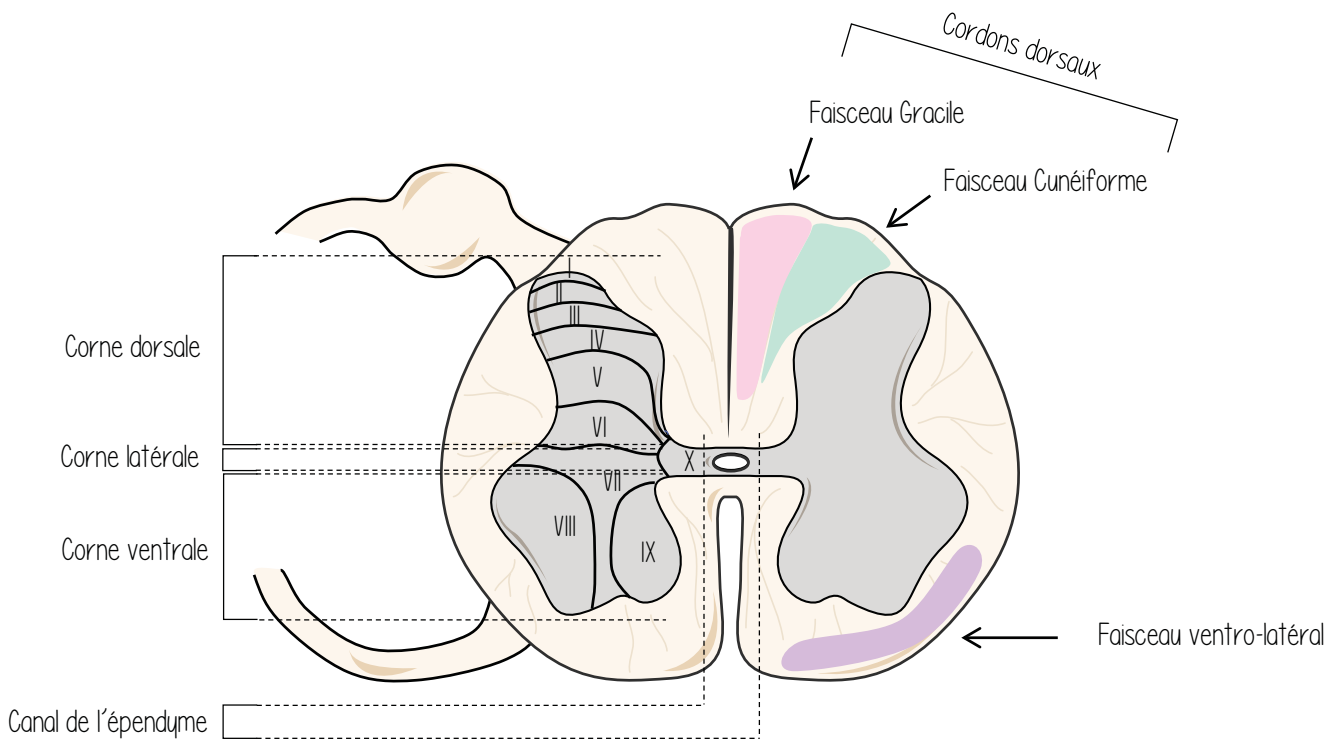
## A. Organisation de la moelle épinière

Chez les mammifères, la moelle épinière peut être subdivisée en cinq régions dans l'axe antéro-postérieur : la moelle cervicale, thoracique, lombaire, sacrée et coccygienne. La moelle épinière présente deux renflements, l'un aux étages traitant les informations concernant les membres antérieurs et l'autre aux étages traitant celles concernant les membres postérieurs : le renflement cervical et le renflement lombo-sacré. Dans la moelle épinière (**ME**), la substance grise contenant les corps cellulaires des neurones est entourée par la substance blanche composée principalement de fibres (faisceaux d'axones). Cette localisation relative de la substance blanche et de la substance grise est inversée par rapport à celle du cerveau. La substance grise de la moelle épinière est divisée en cornes dorsales et ventrales. Les informations sensorielles sont acheminées dans la CDME par les fibres afférentes primaires (cf. § A.1) cheminant dans les racines dorsales. Les racines ventrales sont empruntées par les axones de motoneurones somatiques véhiculant les informations motrices de la moelle vers les muscles striés squelettiques.

### I. Organisation de la corne dorsale : les laminae

La substance grise de moelle épinière peut être délimitée en couches appelées **laminae**. La classification utilisée aujourd'hui est celle établie par le neuroanatomiste suédois Bror Rexed, qui subdivisa chez le chat la substance grise en dix laminae, chacune étant désignée par un

A.



**Figure 1 : Organisation de la moelle épinière**

La **corne dorsale** de la moelle épinière est constituée des **laminae (I-VI)**. Les **fibres A $\beta$**  contactent les neurones des LIII-V, les **fibres A $\delta$**  et **C** contactent les laminae I, II, III et IV. La **corne latérale** est constituée de la lamina VII. La **corne ventrale** de la moelle épinière est constituée des laminae VIII-IX organisées en colonne ventrales. La lamina X entoure le **canal de l'épendyme**. La **substance blanche** contient plusieurs faisceaux dont les cordons dorsaux contenant le **faisceau Gracile** et le **faisceau Cunéiforme** transportant les informations des membres inférieurs et supérieurs respectivement. Dans les cordons ventraux, il y a le faisceaux **ventro-latéral** qui transmet les informations nociceptives aux centres supra-spinaux.

chiffre romain de I à X (LI à LX) (Rexed, 1952). Cette classification est fondée sur les propriétés cytoarchitecturales des neurones (la densité des corps cellulaires, leur morphologie et la taille de l'arborisation dendritique) dans la moelle épinière. Cette classification s'applique aussi bien aux rongeurs qu'à l'humain.

**La CDME** est formée par les six premières laminae qui sont organisées sous forme de couches. La lamina VII représente la **corne latérale** et les laminae VIII-IX, organisées sous forme de colonnes longitudinales, forment la **corne ventrale**. La lamina X, entoure le **canal de l'épendyme** [Figure 1].

Les paragraphes suivants traitent de l'organisation laminaire de la CDME car ce sont des réseaux de neurones de cette structure que j'ai étudiés.

**La lamina I**, est nommée également zone marginale de Waldeyer. Elle est constituée d'une fine couche de neurones d'une largeur de 30-40  $\mu\text{m}$  chez le chat (Rexed, 1952). Cette lamina contient des interneurons et des neurones de projection. Elle joue un rôle important dans le traitement des informations sensorielles nociceptives et thermiques puisque les neurones qui la constituent sont contactés par les fibres afférentes de faible diamètre (les fibres A $\delta$  et fibres C) transmettant les informations nociceptives et thermoceptives (Craig, 2000) (cf. Partie I § A.1).

**La lamina II**, est également nommée substance gélatineuse de Rolando ou *Substantia Gelatinosa* à cause de son aspect gélatineux de par son absence de fibres myélinisées mais également à cause de sa forte concentration en neurones à petit corps cellulaire. Cette lamina joue un rôle crucial dans l'intégration et la modulation des informations nociceptives. Elle peut se diviser en une partie externe (IIe) et interne (Iii). Chez la souris, cette dernière, peut également être divisée en une partie dorsale (IIid) et ventrale (IIiv) (Abraira et al., 2017). Elle est la principale structure dans laquelle font synapse les fibres afférentes de faible diamètre finement ou non myélinisées (respectivement les fibres A $\delta$  et les fibres C). Ces fibres transmettent les informations nociceptives, thermiques, de prurit et des informations tactiles non nocives (Christensen & Perl, 1970; Sugiura, Lee, & Perl, 1986; Tuckett & Wei, 1987a, 1987b; Vallbo, Olausson, & Wessberg, 1999). De plus, la lamina II intègre des informations en provenance des contrôles descendants (cf. Partie I § E) modulant la transmission des informations nociceptives.

**Les laminae III/IV** de la moelle épinière se distinguent de la lamina II par la présence de nombreuses fibres myélinisées. Les interneurons la constituant intègrent les informations provenant des fibres de gros diamètre (A $\beta$ ) et de petit diamètre finement myélinisées (A $\delta$ ).

Les **laminae V/VI** sont localisées à la base de la CDME et sont constituées de neurones de projection recevant les informations des fibres de gros et de petit diamètre ainsi que des neurones pouvant être multimodaux (des neurones à convergence, *Wide Dynamic Range*) sur lesquels convergent des informations nociceptives et non nociceptives. La lamina VI est présente uniquement dans les segments cervicaux et lombaires.

## 2. Organisation de la substance blanche

La substance blanche est divisée en cordons dorsaux, latéraux et ventraux. Chacun de ces cordons contient des faisceaux d'axones assurant des fonctions spécifiques. Les cordons dorsaux transportent les informations sensorielles en provenance des mécanorécepteurs. Les cordons latéraux contiennent le faisceau cortico-spinal qui prend naissance dans le cortex cérébral et contacte les neurones de la moelle épinière. **Le faisceau ventro-latéral** transmet aussi bien les informations ascendantes nociceptives, thermiques et des contrôles descendants moteurs (Purves, 2001) au travers des faisceaux spino-thalamique, spino-réticulaire et spino-mésencéphalique (cf. Partie I, § D.2) **[Figure 1]**.

### B. Les entrées synaptiques vers la corne dorsale : Caractéristiques des fibres afférentes

Les fibres afférentes primaires sont les axones des neurones sensoriels dont le corps cellulaire est localisé dans les ganglions rachidiens. Les fibres afférentes sont classées en fonction **de leur vitesse de conduction** (dépendant de leur diamètre et de leur degré de myélinisation). Plusieurs autres critères comme leurs **cibles périphériques** (cibles cutanées ou viscérales), **les propriétés de leurs réponses** (modalité évoquant leur activation et seuils d'activation) ainsi que leur **neurochimie** (l'expression de peptides par exemple) (Todd, 2010) sont également pris en compte. Ainsi, les fibres afférentes cutanées peuvent être regroupées en 3 catégories : **les fibres A $\alpha$ / $\beta$ , les fibres A $\delta$ , les fibres C**.

La proportion de ces fibres innervant la peau est respectivement de 20, 10 et 70% (Millan, 1999). Bien que ces fibres présentent des seuils de sensibilité différents aux stimuli nociceptifs et non nociceptifs, elles sont toutes les trois impliquées dans la transmission des informations sensorielles. Des fibres A $\beta$ , A $\delta$  et C transmettent des informations non-nociceptives mais en

condition normale, seules les fibres A $\delta$  et C participent à la transmission des informations nociceptives. Par ailleurs, ces différentes fibres afférentes projettent dans des territoires différents de la CDME et présentent des caractéristiques électrophysiologiques distinctes (voir plus bas). Ces fibres afférentes possèdent des marqueurs neurochimiques spécifiques permettant de les identifier. Ces marqueurs ne seront pas développés dans le paragraphe qui suit, pour en savoir plus, voir (Ruscheweyh, Forsthuber, Schoffnegger, & Sandkuhler, 2007).

### 1. Les fibres A $\beta$

Les fibres de type A $\beta$  sont des fibres de grand diamètre (6-12  $\mu\text{m}$ ), myélinisées, présentant la vitesse de conduction de potentiel d'action (**PA**) la plus élevée (de 30 à 100  $\text{m}\cdot\text{sec}^{-1}$ ) [Figure 2, A]. La majorité des fibres A $\beta$  sont des mécanorécepteurs activés par des stimuli mécaniques à bas seuil (non nocifs) (cf Partie II, § B. 1) (Zeilhofer, Wildner, & Yevenes, 2012). Les fibres A $\beta$  sont les axones de différents mécanorécepteurs tactiles présents dans la peau (Djoughri & Lawson, 2004).

*Remarque* : Le groupe de fibres fortement myélinisées et à vitesse de conduction rapide contient en plus des A $\beta$ , les fibres A $\alpha$ . Alors que les A $\beta$  correspondent à des mécanorécepteurs qui renseignent sur les stimuli externes, les fibres A $\alpha$  sont des propriocepteurs. Ces derniers sont des récepteurs qui sont sensibles à la position du corps et non pas à son environnement. Ce qui relève de la proprioception ne sera pas détaillé dans ce manuscrit.

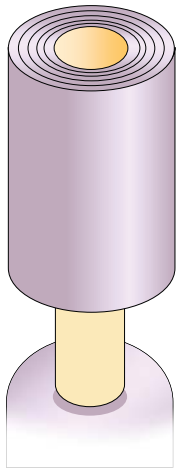
### 2. Les fibres A $\delta$

Les fibres A $\delta$  ont un diamètre d'environ 1-5  $\mu\text{m}$ , inférieur à celui des fibres A $\alpha/\beta$ . Elles sont finement myélinisées et présentent une vitesse de conduction intermédiaire de 12-30  $\text{m}\cdot\text{sec}^{-1}$  [Figure 2, A]. Les terminaisons périphériques des fibres A $\delta$  sont des terminaisons libres. Lors de l'application d'un stimulus nociceptif sur la peau, ces fibres A $\delta$  transmettent les informations qui génèrent la première phase, rapide, de la douleur (Handwerker & Kobal, 1993; Torebjork & Hallin, 1973; Treede, Meyer, Raja, & Campbell, 1992).

Deux grands types de fibres A $\delta$  ont été décrits (Treede, Meyer, & Campbell, 1998).

**Les fibres A $\delta$  de type I** innervent la peau glabre et poilue. Ce type est constitué de nocicepteurs mécaniques et thermiques au chaud. Les fibres A $\delta$  de type I présentent un seuil d'activation

A. Fibre A $\beta$



Diamètre : 6-12  $\mu\text{m}$   
 Vitesse de conduction : 30-100  $\text{ms}^{-1}$   
 → Proprioception, toucher discriminatif, pression, vibrations

Fibre A $\delta$



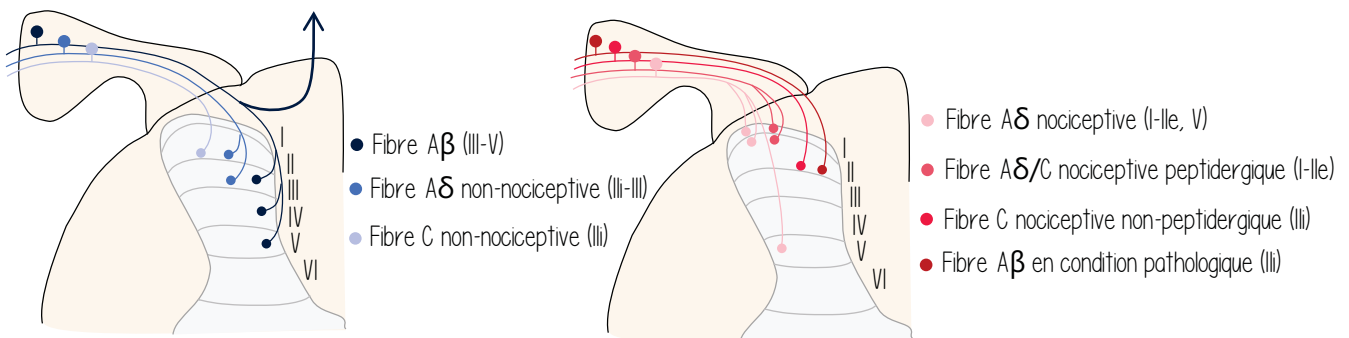
Diamètre : 1-5  $\mu\text{m}$   
 Vitesse de conduction : 12-30  $\text{ms}^{-1}$   
 → Nociception, T $^{\circ}$ ; toucher non discriminatif

Fibre C



Diamètre : 0,2 , 0,5  $\mu\text{m}$   
 Vitesse de conduction : 0,5-2  $\text{ms}^{-1}$   
 → Nociception, non nociception , démangeaison

B.



**Figure 2 : Caractéristiques des fibres afférentes et de leur projection dans la corne dorsale de la moelle épinière**

**A.** Caractéristiques des fibres afférentes. **B.** Transmission des informations non-nociceptives (**bleu**) et nociceptives (**rouge**). Après avoir été détectées en périphérie par les récepteurs sensoriels, les informations non-nociceptives sont acheminées par les fibres afférentes non-nociceptives dans la corne dorsale de la moelle épinière. **Les fibres A $\beta$**  projettent en grande majorité dans les **laminae III-V**. Ces fibres peuvent contacter des neurones de la lamina II ayant une arborisation dendritique qui s'étend jusqu'à la lamina III. Ces connexions ne semblent avoir d'impact fonctionnel qu'en **conditions douloureuses** (inflammatoire ou neuropathique). Quelques fibres A $\beta$ , contactent des neurones de la **lamina II** mais uniquement la partie la plus interne (Ili) (Peirs, C. and R. P. Seal, 2016). **Les fibres A $\delta$  non-nociceptives** (notamment celles innervant les follicules pileux) projettent dans les laminae plus superficielles (II-III) (Todd, A.J., 2010) et **les fibres C non nociceptives**, projettent quant à elles dans la lamina Ili (Woodbury, C. J. and H. R. Koerber, 2003 ; Seal, R et al., 2009). Pour revue, cf. Villanueva, L. et Bernard, J.F 2010. **C. Transmission des informations nociceptives (rouge)** : Les fibres véhiculant des informations nociceptives contactent principalement les laminae les plus superficielles tandis que celles véhiculant des informations non-nociceptives contactent principalement des laminae plus profondes.

**Les fibres nociceptives A $\delta$**  contactent les neurones des laminae I, IIe et V et **les fibres A $\delta$ /C nociceptives peptidergiques** (CGRP, Substance P) projettent dans la lamina I et IIe (Milan, M. J. 1999) alors que la plupart des **fibres C non-peptidergiques** (liant l'IB4) contactent les neurones de la Ili (Zylka, M. J., 2005 ; Todd, A.J., 2010).



mécanique modéré mais un seuil d'activation thermique très élevé (>53°C). Ce sont des fibres qui participent à l'hyperalgésie lors de l'application d'un stimulus thermique de forte intensité et de longue durée dans la peau glabre (Meyer & Campbell, 1981; Treede et al., 1998). Elles participent à la sensation douloureuse suite à une stimulation (Treede et al., 1998).

**Les fibres Aδ de type II** possèdent, contrairement à celles de type I, un seuil d'activation mécanique très élevé et un seuil plus faible pour les stimuli thermiques (>46°C). Elles participent à la sensation de douleur suite à une stimulation thermique chaude (Treede et al., 1998).

**Les fibres Aδ qui innervent la peau poilue** représentent un groupe à part. Elles sont activées par des stimuli mécaniques et nocifs froids (Cain, Khasabov, & Simone, 2001).

### 3. Les fibres C

Les fibres C ont un petit diamètre (0,2-0,5 µm). Elles ne sont pas myélinisées et transmettent les informations avec une vitesse de conduction lente d'environ 0,5-2 m.sec<sup>-1</sup> [Figure 2, A]. Les terminaisons périphériques de ces fibres, comme celles des fibres Aδ sont libres. La majorité de ces fibres sont activées par des stimuli nocifs de nature thermique ou mécanique, cependant, certaines participent à la transmission de messages thermiques (chaud ou froid) non nocifs ou à la transmission de stimuli mécaniques de faible intensité dites **HTMR** (pour *High Threshold Mechanical Receptor*) (Zeilhofer et al., 2012). Lors de l'application d'un stimulus nociceptif sur la peau, contrairement aux fibres Aδ transmettant les informations de la phase rapide de la douleur, les fibres C transmettent les informations de la seconde phase de la douleur, plus lente et plus sourde (Handwerker & Kobal, 1993; Torebjork & Hallin, 1973; Treede et al., 1992). Leur implication dans la transmission des sensations de démangeaison a également été mise en évidence (McGlone & Spence, 2010). Parmi les fibres C, des chémorécepteurs, des thermorécepteurs au chaud et au froid ainsi que des mécanorécepteurs à bas seuil sensibles à la pression ont été décrits (Meyer RA, 1994).

L'une des caractéristiques d'une sous population de fibres C et Aδ est leur sensibilité à la capsaïcine, le principe actif du piment, qui se fixe sur les récepteurs ionotropiques **TRPV1** (*Transient Receptor Potential Vanilloid type 1*).

Les nocicepteurs C peuvent être divisées en deux sous-groupes : les fibres C **peptidergiques** et les **non-peptidergiques**. Les premières libèrent des neuropeptides comme le peptide relié

au gène calcitonine (**CGRP** pour *Calcitonin Gene Related Peptide*) ainsi que la Substance P dans la plupart des cas. Les fibres C non-peptidergiques, comme leur nom l'indique, ne libèrent pas de peptides (Snider & McMahon, 1998).

Une sous-population de fibres C s'active lors de faibles stimuli mécaniques (Bessou & Perl, 1969) et exprime le transporteur vésiculaire du glutamate de type 3 (**VGLUT3**). Il semblerait que ce groupe de fibres joue un rôle crucial dans l'établissement de l'allodynie mécanique lors de pathologies (lésion nerveuse ou inflammation) (Seal et al., 2009).

Pour en savoir plus sur les fibres afférentes, voir Dubin and Patapoutian (2010).

*Remarque* : Cette classification est simplifiée par rapport à la complexité des différents types d'afférences. En effet, les fibres A $\alpha$ / $\beta$  par exemple, peuvent transmettre des informations nociceptives (Djoughri & Lawson, 2004).

Les fibres C et A $\delta$  considérées généralement comme nociceptives et thermoceptives peuvent transmettre des informations mécaniques non-nociceptives (Alvarez et al., 2000; Braz et al., 2014).

Pour les fibres C et A $\delta$ , il existe une multitude de classes qui peuvent différer selon l'espèce et le territoire innervé (« peau avec poil et sans poil ») (Millan, 1999).

**En conclusion** : La CDME est une structure traitant les informations sensorielles en provenance du tronc et des membres. Les fibres A $\beta$  transmettent essentiellement les informations non-nociceptives relatives au toucher et elles projettent une collatérale vers les neurones des couches profondes de la CDME (laminae III à V). Les fibres A $\delta$  et C correspondent en majorité à des thermocepteurs ou nocicepteurs et contactent préférentiellement la CDME plus superficielle (laminae I-II) [Figure 2, B].

### C. Caractéristiques des neurones de la corne dorsale superficielle et en particulier de ceux de la lamina II

Les neurones de la CDME peuvent être divisés en deux catégories : les neurones dont les axones projettent vers des centres supra-spinaux (**les neurones de projection**) et les neurones dont les axones restent dans la moelle épinière (**les interneurones**). Les neurones de projection sont uniquement excitateurs et représentent 10% des neurones de la CDME (Todd, 2010). Les

interneurones représentent 90% des neurones présents dans la CDME superficielle ou profonde (Graham, Brichta, & Callister, 2007; Todd, 2010; Zeilhofer et al., 2012). Chez la souris et le rat, entre 60 et 70% de ces interneurones sont des **interneurones excitateurs** et 30-40% sont des **interneurones inhibiteurs** (Polgar, Durrieux, Hughes, & Todd, 2013; Polgar et al., 2003; Todd, 1990). Les interneurones inhibiteurs utilisent le **GABA** (acide  $\gamma$ -aminobutyrique) et/ou la **glycine** comme principal neurotransmetteur inhibiteur, et les **interneurones excitateurs** utilisent le **glutamate** comme neurotransmetteur.

La lamina II ne contient que des interneurones (excitateurs et inhibiteurs). La lamina I quant à elle contient 5% de neurones de projection (Saeed & Ribeiro-da-Silva, 2013; E. T. Zhang & Craig, 1997). Ces derniers transmettent les informations nociceptives et thermoceptives à des structures supra spinales comme celles du tronc cérébral telles que la substance grise périaqueducule (**PAG**) et le noyau parabrachial (Almarestani, Waters, Krause, Bennett, & Ribeiro-da-Silva, 2007) ; ou du cerveau : en effet, 9% d'entre eux projettent vers le thalamus (Yu, Ribeiro-da-Silva, & De Koninck, 2005). Des neurones de projection sont également dispersés dans la lamina III. Les neurones de la lamina III, font synapse avec les neurones de la lamina II.

Il est compliqué de classer certains neurones inhibiteurs et excitateurs car il n'existe généralement pas de liens entre la morphologie et les propriétés électrophysiologiques (à quelques exceptions près (cf Partie I, § C. 4. c.)). Dans les paragraphes qui suivent, les interneurones excitateurs et inhibiteurs sont présentés, ainsi que les différents types de morphologies rencontrés dans la lamina II. Enfin, d'autres classifications reposant sur l'expression de certains marqueurs seront évoquées.

## I. Les neurones excitateurs de la lamina II

### a. Identification des neurones excitateurs

Les interneurones excitateurs de la moelle épinière utilisent le glutamate comme neurotransmetteur. Il a longtemps été impossible de marquer les corps cellulaires des neurones glutamatergiques par des techniques d'immunohistochimie comme c'est le cas avec les

neurones GABAergiques (cf. Partie I, § C.2.a.). Les neurones excitateurs étaient donc identifiés par défaut, lorsqu'ils ne présentaient pas de marqueurs de neurones inhibiteurs (cf Partie I, § C.2.a.).

Bien que les corps cellulaires ne puissent pas directement être identifiés comme appartenant à un neurone glutamatergique, les axones eux, peuvent être identifiés par le marquage de transporteurs vésiculaires du glutamate. Il existe trois types de transporteurs vésiculaires de ce neurotransmetteur (**VGLUT1-3**). VGLUT1 est le sous-type le plus exprimé dans les laminae III et IV, VGLUT2 est présent dans la lamina I-II (Punnakkal, von Schoultz, Haenraets, Wildner, & Zeilhofer, 2014). Enfin, le sous-type VLGUT3 est exprimé transitoirement dans une population particulière de neurones de la lamina IIi durant le développement (Peirs et al., 2015).

Aujourd'hui, il est possible de distinguer les neurones excitateurs et inhibiteurs en utilisant comme marqueurs l'expression de certains facteurs de transcription (Lai, Seal, & Johnson, 2016; Peirs et al., 2020). Ainsi, les neurones dont les gènes de *T-cell leukemia homeobox protein 3* (**TLX3**) et le *LIM homeobox transcription factor 1 beta* (**LMX1B**) sont toujours exprimés à l'âge adulte peuvent être considérés comme des neurones excitateurs.

La proportion de neurones excitateurs est de 75% dans la CDME.

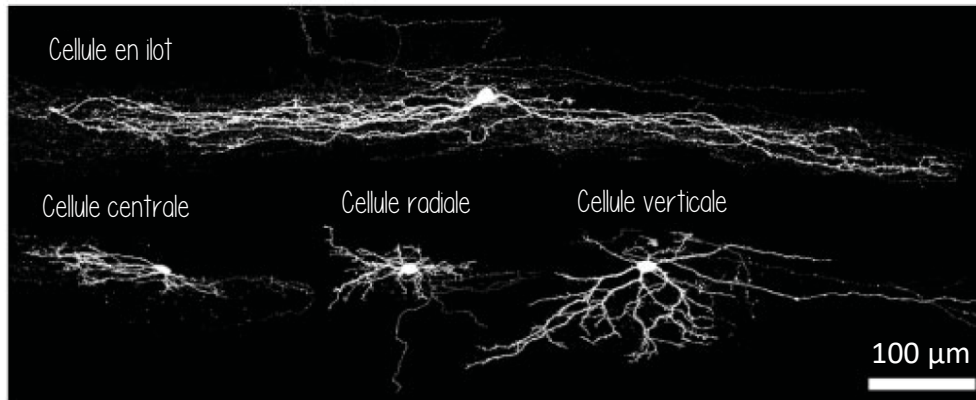
## **b. Les interneurones excitateurs aux morphologies identifiées**

### *Les cellules verticales excitatrices*

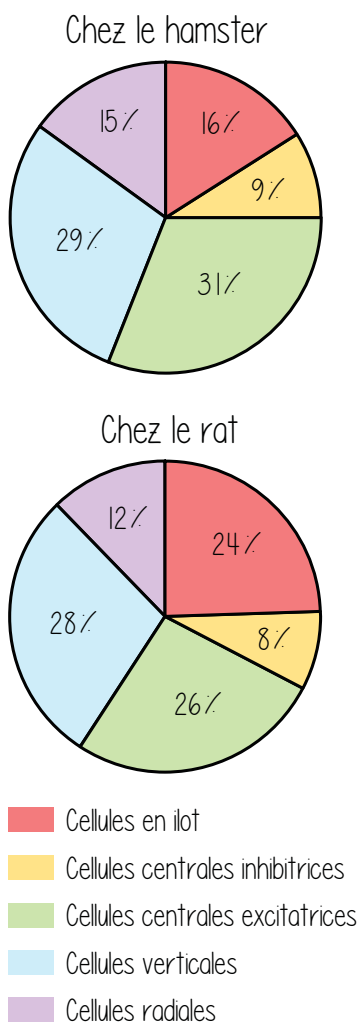
Les cellules verticales ont été décrites pour la première fois par Ramon y Cajal en 1909 dans la moelle épinière de chat (Ramón y Cajal, 1909-1911). Elles sont également retrouvées sous le nom de « *stalked neuron* » suite aux travaux de Gobel (Gobel, 1975, 1978) chez le chat également. Comme leur nom l'indique, les cellules verticales sont caractérisées chez les rongeurs par leurs dendrites orientées ventralement et sagittalement [Figure 3, A et B].

Les neurones ayant une morphologie de cellules verticales représentent 29% des interneurones de la lamina II chez le hamster et le rat (Lu & Perl, 2003, 2005). Parmi les neurones de la lamina II, 32% sont des cellules verticales excitatrices chez la souris (Heinke et al. 2004). Mais elles peuvent parfois être inhibitrices, (cf Partie 1, § C.2.b. Les cellules verticales inhibitrices).

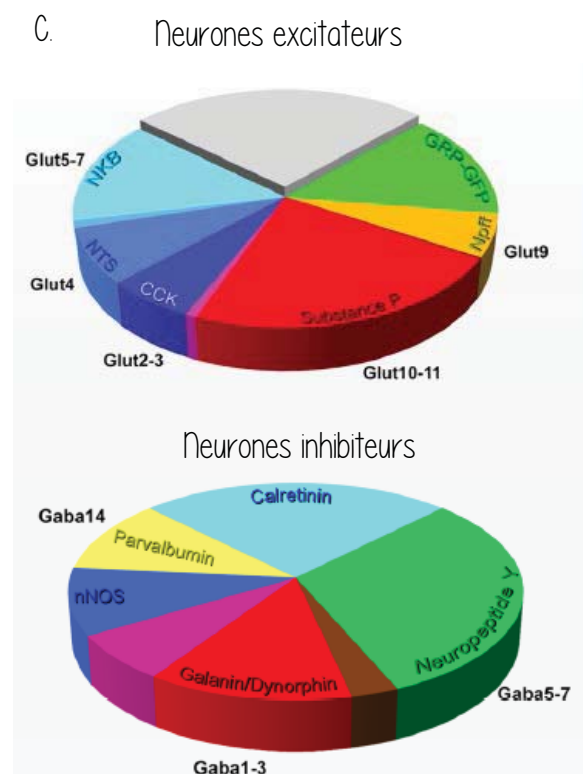
A.



B.



C.



**Figure 3 : Caractéristiques morphologiques et neurochimiques des types neuronaux de la lamina II**  
**A.** Morphologie des 4 principaux types neuronaux de la lamina II identifiés par Grudt et Perl (2002) observés sur tranche parasagittale de moelle épinière de rats au microscope confocal. Les neurones ont été marqués à la neurobiotine. Image provenant de *Todd et al. (2017)* reproduite dans Yasaka et al. (2010). **B.** Proportion des neurones aux morphologies identifiées dans la lamina II chez le hamster (*Grudt, T. J. et Perl, E. R. 2002*) et le rat (*Lu et Perl, E. R. 2003*). **C.** Populations neurochimiques identifiées des neurones excitateurs (**en haut**) et inhibiteurs (**en bas**) de la lamina II compilées dans *Peirs et al., 2021*.

Le corps cellulaire des cellules verticales se trouve principalement dans la lamina IIe et les prolongements de ces cellules peuvent s'étendre de la lamina I à la lamina IV. Leur axone contacte principalement des neurones de projection de la lamina I (Gobel & Falls, 1979).

Des études suggèrent que des sous-groupes de cellules verticales excitatrices peuvent exprimer la dynorphine (**DYN**) (Huang et al., 2018) ou la calrétinine (**CR**) (K. M. Smith et al., 2015; K. M. Smith et al., 2016).

Ce type cellulaire est présent chez les primates et l'humain, chez lesquels il présente également des ramifications axonales atteignant des laminae plus profondes (Grudt & Perl, 2002 ; Price et al., 1979).

#### *Les cellules centrales excitatrices*

Ramón y Cajal (1909-1911) a identifié en 1909 dans la moelle épinière de chat les cellules centrales. Ces neurones qui peuvent être excitateurs ou inhibiteurs sont situés au milieu de la lamina II et présentent une arborisation dendritique rostro-caudale [Figure 3, A].

Ces cellules centrales excitatrices représentent 31% (chez le hamster) et 27% (chez le rat) des interneurons de la lamina (Lu & Perl, 2003, 2005).

Elles se distinguent des cellules centrales inhibitrices de par leur profil de décharge de potentiel d'action (capacité à décharger des potentiels d'action lors de leur dépolarisation). Les cellules centrales excitatrices possèdent le profil de décharge de type Transitoire/Phasique (*Transient*) (Lu & Perl, 2003) alors que les cellules centrales inhibitrices présentent en majorité des profils de décharge tonique (Lu & Perl, 2003) (cf Partie 1, § 2.b. *Les cellules centrales inhibitrices*). Pour ces raisons, ces neurones sont souvent désignés sous le nom de Cellule Centrale Transitoire et Cellule Centrale Tonique (cf Partie I, § C.4.c.) Il a été montré que des populations d'interneurones excitateurs exprimant l'isoforme  $\gamma$  de la protéine kinase C (**PKC $\gamma$** ) (Alba-Delgado et al., 2015), ou la CR (Smith et al., 2015 ; Smith et al., 2016), ou encore exprimant transitoirement le transporteur vésiculaire du glutamate VGLUT3 (Peirs et al., 2015), présentent une morphologie de type cellule centrale. Leur présence chez les primates n'est à ma connaissance pas documentée. Ceci peut s'expliquer par

le fait qu'elles ont pendant longtemps été considérées comme des cellules en îlot dont la présence est attestée chez l'humain et les primates non humains (cf Partie I, § C.2.b *Les cellules en îlot*).

### *Les cellules radiales*

Les cellules radiales ont été décrites pour la première fois chez le rat par Bicknell et Beal (Bicknell & Beal, 1984; Polgar et al., 2008). Les cellules radiales sont généralement localisées dans la lamina II (Dickie et al., 2019; Grudt & Perl, 2002) où elles représentent 15% (chez le hamster (Lu & Perl, 2003)) et 12% (chez le rat (Lu & Perl, 2005)) des neurones. Les cellules radiales pourraient correspondre à un groupe de neurones identifiés par Todd et Lewis (1986) (Todd & Lewis, 1986) ainsi qu'aux « cellules étoilées » décrites chez l'humain (Schoenen, 1982). D'un point de vue morphologique, ces cellules se caractérisent par une arborisation dendritique multidirectionnelle sans orientation prédominante [Figure 3, A et B]. De études récentes suggèrent que ces neurones peuvent exprimer la substance P (SP) (Dickie et al., 2019), la CR (K. M. Smith et al., 2015; K. M. Smith et al., 2016) ainsi que la PKC $\gamma$  (Abraira et al., 2017). Comme indiqué précédemment, elles sont présentes chez l'humain (Schoenen, 1982).

## 2. Les neurones inhibiteurs des laminae II

### a. Identification des neurones inhibiteurs

Il est possible de distinguer les neurones inhibiteurs par immunocytochimie. Les neurones inhibiteurs peuvent être identifiés en utilisant des anticorps dirigés contre le GABA ou la glycine, qui sont présents en grande quantité dans le corps cellulaires des neurones inhibiteurs (Todd & Sullivan, 1990). Il est également possible d'analyser l'expression de certains facteurs de transcription comme le *paired box gene 2* (PAX2) et le *gastrulation brain homeobox 1* (GBX1). Des lignées de souris transgéniques exprimant une protéine fluorescente verte (Enhanced green fluorescent protein, eGFP) sous le contrôle du promoteur de l'enzyme de synthèse du GABA, la glutamate décarboxylase 67 (GAD67) (Heinke et al., 2004) ou la glutamate décarboxylase 65 (GAD65) (Cui et al., 2011; Labrakakis, Rudolph, & De Koninck, 2014) permettent d'identifier directement les neurones GABAergiques par la présence d'une fluorescence verte. La lignée développée par Cui et al. 2011 est celle qui a été utilisée lors de mes travaux.

Ainsi, il a récemment été montré chez le rat que 36-53% des neurones de lamina I-III et 54-58% des neurones des laminae IV-V sont des neurones inhibiteurs qui co-expriment PAX2 et le GABA (Larsson, 2017).

Chez la souris, le nombre d'interneurones inhibiteurs dans les laminae I-II est estimé à 26% (30% pour la lamina II (Polgar et al., 2003; Todd & Sullivan, 1990)) et à 38% dans la lamina III (Polgar et al., 2013).

Chez la souris, les neurones GABAergiques représentent 24% des neurones de la lamina II et cette proportion est similaire à celle retrouvée chez le rat (Polgar et al., 2013; Polgar et al., 2003; Todd & Sullivan, 1990).

Dans la lamina II, tous les neurones présentant une forte immunoréactivité à la glycine sont également marqués par les anticorps anti GABA, mais une proportion de synapses est uniquement GABAergique, et c'est d'ailleurs également le cas dans les laminae I et III. Ceci suggère que certains neurones co-localisent le GABA et la glycine alors que certains libèrent uniquement du GABA.

## **b. Les interneurones inhibiteurs aux morphologies identifiées**

### *Les cellules centrales inhibitrices*

Comme pour les cellules centrales excitatrices, des cellules centrales inhibitrices ont été identifiées par Ramón y Cajal (1909-1911) dans la moelle épinière de chat. Ces neurones sont localisés au milieu de la lamina II et présentent une arborisation dendritique rostro-caudale [Figure 3, A et B]. Les cellules centrales inhibitrices, représentent 9% des neurones de la lamina II chez le hamster (Lu & Perl, 2003) et 8% chez le rat (Lu & Perl, 2005). D'un point de vue morphologique, elles se caractérisent par une arborisation dendritique rostro-caudale, plus petite que celle des cellules en îlot (voir plus bas). Les cellules centrales inhibitrices se différencient des cellules centrales excitatrices par leur profil de décharge tonique de potentiels d'action (PA) (Lu & Perl, 2005) ainsi que par l'expression de certains marqueurs. Par exemple, certaines cellules centrales inhibitrices exprimeraient la parvalbumine (PV) (Abraira et al., 2017; Boyle et al., 2019). Leur présence chez les primates n'est à ma connaissance pas documentée. Ceci peut s'expliquer par le fait, tout comme pour les cellules centrales



excitatrices, qu'elles aient pendant longtemps été considérées comme des cellules en ilot dont la présence est bien attestée chez le primate et l'humain (voir ci-dessous).

### *Les cellules en ilot*

Les cellules en ilot ont été identifiées pour la première fois chez le chat par Gobel 1975, 1978b (Gobel, 1975, 1978). Elles représentent 16% des neurones de la lamina II chez le Hamster (Lu & Perl, 2003), 24% chez le rat (Lu & Perl, 2005).

Les cellules en ilot sont caractérisées par leur large arborisation dendritique orientée dans l'axe rostro-caudal (Gobel, 1978; Schoenen, 1982) [Figure 3, A et B]. Ce type morphologique correspond exclusivement à des neurones inhibiteurs utilisant le GABA et/ou la glycine comme neurotransmetteur (Heinke et al., 2004; Todd & Sullivan, 1990; Yasaka, Tiong, Hughes, Riddell, & Todd, 2010). D'après les travaux de Bennett et al 1980, les cellules en ilot ayant leur corps cellulaires dans la lamina IIe sont purement nociceptives alors que celles dont le corps cellulaire est localisé dans la lamina Iii sont mécanoreceptives non-nociceptives (Bennett, Abdelmoumene, Hayashi, & Dubner, 1980). Comme les cellules centrales inhibitrices, des cellules à la morphologie de cellule en ilot expriment la PV (Abraira et al., 2017; Boyle et al., 2019) et certaines expriment la CR (Alba-Delgado et al., 2015; K. M. Smith et al., 2015; K. M. Smith et al., 2016). Les cellules en ilot sont présentes chez les primates (D. D. Price et al., 1979) et chez l'humain (Schoenen, 1982).

*Remarque : Les cellules en ilot joueraient un rôle dans l'effet analgésique de stratégies analgésiques non médicamenteuses basées sur la stimulation électrique de la moelle épinière. En effet, une partie de l'effet analgésique obtenu par cette approche thérapeutique impliquerait la stimulation directe des cellules en ilot de la lamina II. Ce point est évoqué dans la revue préparée dans le cadre de ma thèse (Revue 2 en Annexe).*

### *Les cellules verticales inhibitrices*

Les cellules verticales ont pendant longtemps été considérées comme exclusivement excitatrices mais plusieurs études suggèrent que ce n'est pas toujours le cas. En effet, plusieurs neurones classifiés morphologiquement comme étant des cellules verticales se sont avérés exprimer l'enzyme de synthèse du GABA (Heinke et al., 2004; Maxwell, Belle, Cheunsuang, Stewart, & Morris, 2007). Chez la souris, les cellules verticales inhibitrices représentent 14%

des neurones inhibiteurs de la lamina II (Heinke et al., 2004). Elles possèdent les mêmes caractéristiques morphologiques que les cellules verticales excitatrices, leur arborisation dendritique atteignant des laminae profondes [Figure 3, A].

*Pour aller plus loin :*

🔍 Pour revue sur la classification neurochimique des neurones de la CDME voir (Russ et al., 2021; Todd, 2017).

🔍 Pour revue sur les caractéristiques morphologiques et électrophysiologiques des neurones de la lamina II voir (Grudt & Perl, 2002)

### 3. Classification neurochimique des neurones excitateurs et inhibiteurs de la lamina II aux morphologies non identifiées ou variées

La classification des neurones de la CDME est relativement complexe, car contrairement à ce qui existe dans de nombreuses structures cérébrales, il n'y a généralement pas de corrélation forte entre la morphologie, les marqueurs neurochimiques et les propriétés électrophysiologiques des neurones de cette structure.

En effet, en parallèle à la classification morphologique détaillée plus haut, certains neurones ont été caractérisés par la présence de marqueurs ou de combinaisons de marqueurs.

Dans cette partie, des populations récemment décrites qui sont caractérisées par l'expression d'un marqueur particulier (sans que leur morphologie soit réellement connue) seront présentées. Il est important de noter que ces types cellulaires pourraient être associés à une morphologie déjà présentée dans la Partie I, § C.1.b et C.2.b.

La liste présentée ci-dessous n'est pas exhaustive et d'autres marqueurs sont exprimés dans les neurones de la lamina II [Figure 3, C], cependant, nous avons choisi de ne décrire que ceux pouvant être en relation avec mon sujet de recherche.

### **a. Les neurones exprimant la PKC $\gamma$**

Une population d'interneurones exprimant la PKC $\gamma$  (neurones PKC $\gamma$ ) localisés dans la lamina IIi et dans la partie externe de la lamina III serait impliquée dans les états d'allodynie en condition douloureuse (Artola, Voisin, & Dallel, 2020). Cette population représente 14% des neurones de la lamina III chez le rat (Peirs et al., 2014) et correspond à une sous-population des neurones exprimant la somatostatine (**SOM**) chez la souris (Duan et al., 2014). Des études morphologiques (Peirs et al., 2014), électrophysiologiques (Alba-Delgado et al., 2015) et transcriptomiques (Haring et al., 2018) indiquent que des neurones PKC $\gamma$  présentent une hétérogénéité et appartiennent au moins à deux sous-groupes ayant potentiellement des fonctions distinctes. Ces sous-groupes semblent ne pas pouvoir être « superposés » à d'autres populations déjà identifiées. Abraira et al. (2017), ont décrit une population de neurones exprimant PKC $\gamma$  qui possèdent un arbre dendritique rétréci en condition inflammatoire. Il a été montré que des populations d'interneurones excitateurs à la morphologie de cellule centrales, expriment la PKC $\gamma$  (Alba-Delgado et al., 2015).

L'inhibition des neurones PKC $\gamma$  de la CDME réduit l'allodynie mécanique chez les rats et les souris après une lésion nerveuse, suggérant que cette population est impliquée dans le traitement des informations nociceptives en condition neuropathique (Petitjean et al., 2015; Zou et al., 2011). Les neurones PKC $\gamma$  ne semblent en revanche pas participer au traitement des informations nociceptives lors d'états inflammatoires persistants (Gao & Ji, 2010; Miraucourt, Dallel, & Voisin, 2007a; Peirs et al., 2015). En condition neuropathique, les neurones PKC $\gamma$  sont plus facilement recrutés par les fibres A $\beta$  suite à une diminution d'un contrôle inhibiteur exercé sur ces neurones (Petitjean et al., 2015).

Chez le primate, l'activation de la PKC $\gamma$  contribue au développement de la sensibilisation centrale dans les neurones de la CDME produite par stimulation chimique avec de la capsaïcine mais une population de neurones exprimant la PKC $\gamma$  n'a pas été directement identifiée. A ma connaissance, il n'y a pas de données indiquant directement la présence de neurones exprimant la PKC $\gamma$  dans le système nociceptif spinal humain.

### **b. Les neurones exprimant la calrétinine**

Une population de neurones exprimant la CR (neurones CR) est localisée dans les couches superficielles de la CDME (I-II) (Peirs et al., 2015). Parmi ces neurones excitateurs exprimant la CR, 42 % expriment également le gène codant la neurokinine 1 et 2 (**Tac1** et **Tac2** respectivement). Néanmoins, l'expression de Tac1 n'est pas propre aux neurones excitateurs

exprimant la CR puisque 15 % des neurones inhibiteurs exprimant la CR expriment également Tac1.

La morphologie de ces neurones est plutôt variée, correspondant aux cellules radiales, verticales ainsi qu'à des types non définis (Peirs et al., 2020). Il a été montré que des populations d'interneurones excitateurs exprimant la CR présentent une morphologie de type cellule centrale (K. M. Smith et al., 2015; K. M. Smith et al., 2016). A notre connaissance, il n'y a pas de population de neurones exprimant la CR qui ait été identifiées dans la lamina II des primates.

### **c. Les neurones exprimant la Parvalbumine**

Une population de neurones exprimant la PV (neurones PV) a été identifiée dans la lamina III. La majorité des corps cellulaires des neurones PV sont localisés dans la partie III de la lamina II (Antal, Freund, & Polgar, 1990; Ren & Ruda, 1994) ainsi qu'à la limite entre les laminae II/III (Yamamoto, Carr, Baimbridge, & Nagy, 1989). Les neurones PV représenteraient 11% des neurones de la lamina II et 20% des neurones de la lamina III (Abraira et al., 2017). Ces neurones présentent une morphologie ressemblant à celle des cellules en ilot (Abraira et al., 2017; Boyle et al., 2019; Hughes et al., 2012) (Partie I, § C.2.b. *Les cellules en ilot*).

En 2009, Zacharova et al. ont montré une réduction de l'immunoréactivité de 37% de la PV dans la CDME superficielle du côté ipsilatéral à une inflammation périphérique induite par arthrose (Zacharova, Sojka, & Palecek, 2009). Zacharova et al. suggèrent que cette diminution peut refléter la diminution de l'expression de la PV dans les neurones GABAergiques. Les cellules PV possèderaient une morphologie de cellule centrale (Peirs, Dallel, & Todd, 2021). Parmi les cellules en ilot (voir plus haut) certaines expriment la PV.

Les neurones PV contactent les neurones PKC $\gamma$  (Petitjean et al., 2015). Récemment, il a été montré que les neurones PV des laminae II et III, participaient au développement de l'hypersensibilité mécanique en condition pathologique (Gradwell et al., 2021).

### **d. Les neurones exprimant le VGLUT3 durant le développement**

En 2015, Peirs et al. ont identifié chez la souris une population de neurones exprimant VGLUT3 durant les deux premières semaines postnatales. Ces neurones sont principalement

localisés dans la lamina III et dans une moindre mesure dans la lamina II (Peirs et al., 2015). Certains interneurons excitateurs des laminae profondes de la CDME pourraient avoir des morphologies similaires à celles des cellules verticales, des cellules radiales ou des cellules centrales décrites par Grudt and Perl (2002) dans la lamina II, et des neurones excitateurs VGLUT3 pourraient faire partie de ces neurones (Peirs et al., 2021).

*Remarque : La CDME contient également des cellules non neuronales. Dans ce manuscrit de thèse, nous nous focaliserons sur les réseaux neuronaux, mais les cellules non neuronales jouent également un rôle majeur dans le traitement de l'information et sa plasticité au sein de cette structure notamment en conditions inflammatoires et neuropathiques (Audinat & Arnoux, 2014; Coull et al., 2005; Kettenmann, Hanisch, Noda, & Verkhratsky, 2011; Seibt & Schlichter, 2015).*

**En conclusion** : Les populations de neurones de la lamina II sont très **diversifiées**, tant sur le plan **morphologique** que **neurochimique**. Il est parfois difficile de relier les éléments de réseaux décrits avec l'une ou l'autre des classifications, car celles-ci ne sont pas totalement superposables. Il est intéressant de noter que, jusqu'à récemment, il n'y avait pas de gènes dont l'expression était caractéristique d'une seule population de neurone dans la CDME. En effet, ces dernières sont en général caractérisées par l'expression d'un cocktail de gènes et parfois, par l'absence d'expression d'un ou de plusieurs gènes. Cette situation a récemment évolué suite aux travaux de Russ et al. (2021) qui ont fourni une vue complète des différentes populations de neurones de la moelle épinière en se basant sur l'expression de combinaisons **plusieurs de marqueurs** (Russ et al., 2021). Cependant, il ne faut pas exclure que des profils distincts de gènes pourraient être exprimés par des neurones d'une même population dans un état différent.

## 4. Profil de décharge de potentiels d'action des neurones de la lamina II

### a. Les différents profils de décharge rencontrés dans la lamina II

Dans ce paragraphe, les différents profils de décharge de potentiel d'action ainsi que leurs critères d'identification seront présentés.

*Remarque : La classification ainsi que ces critères d'identification peuvent être différents selon les auteurs. De plus, les profils peuvent également dépendre de la composition intracellulaire ainsi que du potentiel de maintien du neurone (avant l'application des créneaux de dépolarisation) comme cela a déjà été montré dans la lamina II (Yasaka et al., 2010).*

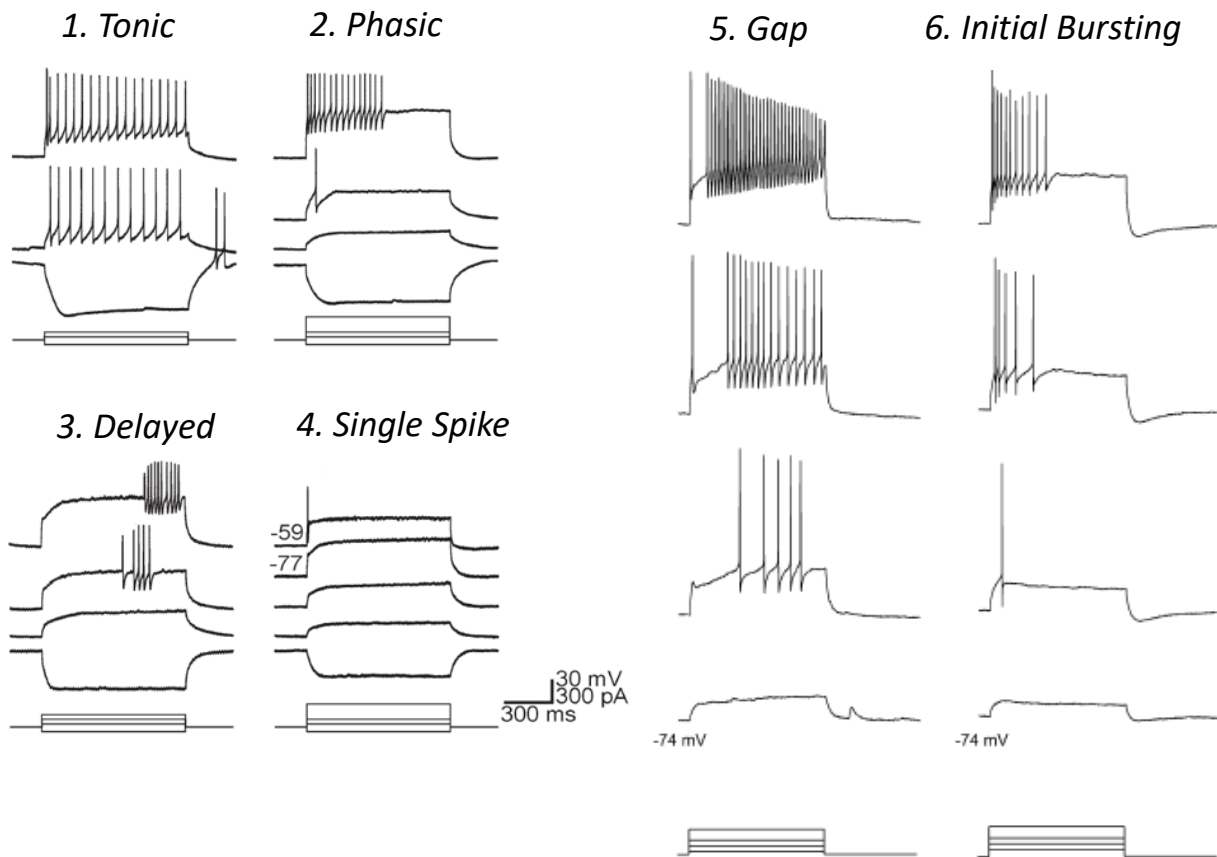
Le profil de décharge de potentiels d'action des neurones représente leur capacité à générer des potentiels d'action lors de leur dépolarisation. Il peut être étudié par l'application de créneaux de courant dépolarisant dans le but d'atteindre la rhéobase et d'observer le motif des potentiels d'action déchargés pendant ce créneau.

Plusieurs motifs de décharge ont été observés dans la CDME [Figure 4]. Afin qu'il n'y ait pas de confusion ou d'ambiguïté entre ce manuscrit et la littérature en anglais, les différents profils seront nommés ici selon leur terminologie anglaise indiquée en *italique*.

🔍 Voir Figure 4 pour la description des différents profils de décharge observés dans la lamina II.

Plusieurs études ont renseigné les propriétés électrophysiologiques des neurones et notamment les différences entre les laminae chez le rongeur (Boakye et al., 2018; Grudt & Perl, 2002; Ruscheweyh & Sandkuhler, 2002). D'après leur travaux, la distribution des profils varie en fonction des laminae, les neurones au profil *tonic* se trouveraient majoritairement dans la lamina I et les laminae plus profondes mais pas dans la lamina II contrairement au profil *phasic/initial bursting* qui lui se trouverait principalement dans celle lamina.

🔍 La morphologie, les profils de décharge, le potentiel de membrane au repos et la localisation des neurones de la lamina II sont résumés dans le Tableau 1.



**Figure 4 : Profil de décharge de potentiels d'action des neurones de la lamina II**

Le profil de décharge **tonic (1)** se caractérise par une décharge de potentiels d'action constante lors de la dépolarisation avec un intervalle entre PA constant. Le profil **phasic (2)** se caractérise par une décharge rapide de trains de potentiels d'action à haute fréquence aléatoire et d'une durée variable. Le profil **delayed (3)** est attribué aux neurones déchargeant irrégulièrement avec la présence d'un délai avant le premier potentiel d'action. Le profil **single spike (4)**, se caractérise quant à lui par la présence d'un unique potentiel d'action même lors de l'application de fortes dépolarisations (Prescott et De Koninck 2002).

D'autres profils ont également été décrits, comme le profil **gap (5)** avec un délai entre le premier et le deuxième PA et le profil **Initial Bursting (6)** qui se caractérise par une décharge rapide de trains de potentiels d'action à haute fréquence au début de la dépolarisation d'une durée variable (Heinke et al., 2004) ainsi que le profil **reluctant (7)** qui se caractérise par l'absence de potentiel d'action malgré une forte dépolarisation (non illustré) (Yasaka et al., 2010).

## b. Origine des différents profils de décharge de potentiels d'action

Plusieurs travaux ont permis d'identifier les causes pouvant sous-tendre les différences de profils de décharge de potentiels d'action.







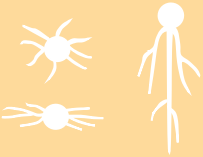

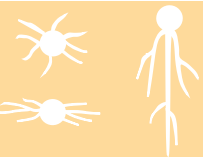
Par exemple, dans la lamina II, chez des neurones dit « **TFN** » pour *tonic firing neurons*, le profil de décharge semble dépendre des courants  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  d r ( *delayed-rectifying*) (la suppression du  $\text{Ca}^{2+}$  n'influence pas le profil) (Melnick, Santos, Szokol, Szucs, & Safronov, 2004). Chez les neurones dit « **AFN** » pour *adapting firing neurons*, les courants  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  d r sont également responsables du profil (et pas les courants  $\text{Ca}^{2+}$ ), en revanche ils sont de plus faible amplitude. Les TFN deviennent AFN en présence de **TTX** (tétrodoxtine, un bloquant des canaux sodiques dépendants du potentiel) ce qui suggère que la composante  $\text{Na}^+$  dépendant du potentiel est cruciale pour définir le profil de décharge. Concernant la morphologie des neurones AFN, ils possèdent un long axone ce qui suggère que la diminution des courants  $\text{Na}^+$  n'est pas due à une éventuelle section de l'axone (Melnick, Santos, & Safronov, 2004).

D'autre part, le délai avant le premier PA observé dans les neurones *delayed* pendant un créneau de dépolarisation s'expliquerait par l'activation d'un courant potassique voltage-dépendant de type transitoire : courant I-A (Melnick, Santos, & Safronov, 2004).

## c. Corrélation entre les caractéristiques électrophysiologiques et morphologiques

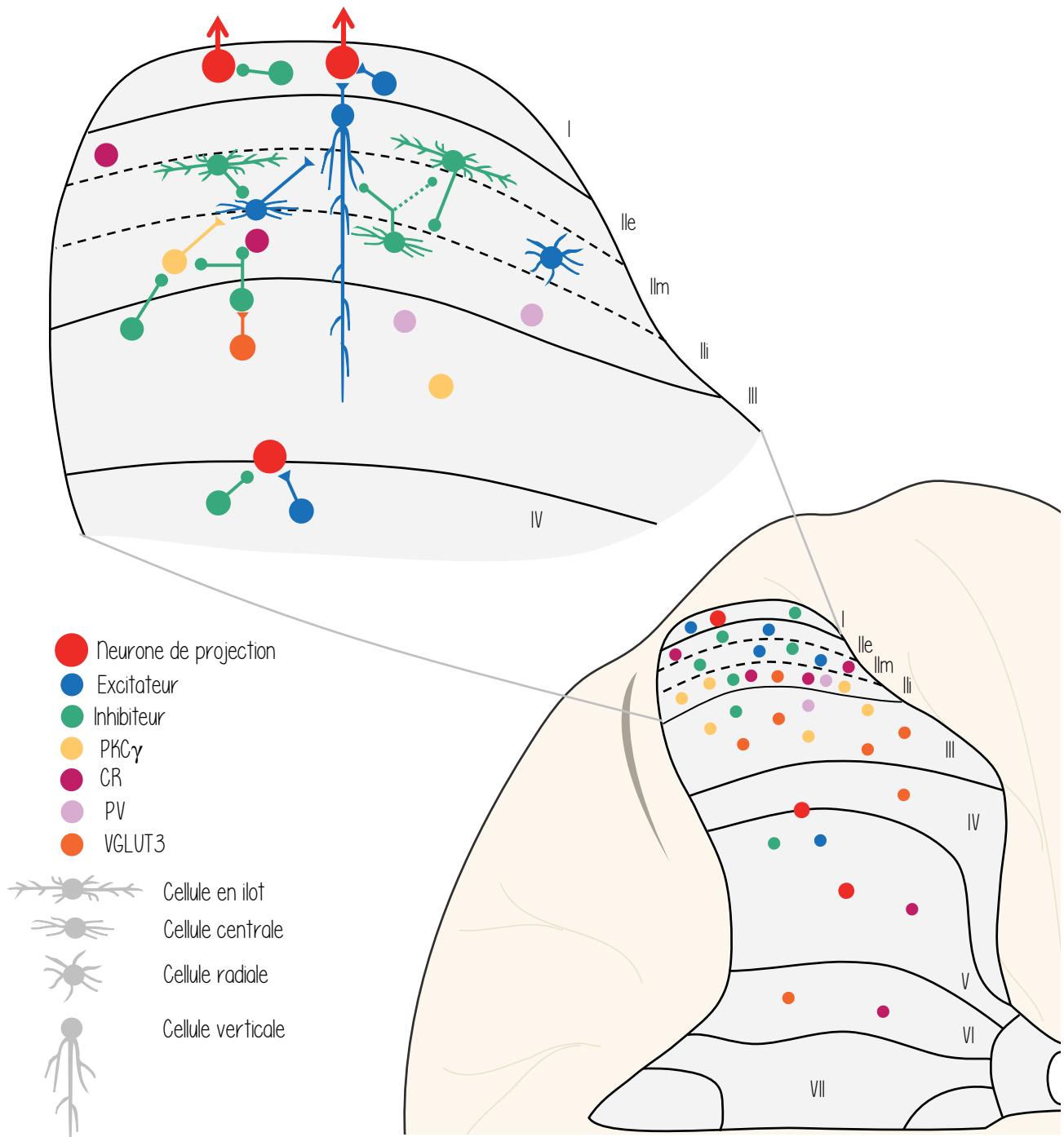
Dans la lamina II, plusieurs profils de décharge ont été identifiés (Grudt & Perl, 2002; Lu & Perl, 2005). Les profils *tonic*, *phasic*, *delayed* et *single spike* sont présents, tout comme dans la lamina I. Il existe dans la lamina II des profils de décharge non rencontrés dans la lamina I : le type *gap-firing* et le type *reluctant to fire* (pas de potentiel d'action). Dans certains cas, ces profils de décharge de potentiel d'action représentent un bon critère d'identification. Les cellules verticales peuvent avoir des profils de décharge de types *tonic* ou *delayed* (Todd, 2017), les cellules radiales peuvent avoir un profil de décharge de type *delayed*, les cellules centrales inhibitrices et excitatrices sont de types *tonic* et *phasic* respectivement (Grudt & Perl, 2002; Todd, 2017).



Morphologie	Type	Profil de décharge	Référence profil de décharge	Potentiel de membrane (mv)	Référence Rmp	Localisation
	<b>Cellules verticales excitatrices</b>	Tonic (1) Delayed (2)	(1) Grudt et Perl 2002 (2) Grudt et Perl 2002 et Yasaka et al. 2010	-60.6±1.6	Grudt et Perl 2002	II (Ile)
	<b>Cellules centrales excitatrices</b>	Phasic	Grudt et Perl 2002	-58.5±2.2	Grudt et Perl 2002	II (IIIm)
	<b>Cellules radiales</b>	Delayed	Grudt et Perl 2002 Yasaka et al. 2010	-56.4±2.9	Grudt et Perl 2002	II
	<b>Cellules en ilot</b>	Tonic	Grudt et Perl 2002 Yasaka et al. 2010	<b>-47.4±3.7</b>	Grudt et Perl 2002	II (Ile/Ili)
	<b>Cellules centrales inhibitrices</b>	Tonic	Grudt et Perl 2002 Yasaka et al. 2010	-55.2±3.7	Grudt et Perl 2002	II (IIIm)
	<b>Neurones PKCγ</b>	Divers	/	/	/	Ili/III
	<b>Neurones CR</b>	Tonic	Abraira et al. 2017	/	/	I/II
	<b>Neurones PV</b>	Tonic	Abraira et al. 2017	/	/	II (Ili)
	<b>Neurones VGLUT3</b>	Tonic Phasic	Cheng 2017	/	/	Ili/III

**Tableau 1** : Principales caractéristiques des types cellulaires de la lamina II

Le profil de décharge *tonic* est le profil principalement retrouvé chez les **cellules en ilot**, les **cellules centrales inhibitrices**, les **cellules verticales**, les neurones exprimant la **calrétinine (CR)** et ceux exprimant la **parvalbumine (PV)**. Les **cellules centrales excitatrices** présentent un profil de décharge de type *phasic* ainsi, que les neurones exprimant transitoirement **VGLUT3** qui peuvent également présenter un profil de type *tonic*. Les **cellules radiales** possèdent majoritairement un profil de type *delayed* tout comme les **cellules verticales**. Les **neurones exprimant la PKCγ** ne semblent pas présenter de profil de décharge spécifique. Ceci peut s'expliquer par le fait que la PKCγ est probablement exprimée dans plusieurs populations à travers la lamina II. Les potentiels de membrane des neurones morphologiquement identifiés de la lamina II sont aux alentours de -58 mV, sauf pour les cellules en ilot qui présentent un potentiel de membrane supérieur de 10 mV (-47,4 mV).



**Figure 5 : Neurones excitateurs et inhibiteurs de la corne dorsale de la moelle épinière (I-VI)**

Des **neurones de projection** sont retrouvés dans les LV, IV et I. Les neurones de projection de la LI sont contactés localement par des **interneurones excitateurs** et **inhibiteurs**. Ces neurones de projection sont contactés par des interneurons présents dans les laminae plus profondes ainsi que par les **cellules verticales** de la lamina II. Les cellules verticales sont inhibées ou excitées par les **cellules centrales** qui sont elles mme inhibées par les **cellules en îlot**. D'après *Zheng, Lu et al., 2010*, la connexion entre les cellules en îlot et les cellules centrales inhibitrices serait réciproque (représentée en pointillés). Les **cellules radiales** sont présentes dans la lamina II. Les neurones exprimant la **PKC $\gamma$**  sont présents dans les laminae Iii et III alors que les neurones exprimant la **calrétinine (CR)** sont présents dans la corne dorsale profonde et la lamina II. Les neurones exprimant la **parvalbumine (PV)** sont retrouvés dans la lamina Iii ainsi que dans la lamina III. Les neurones exprimant transitoirement le **VGLUT3 (VGLUT3)** peuplent principalement la lamina III et sont retrouvés en faibles effectifs dans la lamina II. Adapté de Peirs & Seal 2016.

*Remarque : En 2002, Prescott & De Koninck (2002), ont pu établir une corrélation entre les différentes morphologies et les profils de décharge pour une échantillon de neurones de la lamina I. Ils ont identifié des neurones au profil de décharge tonic (décharge continue), phasic (adpating ou IB, qui décharge en bursts de durée variable), delayed (délai avant de décharger) et single spike (un seul potentiel d'action). Les neurones fusiformes sont en général tonic, les neurones pyramidaux phasic et les neurones multipolaires sont soit delayed ou single spike (Prescott & De Koninck, 2002).*

#### **d. Profil de décharge de potentiel d'action et fonction**

A ma connaissance, il n'y a pas d'étude relatant une corrélation entre les profils de décharges et la fonction des neurones de la lamina II. En revanche, dans la lamina I, les neurones *tonic* et *delayed* agissent principalement en tant qu'intégrateurs alors que les neurones *phasic* et *single spike* agissent plutôt comme des détecteurs de coïncidence (Prescott & De Koninck, 2002). Les neurones Multipolaires de la lamina I seraient quant à eux polymodaux et répondraient au pincement, au froid ainsi qu'au chaud (Han, Zhang, & Craig, 1998). Comme c'est le cas dans la lamina I (remarque ci-dessus) on peut imaginer que les profils de décharge soient également associés à différentes fonctions pour les interneurons de la lamina II.

## 5. La connectivité des neurones de la lamina II

### **a. Projections des afférences primaires dans la lamina II**

Suivant la modalité du stimulus qui les activent et les organes qu'elles innervent, les fibres afférentes contactent préférentiellement certaines laminae de la CDME. Les afférences acheminant les informations sensorielles des viscères contactent les laminae I-V (deGroat, Nadelhaft, Morgan, & Schauble, 1979; Kuo & de Groat, 1985), tandis que les informations cutanées contactent les laminae II-IV et dans une moindre mesure la lamina I (Grant & Ygge, 1981; Molander & Grant, 1986). Les neurones de la **lamina I** reçoivent des entrées synaptiques directes des fibres A $\delta$  et C (Dahlhaus, Ruscheweyh, & Sandkuhler, 2005; Ikeda, Heinke, Ruscheweyh, & Sandkuhler, 2003). **Les laminae plus profondes** (III et IV) sont quant à elles innervées par les fibres myélinisées A $\beta$  et A $\delta$  mais reçoivent également des entrées des fibres C (de Groat et al., 1981; Morgan, Nadelhaft, & de Groat, 1981; Petitjean, Rodeau, & Schlichter, 2012; Schneider, 2008) [Figure 1 et 2].

Les paragraphes ci-dessous seront centrés sur la connectivité de la lamina II.

**La lamina II** est abondamment innervée par les fibres C peptidergiques et non-peptidergiques. Les fibres C peptidergiques contactent principalement les neurones de la lamina IIe tandis que les fibres C non-peptidergiques contactent en majorité les neurones de la partie plus interne de la lamina Iii, juste à la limite de la lamina III [Figure 1].

Dans la lamina II, les cellules centrales (excitatrices et inhibitrices) et les cellules en ilot sont contactées directement par les fibres afférentes de type C (Lu & Perl, 2005; Yasaka et al., 2007). Par ailleurs, la stimulation de la racine dorsale génère dans la quasi-totalité des cellules en ilot des courants postsynaptiques excitateurs (**CPSE**) monosynaptiques provenant des fibres nociceptives C. L'amplitude maximale enregistrée des CPSE était plus grande ( $427 \pm 122$  pA) que celle des CPSE enregistrés dans les autres neurones de la lamina II ( $127 \pm 11$  pA) ce qui suggère une plus forte convergence de ces fibres sur les cellules en ilot que sur les autres neurones de la lamina II. Ceci pourrait s'expliquer par la large arborisation dendritique orientée dans l'axe rostro-caudal caractéristique des cellules en ilot (Grudt & Perl, 2002) (cf Partie I, § C.2.b. *Les cellules en ilot*).

Une partie des cellules centrales inhibitrices reçoit des entrées synaptiques provenant des fibres afférentes A $\delta$  contrairement aux autres cellules centrales et les cellules en ilot (Grudt & Perl, 2002). Les cellules radiales et les cellules verticales reçoivent quant à elles des entrées à partir des fibres afférentes de type C et A $\delta$ . Les cellules verticales avec leur longs prolongements dendritiques atteignant parfois les laminae III-IV peuvent être contactées par les fibres A $\beta$  (Maxwell et al., 2007; Yasaka et al., 2007).

Uta et al. 2010 ont montré en 2010 que les fibres de type C exprimant les récepteurs **TRPA1** (*Transient Receptor Potential Ankyrin 1*) et TRPV1 contactent les cellules verticales et radiales mais pas les cellules centrales ni les cellules en ilot (Uta et al., 2010).

Les fibres A $\beta$  contactent les cellules verticales, les neurones PKC $\gamma$  et des interneurons inhibiteurs. Bien que contactant principalement les laminae plus profondes et participant à la transmission des informations non nociceptives, les fibres A $\beta$  contactent des interneurons inhibiteurs de la lamina III (Schneider & Lopez, 2002) qui seraient principalement glycinergiques (Todd, Maxwell, & Brown, 1991). Ainsi, les fibres A $\beta$  pourraient également jouer un rôle dans la transmission d'informations nociceptives (cf Partie II, § B. 1.). Les fibres

afférentes A $\delta$  à bas seuil contactent de neurones excitateurs exprimant la PKC $\gamma$  qui sont activés par des stimuli non nociceptifs (L. Li et al., 2011; Neumann, Braz, Skinner, Llewellyn-Smith, & Basbaum, 2008).

Les interneurons excitateurs exprimant la PKC $\gamma$  sont également sous un contrôle des interneurons inhibiteurs exprimant la PV localisés dans la lamina III chez la souris (Petitjean et al., 2015). Les interneurons PKC $\gamma$  (Peirs et al., 2014) et les interneurons inhibiteurs PV sont contactés par les fibres afférentes myélinisées et en particulier par les fibres A $\beta$  (E. Foster et al., 2015; Lu et al., 2013; Petitjean et al., 2015). Les neurones CR reçoivent quant à eux des entrées A $\beta$ , A $\delta$ , et C (Peirs et al., 2020).

*Remarque :* Les afférences primaires peuvent également être contactées par les interneurons de la CDME. Des boutons synaptiques contenant du GABA et/ou de la glycine peuvent contacter les fibres afférentes A $\beta$  et A $\delta$  (Todd et al., 1991) et des boutons contenant que du GABA peuvent contacter les fibres afférentes de types C (Todd, 1996).

## **b. Connexion intra et inter laminaires des interneurons de la lamina II**

Les neurones de la lamina II forment un réseau densément interconnecté. En effet, 76% des neurones excitateurs de la lamina II contactent des neurones situés eux aussi dans la lamina II, alors que c'est le cas pour seulement 14% et 25% des neurones excitateurs de la lamina I et III respectivement (Santos et al., 2009). Ces connexions sont néanmoins généralement unidirectionnelles et non réciproques (Lu & Perl, 2003).

Les **cellules en ilot** contactent les **cellules centrales** excitatrices et inhibitrices. La connexion entre les cellules en ilot et les cellules centrales excitatrices serait unidirectionnelle (Lu & Perl, 2003) cependant, la connexion entre les cellules en ilot et les cellules centrales inhibitrices serait réciproque (J. Zheng, Lu, & Perl, 2010). Les cellules centrales excitatrices et inhibitrices contactent quant à elles directement les **cellules verticales** (Lu & Perl, 2005) qui contactent à leur tour les **neurones de projection** de la lamina I [Figures 5 et 6] dont des neurones de projection exprimant les récepteurs neurokinine 1 (**rNK1**) (Lu & Perl, 2005).

A ma connaissance, la connectivité des cellules radiales n'a, à l'heure actuelle, pas encore été identifiée.

Les neurones PKC $\gamma$  situés dans les laminae II/III contacteraient les cellules centrales excitatrices, qui contacteraient à leur tour les cellules verticales (Lu et al., 2013). A la limite de la lamina Iii-III, les neurones excitateurs exprimant la PKC $\gamma$  et la somatostatine (PKC $\gamma$ /SOM) sont contactés par les neurones inhibiteurs PV/glycine. Plusieurs études suggèrent d'ailleurs que la levée de cette inhibition des neurones PKC $\gamma$ /SOM participerait à la transmission d'informations des fibres afférentes A $\beta$  vers les couches superficielles (Artola et al., 2020; Miraucourt et al., 2007a; Peirs et al., 2015; Petitjean et al., 2015), ce qui constituerait une voie d'entrée d'informations non nociceptives dans un réseau traitant essentiellement des informations provenant de fibres afférentes nociceptives.

Plusieurs études ont montré que des interneurons de la lamina II contacteraient des interneurons des laminae plus profondes (III-V) (chez le chat (Light & Kavookjian, 1988), chez la souris (J. M. Braz & Basbaum, 2009; Petitjean et al., 2014; Petitjean et al., 2012; Seibt & Schlichter, 2015)).

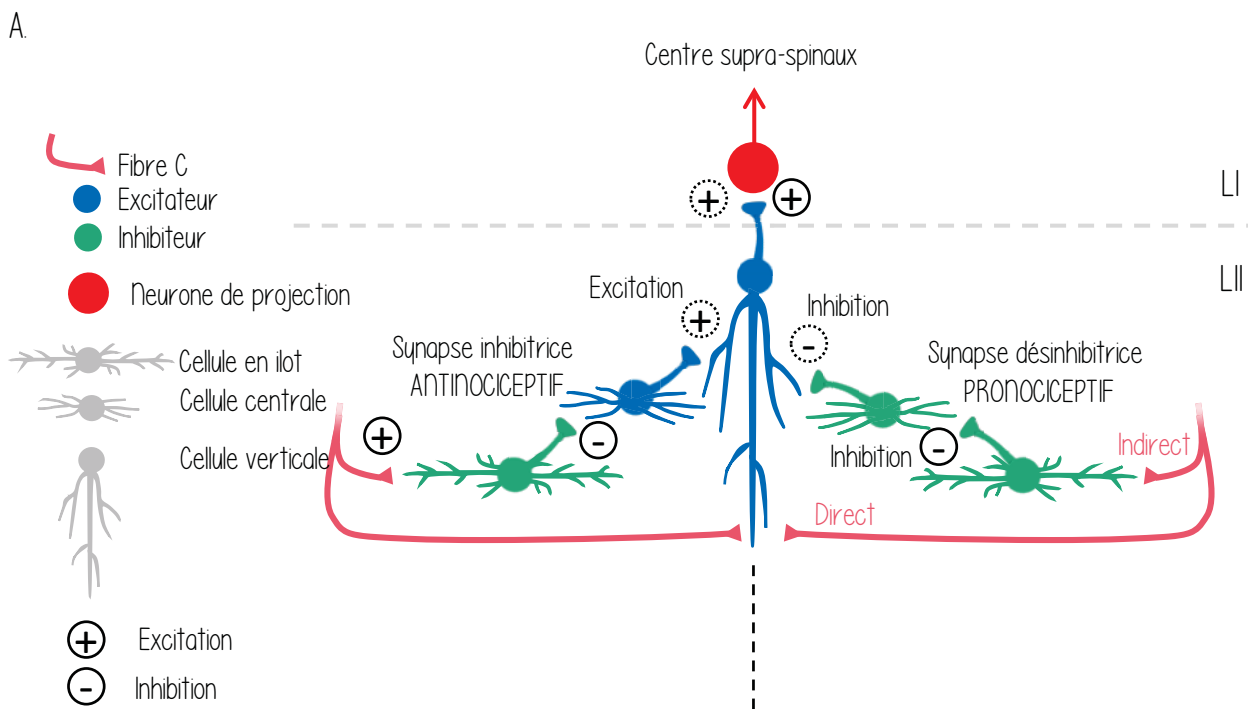
En effet, le blocage des transmissions inhibitrices (GABAergique et glycinergique) révèle l'existence d'entrées des fibres afférentes A $\beta$  sur les neurones de projection de la lamina I exprimant les rNK1. Pour en savoir plus sur les connexions au sein de la CDME, se référer à (Cordero-Erausquin, Inquimbert, Schlichter, & Hugel, 2016).

**En conclusion** : Des fibres afférentes de type C contactent virtuellement tous les neurones de la lamina II, mais certains types cellulaires sont préférentiellement contactés par certains types de fibres, et le degré de convergence des fibres vers un même neurone semble différent selon le type cellulaire. Ceci suggère un traitement complexe des différentes modalités et sous-modalités sensorielles dans les réseaux de la lamina II de la CDME.

Une fois arrivées dans la lamina II, les fibres C, véhiculant les informations nociceptives, contactent les cellules en **ilot inhibitrices**, qui contactent les **cellules centrales** (excitatrices et inhibitrices) contactant les **cellules verticales** qui elles même contactent les **neurones de projection**. Les fibres afférentes contactent les cellules verticales directement, ce qui constitue une **voie directe**. Mais il existe également deux voies **indirectes** : les fibres contactent en parallèle les cellules en ilot qui **inhibent** les cellules centrales. Lorsqu'il s'agit de cellules centrales **excitatrices**, la synapse cellule en ilot – cellule centrale excitatrice joue un rôle **antinociceptif** limitant l'excitation des cellules verticales et diminuant l'excitation des neurones de projection de lamina I (dans le cas où les cellules verticales sont excitatrices). Lorsque les cellules en ilot **inhibent** les cellules centrales **inhibitrices**, la synapse cellule en ilot – cellule centrale inhibitrice joue un rôle de désinhibition qui aurait un **rôle pronociceptif**, diminuant l'inhibition des cellules verticales par les cellules centrales inhibitrices et augmentant l'excitation des neurones de projections (dans le cas où les cellules verticales sont excitatrices) **[Figure 6]**.

#### D. Les structures supra-spinales

Après l'intégration et la modulation des informations sensorielles dans la CDME, ces informations sont transmises aux centres supra-spinaux pour éventuellement donner lieu à leur interprétation consciente. Ce sont les axones des neurones de projection qui forment des faisceaux ascendants. Dans les paragraphes suivants, seuls les principaux faisceaux ascendants sont décrits. Pour en savoir plus, voir Millan (1999).



**Figure 6 : Voies directes et indirectes de cheminement des informations nociceptives dans la lamina II**

Les fibres C contactent directement les cellules verticales qui contactent les neurones de projection ce qui constitue une voie directe de transmission des informations nociceptives à travers la LII. En parallèle, les fibres C contactent les cellules en ilot qui inhibent les cellules centrale excitatrices ou inhibitrices, qui elles contactent les cellules verticales. Lorsque la voie indirecte comprend l'inhibition des cellules centrales excitatrices par les cellules en ilot, alors l'excitation de la cellule verticale est limitée ainsi que l'excitation du neurone de projection. La connexion cellule en ilot – cellule centrale excitatrice pourrait avoir un rôle antinociceptif (à gauche). En revanche, lorsque la voie indirecte comprend une cellule centrale inhibitrice, alors via la désinhibition de la cellule centrale inhibitrice, l'inhibition de la cellule verticale est diminuée et l'excitation du neurone de projection est augmentée. La connexion cellule en ilot – cellule centrale inhibitrice pourrait avoir un rôle pronociceptif (à droite). Il faut noter que ces connexions ne représentent qu'une partie des connexions connues de la lamina II.



## 1. Transmission des informations non-nociceptives

### a. La voie des cordons dorsaux

Les cordons dorsaux sont formés par les axones des fibres afférentes A $\beta$ . Ces axones envoient également une collatérale dans la CDME. La voie des cordons dorsaux véhicule les informations cutanées tactiles et les informations proprioceptives conscientes en provenance des muscles et des articulations. Les informations en provenance des membres supérieurs transitent via le faisceau Cunéiforme et celles en provenance des membres inférieurs via le faisceau Gracile. Les axones des neurones de projection décussent du côté controlatéral au niveau des noyaux des cordons dorsaux Cunéen et Gracile du tronc cérébral et contactent le thalamus et le cortex sensoriel [Figure 7, A].

*Remarque : La stimulation des colonnes dorsales, tout comme celle des cellules en îlot de la lamina II, représente un des mécanismes impliqués dans des stratégies analgésiques non médicamenteuses tels que la stimulation médullaire. Ce point est évoqué dans la revue préparée dans le cadre de ma thèse (Voir Revue 2 en Annexe).*

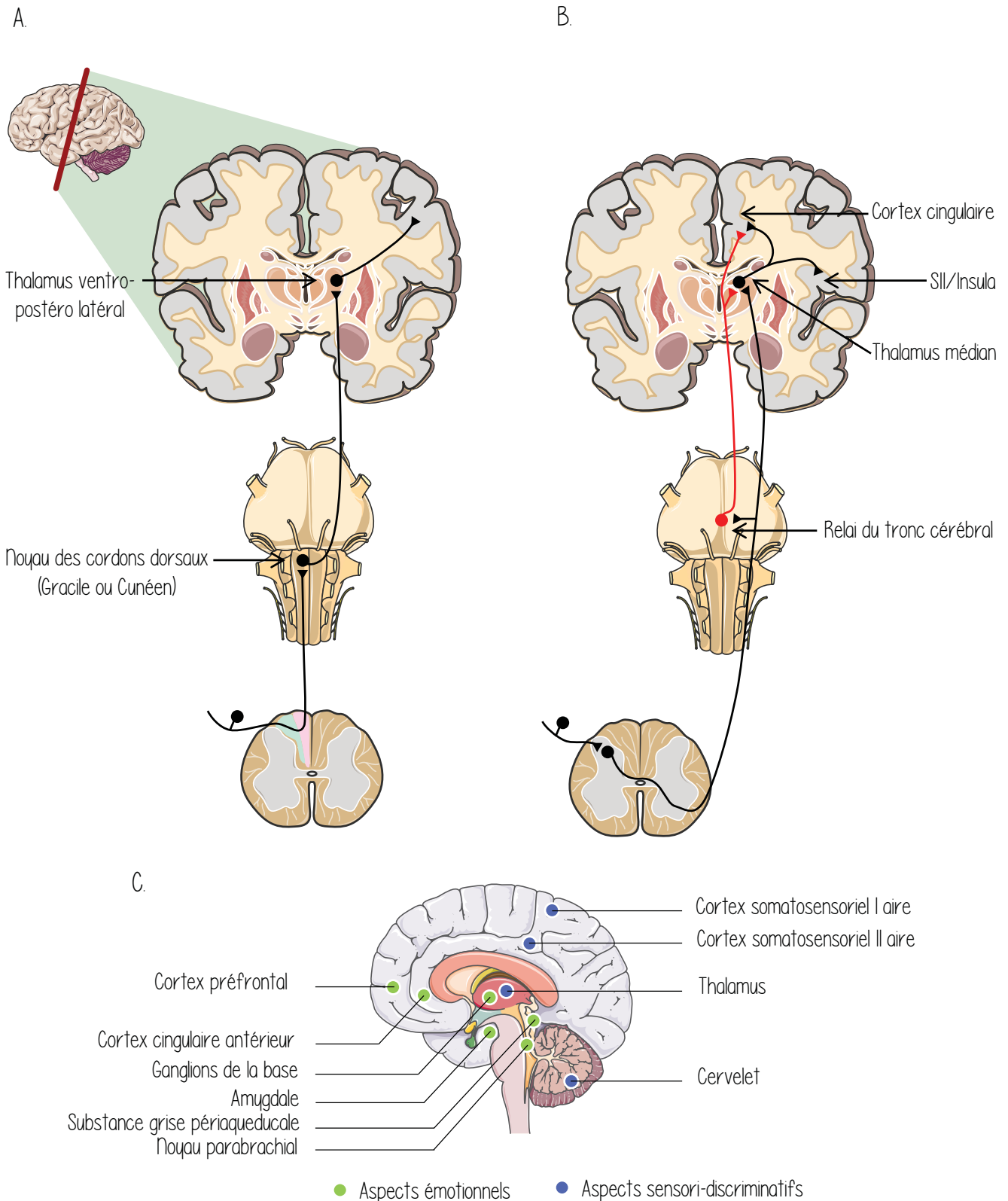
### b. Les faisceaux spino-cérébelleux

Ces faisceaux transmettent des informations proprioceptives inconscientes provenant des muscles et des articulations vers le cervelet afin d'assurer le contrôle de la posture.

## 2. Transmission des informations nociceptives

### a. Le faisceau spinothalamique

Le faisceau spinothalamique constitue la plus importante voie ascendante des informations nociceptives qui pourront donner lieu à la perception douloureuse. Ce faisceau est formé par les axones des neurones de projection situés dans les laminae I, IV, V, VI et VII. Les axones des neurones de projection des laminae I, IV et V décussent au niveau spinal et projettent directement au thalamus. Ces projections sont importantes dans les aspects sensoridiscriminatifs de la douleur, c'est-à-dire qu'elles portent les informations permettant de définir la localisation et l'intensité de la douleur (Basbaum, Bautista, Scherrer, & Julius, 2009; Chung et al., 1986; Guirimand & Le Bars, 1996; Willis & Westlund, 1997) [Figure 7, B].



**Figure 7 : Représentation schématique des voies de traitement des informations douloureuses**

**A. Voie des colonnes dorsales** impliquée dans le traitement des informations non-nociceptives comme le toucher, les vibrations et la proprioception. **B. Voie spino-thalamique** impliquée dans le traitement des informations nociceptives. **En noir**, voie classique avec le relais dans la corne dorsale de la moelle épinière et dans le thalamus médian avant de contacter les cortex insulaire et sensoriel et cingulaire. **En rouge**, les informations provenant du tronc cérébral. C. Les neurones de projection envoient des informations au tronc cérébral et au thalamus, mais également dans d'autres aires supra-spinales impliquées dans le traitement des aspects **sensori-discriminatifs** et dans les aspects **émotionnels**.

*Remarque :* Le faisceau spinothalamique transmet également des informations non nociceptives provenant des neurones de projection des laminae plus profondes (IV-VI et VII, VIII).

#### **b. Le faisceau spino-réticulo-thalamique**

Ce faisceau est constitué par les axones des neurones de projection des laminae I et V qui projettent dans les noyaux du tronc cérébral sans décussier. Tout comme le faisceau spinothalamique, le faisceau spino-reticulo-thalamique transmet des informations nociceptives mais avec beaucoup moins de détails sur la localisation du stimulus nociceptif (Basbaum et al., 2009).

#### **c. Le faisceau spino-mésencéphalique**

Ce faisceau est constitué uniquement des axones de neurones de projection de la lamina I qui contactent la substance grise périaqueducale et l'aire parabrachiale qui à leur tour projettent vers l'amygdale et le thalamus (Basbaum et al., 2009). Ce faisceau est associé au caractère aversif de la douleur et est impliqué dans le recrutement de contrôles descendants inhibiteurs (Rees & Roberts, 1993).

Les différents aspects du message douloureux sont traités dans différentes structures supra-spinales. Ainsi, les aspects sensoridiscriminatifs sont traités dans le cortex somatosensoriel primaire et secondaire, le noyau ventro-postérieur-latéral du thalamus (Purves D, 2001) et le cervelet (Peirs & Seal, 2016). Les aspects émotionnels sont intégrés au niveau des noyaux thalamiques de la ligne médiane (Purves D, 2001), du cortex préfrontal, du cortex cingulaire antérieur, de l'insula, des ganglions de la base, de l'amygdale, de la substance grise périaqueducale et du noyau parabrachial (Peirs & Seal, 2016) **[Figure 7, C]**.

## E. Les contrôles descendants

Les centres supra-spinaux modulent les informations sensorielles ascendantes en provenance de la moelle épinière. Ils peuvent également moduler l'activité des réseaux de neurones au sein même de la moelle épinière. En effet, des projections descendantes inhibitrices ou excitatrices, directes ou indirectes peuvent moduler la transmission nociceptive dans la CDME. Ils empruntent les faisceaux dorso-latéraux et ventro-latéraux pour contacter les neurones et les cellules gliales (Tsuda, Koga, Chen, & Zhuo, 2017) de la CDME (Millan, 2002).

Différentes structures supra-spinales participent aux contrôles descendants, comme le cortex préfrontal, l'hypothalamus, l'amygdale mais également le locus coeruleus, les noyaux parabrachiaux, le noyau raphé magnus, et surtout la PAG (Bushnell, Ceko, & Low, 2013; Fields, 2004; Millan, 2002; Villanueva, Bernard, & Le Bars, 1995) qui présente des connexions bidirectionnelles avec le cortex préfrontal et l'amygdale. De plus, la PAG contrôle l'activité des neurones de la partie rostroventromédiane du bulbe rachidien (**RVM**) qui projette des contrôles descendants vers la CDME.

Les corps cellulaires des neurones inhibant ou potentialisant le message nociceptif se trouvent dans des structures similaires mais leurs axones empruntent des voies distinctes. Ces contrôles descendants inhibiteurs sont impliqués dans les effets analgésiques alors que les contrôles descendant facilitateurs jouent un rôle dans l'établissement de l'hyperalgésie secondaire (Gebhart, 2004).

### a. Contrôles descendants inhibiteurs

Les neurones de projection de la partie RVM peuvent être GABAergiques, glycinergiques ou sérotoninergiques. Ils contactent les neurones de la CDME en passant par les faisceaux dorso-latéraux et inhibent ainsi la transmission du message nociceptif (Kato et al., 2006; D. X. Zhang, Owens, & Willis, 1991).

En plus de la RVM, les noyaux du raphé magnus présentent eux aussi des neurones de projection sérotoninergiques qui inhibent les neurones de la CDME.

Des neurones noradrénergiques dont le corps cellulaire est localisé dans le locus coeruleus inhibent également les neurones situés dans les laminae I, II, V et X.

### **b. Contrôles descendants facilitateurs**

La PAG est une région supra-spinale qui participe à la potentialisation du message nociceptif spinal via des neuropeptides comme la SP ou la cholécystokinine.

Des neurones de la RVM participeraient également à la facilitation du message nociceptif. En effet, une population de neurones qui s'activent avant le réflexe de retrait lors de l'application d'un stimulus nociceptif (les neurones « ON »), seraient impliqués dans des contrôles descendants facilitant la transmission du message nociceptif (Villanueva et Bourgeois, 201).

## **CONCLUSION DE LA PARTIE I**

**La lamina II est la une région de la CDME d'intérêt dans le traitement des informations nociceptives puisqu'elle est contactées par les fibres afférentes C et A $\delta$ . Ces informations sont modulées par des réseaux d'interneurones inhibiteurs et excitateurs dont certains sont identifiés, comme par exemple le réseau impliquant les cellules en ilot, qui inhibent les cellules centrales qui elles, excitent ou inhibent les cellules verticales. Les cellules verticales représentent le neurone de sortie de la lamina II puisqu'elles contactent les neurones de projection de la lamina I chargés de transmettre les informations aux centres supra-spinaux qui en retour, peuvent également moduler les informations nociceptives à l'étage spinal via des contrôles facilitateurs ou inhibiteurs.**

# PARTIE II : LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE INHIBITRICE

## A. La transmission synaptique inhibitrice : généralités

Le GABA et la glycine sont les deux principaux neurotransmetteurs inhibiteurs impliqués dans les transmissions synaptiques rapides chez les vertébrés. Le GABA active les récepteurs ionotropiques **GABA<sub>A</sub>** et les récepteurs métabotropiques **GABA<sub>B</sub>**. La glycine active des récepteurs ionotropiques de la glycine.

Mon projet de recherche porte sur la transmission inhibitrice GABAergique, la transmission glycinergique ne sera donc pas détaillée dans ce manuscrit.

🔍 Pour en savoir plus sur la transmission glycinergique, voir Zeilhofer (2005).

### I. Le GABA : Origine, synthèse, stockage, recapture et dégradation

#### a. Découverte

Chez les vertébrés, le GABA est le plus important des neurotransmetteurs inhibiteurs (Sivilotti & Nistri, 1991). Le GABA a été découvert dans les tissus biologiques durant les années 1910, mais ce n'est que quelques décennies plus tard que cette molécule a été détectée dans le cerveau de mammifères, mais sans que son impact soit alors connu (E. Roberts & Frankel, 1950). Indépendamment de ces travaux, Ernst Florey a découvert dans des extraits de cerveau et de moelle épinière le « facteur I », un composé non identifié qui inhibait les neurones d'écrevisses (Basemore, Elliot, & Florey, 1957) la même équipe montra trois ans plus tard que le « facteur I » était le GABA (Basemore et al., 1957). L'action inhibitrice du GABA sur les neurones du cortex a été décrite pour la première fois chez le chat en 1967, ainsi que le blocage de cet effet en présence de bicuculline, un antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub> (Krnjevic & Schwartz, 1967). Dans les années 70' et 80' de nombreux travaux sur ce neurotransmetteur et ses récepteurs sont publiés. En 1978 Barber et al. publient la première étude décrivant la distribution de l'enzyme de synthèse du GABA (voir plus bas) dans la moelle épinière de mammifères (Barber, Vaughn, Saito, McLaughlin, & Roberts, 1978).

## b. Synthèse, stockage, recapture et dégradation

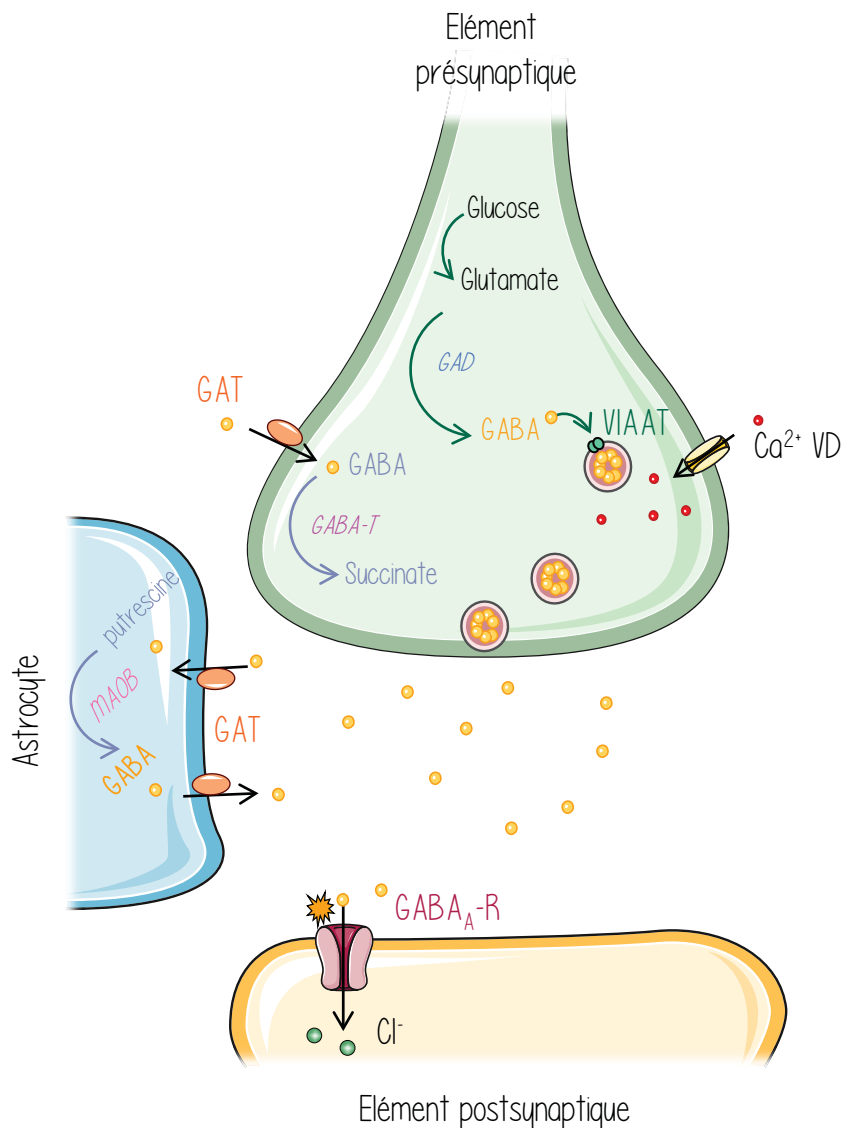
Le GABA est synthétisé dans les neurones GABAergiques à partir de la décarboxylation l'acide glutamique (le glutamate) grâce à une enzyme, la Glutamic Acid Decarboxylase (**GAD**) [Figure 8]. Il existe deux isoformes de cette enzyme : la **GAD65** et la **GAD67** qui sont respectivement codées par les gènes *gad2* et *gad1*. Ces deux isoformes diffèrent par leur localisation : la GAD65 est préférentiellement présente dans les terminaisons axonales tandis que la GAD67 est plutôt somato-dendritique. Les neurones GABAergiques présentent dans leur membrane plasmique les transporteurs du glutamate Excitatory amino-acid transporter 3 (**EAAT3**). Ces transporteurs assurent la recapture du glutamate présent dans l'espace extracellulaire servant à la synthèse du GABA (Rowley, Madsen, Schousboe, & Steve White, 2012). La GAD65 est liée aux transporteurs vésiculaires d'acides aminés inhibiteurs (**VIAAT**) présents dans la membrane des vésicules synaptiques (Wu et al., 2007). Cette association permet une synthèse, un chargement vésiculaire et une libération rapides de GABA (Jin et al., 2003) à partir du glutamate extracellulaire recapturé.

Les astrocytes sont également capables de synthétiser du GABA à partir du glutamate recapturé. Dans ce cas, le GABA est synthétisé à partir de la glutamine synthétase qui est propre aux cellules gliales, et à ce titre, utilisée comme marqueur de ce type cellulaire. Plusieurs voies de synthèse de GABA existeraient dans les astrocytes avec entre autres une voie impliquant une enzyme mitochondriale, la monoamine oxydase B (**MAOB**) (Yoon et al., 2014) [Figure 8].

*Remarque : Dans les astrocytes du nerf optique, la GAD67 est présente durant le développement puis son expression diminue après P21. La GAD65 quant à elle, n'est pas exprimée dans les astrocytes (Ochi et al., 1993). Chez le rat adulte, une immunoréactivité au GABA et à la GAD est retrouvée dans les cellules gliales du cervelet (Martinez-Rodriguez et al., 1993). De plus, la GAD a été observée dans des cultures d'astrocytes chez l'humain (Lee et al., 2011).*

Une fois synthétisé, le GABA est chargé dans les vésicules synaptiques par les VIAAT (Sagne et al., 1997). Un critère d'identification des neurones GABAergiques est la présence de la GAD65 ou GAD67 ; l'identification peut être complétée par la détection du transporteur vésiculaire du GABA (Tamamaki et al., 2003).

Le GABA est libéré dans la fente synaptique lors de la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane présynaptique. Chaque vésicule peut contenir plusieurs milliers de molécules de GABA (Mody, De Koninck, Otis, & Soltesz, 1994). Après sa libération dans la fente



**Figure 8 : Voie de synthèse et libération du GABA**

Le glutamate est formé à partir du glucose puis est converti en **GABA** via l'action de la glutamate décarboxylase (**GAD**). Le **GABA** est ensuite chargé dans les vésicules synaptiques par le transporteur vésiculaire d'acides aminés inhibiteurs (**VIAAT**) et est libéré dans la fente synaptique après fusion des vésicules. Le **GABA** se fixe sur le récepteur **GABA<sub>A</sub>** permettant l'ouverture de celui-ci et une entrée de **Cl<sup>-</sup>** dans le neurone postsynaptique. Après sa libération dans la fente synaptique, le **GABA** est recapturé par les transporteurs, les **GAT** (pour *glutamic acid transporter*) présents à la surface des neurones mais également à celle des cellules gliales.

Une fois recapturé par les neurones, le **GABA** est soit recyclé, soit dégradé en succinate via la GABA transaminase ( **GABA-T**). Dans les astrocytes, la monoamine oxydase B (**MAOB**) transforme une polyamine, la putrescine, en GABA.



synaptique, le GABA est recapturé par les transporteurs, les **GAT** (pour *GABA transporter*) présents à la surface des neurones et des cellules gliales. Une fois recapturé par les neurones, le GABA est soit recyclé, soit dégradé en succinate par la GABA transaminase mitochondriale (**GABA-T**) [Figure 8].

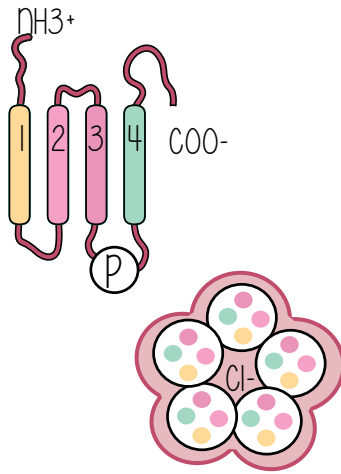
## 2. Les récepteurs du GABA

Le GABA a été découvert en tant qu'agoniste induisant deux effets distincts : l'activation de canaux perméables aux ions  $\text{Cl}^-$  (effet inhibé par la bicuculline), et l'activation de canaux cationiques perméables aux ions  $\text{K}^+$  (effet insensible à la bicuculline). Le premier effet implique des récepteurs  $\text{GABA}_A$  qui sont des récepteurs canaux, le second effet implique des récepteurs  $\text{GABA}_B$  qui sont des récepteurs métabotropiques (Bormann, 1988; N. Bowery, 1989). Les récepteurs  $\text{GABA}_A$  sont impliqués dans la transmission synaptique GABAergique rapide. Ces récepteurs-canaux sont perméables aux ions bicarbonate ainsi qu'aux ions  $\text{Cl}^-$ , leur ouverture entraînant dans la plupart des cas une hyperpolarisation. Les récepteurs  $\text{GABA}_B$  sont des récepteurs couplés aux protéines G. La fixation du GABA sur les récepteurs  $\text{GABA}_B$  entraîne l'activation de canaux sensibles au potentiel permettant l'efflux de  $\text{K}^+$  donnant également lieu à une hyperpolarisation. Les récepteurs  $\text{GABA}_B$  et leur rôle dans la corne dorsale seront développés dans la partie III de l'introduction (cf Partie III, § B. 1.).

### a. Composition des récepteurs $\text{GABA}_A$

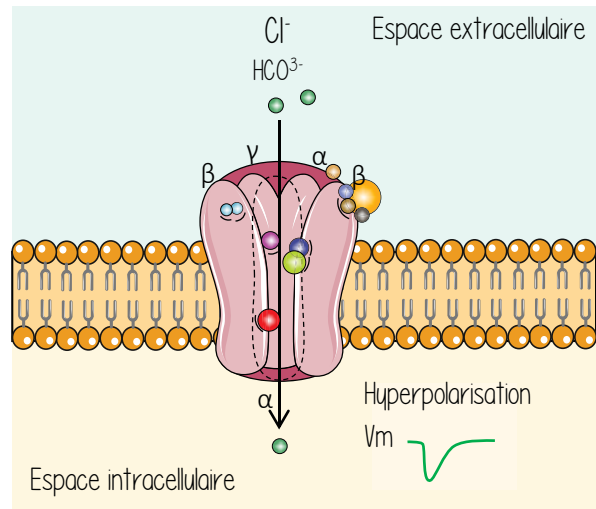
Le récepteur  $\text{GABA}_A$  est un récepteur hétéropentamérique transmembranaire composé de cinq sous-unités qui s'organisent autour d'un pore perméable aux anions [Figure 9, A et B]. Il existe plusieurs types de sous-unités : les sous-unités  $\alpha$  (de 1 à 6),  $\beta$  (de 1 à 3),  $\gamma$  (de 1 à 2),  $\delta$ ,  $\pi$ ,  $\theta$  et  $\rho$ . Chaque sous-unité est constituée de 4 domaines transmembranaires [Figure 9, A et B]. L'ouverture des récepteurs  $\text{GABA}_A$  s'effectue lors de la fixation de deux molécules de GABA à l'interface  $\alpha/\beta$  (Ernst, Brauchart, Borech, & Sieghart, 2003). Le grand nombre de sous-unités offre la possibilité d'une grande diversité de types de récepteurs  $\text{GABA}_A$  dont la composition détermine les propriétés pharmacologiques et fonctionnelles (voir plus bas).

A.



B.

- Benzodiazépine ●
- Ethanol ●
- Barbiturique ●
- Stéroïdes ●
- Picrotoxine ●
- GABA ●
- Bicuculline ●
- Gabazine ●
- Muscimol ●
- Zinc ●
- Cl<sup>-</sup> ●



### Figure 9 : La transmission synaptique inhibitrice GABAergique

**A. Structure du récepteur GABA<sub>A</sub>** : Le récepteur GABA<sub>A</sub> est un récepteur hétéropentamérique transmembranaire composé de 5 sous-unités de 4 domaines transmembranaires. **B. Composition, perméabilité et sites de modulation du récepteur GABA<sub>A</sub>** : Le récepteur GABA<sub>A</sub> est perméable aux ions chlorures (Cl<sup>-</sup>) et bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). L'ouverture des récepteurs GABA<sub>A</sub> s'effectue par la fixation de deux molécules de GABA à l'interface α/β qui reconnaît également des agonistes spécifiques des récepteurs GABA<sub>A</sub> comme le **muscimol** ainsi que des antagonistes compétitifs comme la **bicuculline** et la **gabazine**. Les récepteurs GABA<sub>A</sub> possèdent également plusieurs sites de modulation allostérique comme les **benzodiazépines**, les **barbituriques**, **l'éthanol**, les **stéroïdes** et le **zinc**. La **picrotoxine** bloque les canaux GABA<sub>A</sub> en se fixant dans le pore du canal.

*Remarque : Certains types de récepteurs GABA<sub>A</sub> sont constitués de la sous-unité  $\rho$  et sont peu sensibles à la bicuculline et non-sensibles aux benzodiazépines et barbituriques. Ces récepteurs ont pendant longtemps été classés dans un groupe distinct désigné sous le terme « GABA<sub>C</sub> » (Barnard et al., 1998). La sous-unité  $\rho$  caractéristique de ces récepteurs GABA<sub>A</sub> particuliers est exprimée dans la moelle épinière (Zheng et al., 2003).*

Dans le cerveau, la majorité des récepteurs GABA<sub>A</sub> sont constitués des sous-unités  $\alpha 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 2$ . Dans la CDME, la composition de ces récepteurs varie selon les laminae. Ainsi, pour la corne dorsale superficielle, les laminae I-II sont dépourvues de récepteurs dotés des sous-unités  $\alpha 1$  et  $\alpha 5$ . L'immunoréactivité des sous-unités  $\alpha 2$ ,  $\beta 2,3$  et  $\gamma 2$  est uniformément intense dans la lamina II avec une expression de la sous-unité  $\alpha 3$  dans la lamina IIe. Dans lamina III, il y a une importante hétérogénéité entre la partie externe et interne. En effet, dans la lamina IIIe,  $\alpha 1$  est présente dans une population distincte de neurones alors que dans la lamina IIIi, l'immunoréactivité est plus importante pour la sous-unité  $\alpha 5$  (Bohlhalter, Weinmann, Mohler, & Fritschy, 1996). Les récepteurs constitués de la sous-unité  $\rho$  sont abondants dans les laminae I et II (Zheng et al., 2003).

*Remarque : Dans la moelle épinière, certaines sous-unités sont exprimées transitoirement durant le développement, comme par exemple la sous-unité  $\delta$  (Ma, Saunders, Somogyi, Poulter, & Barker, 1993).*

🔍 Pour en savoir plus les sous-types de récepteurs GABA<sub>A</sub> dans la moelle épinière, voir (Bohlhalter et al., 1996).

### **b. Agonistes, antagonistes et modulations**

Le site de fixation du GABA à l'interface  $\alpha/\beta$  lie également des agonistes spécifiques des récepteurs GABA<sub>A</sub> comme le **muscimol** ainsi que des antagonistes compétitifs comme la **bicuculline** et la **gabazine** (SR95531) [Figure 9, B]. Les récepteurs contenant la sous-unité  $\rho$  sont peu sensibles à la bicuculline (Barnard et al., 1998).

Les récepteurs GABA<sub>A</sub> possèdent également plusieurs sites de modulation allostérique. Les **benzodiazépines** ont été les premiers modulateurs à être identifiés (Haefely et al., 1975) (voir plus loin). Il s'agit de modulateurs allostériques positifs qui facilitent l'action du GABA. Les

récepteurs possédant la sous-unité  $\alpha 1$  ont une forte affinité pour les benzodiazépines alors que les récepteurs comprenant les sous-unités  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  et  $\alpha 6$  présentent une plus faible affinité.

Le site d'action des benzodiazépines est localisé à l'interface des sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$  [Figure 9, B] et les benzodiazépines induisent en général une potentialisation des courants GABAergiques en augmentant de l'affinité des récepteurs GABA<sub>A</sub> pour le GABA.

En plus des benzodiazépines, les **barbituriques** et l'**alcool** sont également des modulateurs allostériques des récepteurs GABA<sub>A</sub>. Ils se fixent sur un site de modulation distinct de celui du GABA et des benzodiazépines (MacDonald, Rogers, & Twyman, 1989; Sanna et al., 2004) [Figure 9, B].

Le **zinc** ( $Zn^{2+}$ ) est un modulateur allostérique négatif des récepteurs GABA<sub>A</sub> [Figure 9, B]. Cet ion métallique inhibe préférentiellement les récepteurs GABA<sub>A</sub> présentant certaines combinaisons de sous-unités. Ainsi, la combinaison  $\alpha ;\beta$  présente une sensibilité au  $Zn^{2+}$  beaucoup plus grande que la combinaison  $\alpha ;\beta ;\gamma$  (Draguhn, Verdorn, Ewert, Seeburg, & Sakmann, 1990; Smart, Moss, Xie, & Huganir, 1991). Le mode d'action de l'inhibition par le  $Zn^{2+}$  n'est, à ma connaissance, pas encore compris.

Les **protons** ( $H^+$ ) extracellulaires sont également des modulateurs des récepteurs GABA<sub>A</sub>. Le type d'effet des protons -potentialisation ou dépression- sur les récepteurs GABA<sub>A</sub> dépend de nombreux paramètres comme par exemple le type de neurone, le stade de développement, le mode d'activation des récepteurs (voir introduction dans Hugel et al 2012). Par ailleurs, les effets inhibiteurs des protons sur ces récepteurs pourraient être un artefact (Hugel, Kadiri, Rodeau, Gaillard, & Schlichter, 2012).

Les récepteurs GABA<sub>A</sub> peuvent également être modulés par les **neurostéroïdes**, voir paragraphe (cf Partie II, § B. 2. c.).

La fonction des récepteurs GABA<sub>A</sub> peut également être modulée par des **phosphorylations** impliquant les protéines kinase A (**PKA**) et C (**PKC**). Dans les cellules pyramidales CA1 de l'hippocampe, la phosphorylation des récepteurs GABA<sub>A</sub> entraîne une diminution de

l'amplitude des courants synaptiques GABAergiques (Cherubini & Conti, 2001). Par ailleurs, comme pour les récepteurs **AMPA** (acide  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxalone-propionique) du glutamate, le nombre de récepteurs GABA<sub>A</sub> à la surface des neurones peut évoluer rapidement par endocytose / exocytose et leur localisation peut changer rapidement par diffusion latérale, ce qui pourrait participer à des changements rapides des propriétés des synapses GABAergiques (Jacob, Moss, & Jurd, 2008).

### 3. L'inhibition par les récepteurs GABA<sub>A</sub>

Les récepteurs GABA<sub>A</sub> exercent leur inhibition par différents mécanismes : l'inhibition « shuntante » qui est due à l'ouverture de conductances membranaires, et l'inhibition par hyperpolarisation qui dépend du potentiel d'inversion des courants traversant ces récepteurs.

#### a. Inhibition shuntante

Indépendamment de l'inhibition hyperpolarisante décrite dans le paragraphe suivant, l'ouverture des récepteurs GABA<sub>A</sub> produit une inhibition shuntante (dite inhibition silencieuse). Cette inhibition résulte de la baisse de résistance membranaire associée à l'ouverture des récepteurs GABA<sub>A</sub>. Si des conductances entrantes sont ouvertes pendant que s'exerce cette inhibition, l'amplitude des dépolarisations qu'elles induiront sera réduite, suivant la loi d'Ohm. Cette inhibition a donc un impact par division alors que l'inhibition par hyperpolarisation a un impact par soustraction.

#### b. L'inhibition hyperpolarisante

L'ouverture des canaux GABA<sub>A</sub> entraîne un changement de potentiel de membrane si celui-ci est initialement différent du potentiel d'inversion des courants traversant ces canaux. Ce potentiel d'inversion dépend principalement du potentiel d'équilibre des ions Cl<sup>-</sup> (**E<sub>Cl-</sub>**). Dans la plupart des neurones des rongeurs adultes, les concentrations extra- et intracellulaires de Cl<sup>-</sup> sont telles qu'au potentiel de repos de -60 mV, l'ouverture d'une perméabilité aux ions Cl<sup>-</sup> induit un influx de ces ions dans la cellule, correspondant à un courant sortant hyperpolarisant (Glickfeld, Roberts, Somogyi, & Scanziani, 2009). Cette hyperpolarisation a un effet inhibiteur car elle éloigne le potentiel de membrane du seuil de déclenchement des PA. Cependant, le E<sub>Cl-</sub> n'est pas toujours plus négatif que les potentiels de membrane, notamment lors du

développement, après une forte entrée de  $\text{Cl}^-$ , qui augmente la concentration intracellulaire de  $\text{Cl}^-$  ( $[\text{Cl}^-]_{\text{intra}}$ ), et dans certaines conditions pathologiques (Staley, Soldo, & Proctor, 1995) (cf Partie II, § B. 2. a.). Dans ces cas, l'activation des récepteurs  $\text{GABA}_A$  peut dépolariser la membrane, mais l'effet global peut rester inhibiteur, car l'inhibition shuntante ne dépend pas de l'amplitude ou du sens du courant traversant les récepteurs.

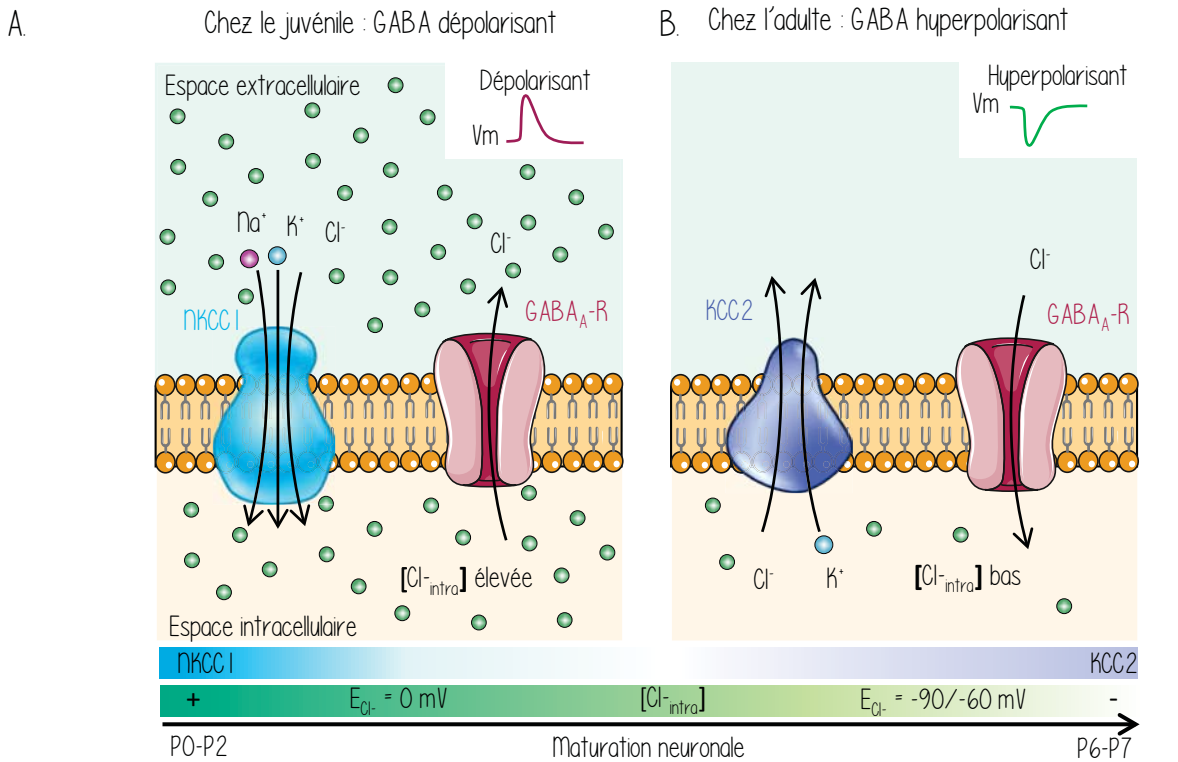
C'est par exemple le cas des récepteurs  $\text{GABA}_A$  localisés sur les terminaisons centrales des afférences primaires qui sont impliqués dans le mécanisme inhibiteur de dépolarisation des afférences primaires (**PAD** pour *primary afferent depolarisation*). Bien que l'activation des récepteurs dépolarise la terminaison présynaptique, ils ont une action inhibitrice impliquant à la fois l'inhibition shuntante et l'inactivation des canaux sensibles au potentiel (Rudomin & Schmidt, 1999).

Il y a donc un double effet inhibiteur : **1)** une **hyperpolarisation** qui s'oppose à l'effet dépolarisant d'un potentiel postsynaptique excitateur (**PPSE**) et **2)** la **diminution de la résistance membranaire** (shunt) qui diminue le changement de potentiel résultant du passage d'un courant ionique à travers la membrane plasmique (Paulus & Rothwell, 2016).

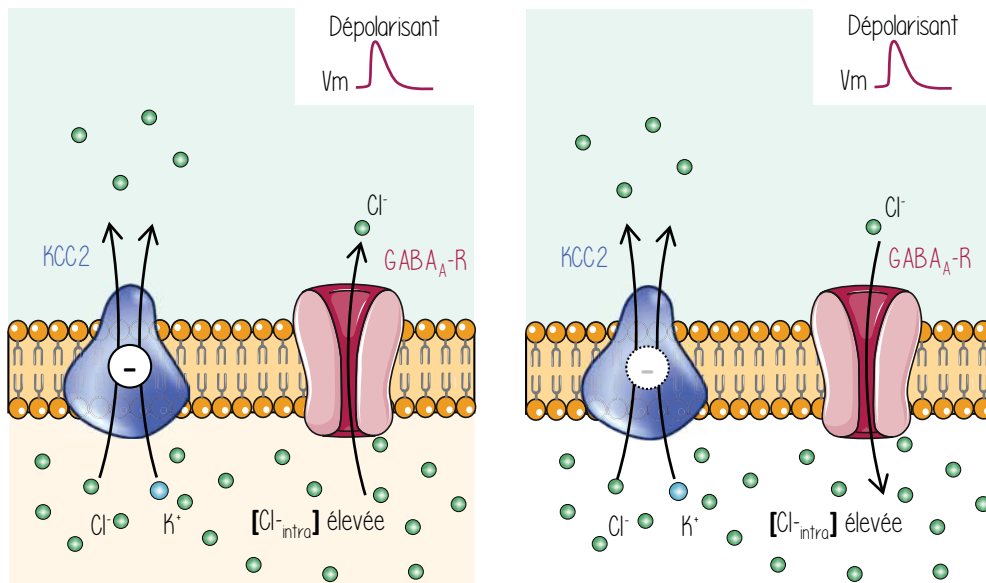
### c. Le gradient des ions $\text{Cl}^-$

L'inhibition générée par l'activation des récepteurs  $\text{GABA}_A$  dépend de la concentration intracellulaire des ions  $\text{Cl}^-$ . Cette concentration est régulée par des co-transporteurs tel que le co-transporteur  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  (**KCC2**) qui assure l'extrusion des ions  $\text{Cl}^-$  et le co-transporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$  (**NKCC1**) qui lui charge la cellule en  $\text{Cl}^-$  ayant pour conséquence une accumulation de  $\text{Cl}^-$  dans le milieu intracellulaire [Figure 10, B].

En conditions physiologiques, il existe des différences dans l'homéostasie des ions  $\text{Cl}^-$  en fonction du **développement** (Ben-Ari, Khalilov, Kahle, & Cherubini, 2012). En effet, à des stades précoces, NKCC1 est fortement exprimé contrairement au transporteur KCC2 qui est exprimé et devient majoritaire après la première semaine postnatale (Payne, Rivera, Voipio, & Kaila, 2003). Suite à l'établissement d'un gradient intra/extracellulaire des ions  $\text{Cl}^-$ , le flux de ces ions à travers les récepteurs  $\text{GABA}_A$  devient hyperpolarisant [Figure 10, A]. Il existe des différences dans l'homéostasie des ions  $\text{Cl}^-$  selon la **zone subcellulaire** considérée, par exemple, en condition contrôle le GABA est dépolarisant dans les fibres afférentes. Le  $E_{\text{Cl}}$  peut également varier selon la **structure du système nerveux** considérée (Ferrini et al., 2020).



C. En condition neuropathique : GABA dépolarisant D. En condition inflammatoire : GABA hyperpolarisant



**Figure 10** : Evolution du gradient  $\text{Cl}^-$  au cours du développement et en condition neuropathique et inflammatoire dans les neurones de la CDME

**A. Chez le juvénile** : la  $[\text{Cl}^-]_{\text{intra}}$  est élevée à cause de l'expression de **NKCC1** et de l'absence de **KCC2**, l'activation des récepteurs  $\text{GABA}_A$  ( **$\text{GABA}_A\text{-R}$** ) entraîne une sortie d'ions  $\text{Cl}^-$ . **B. Chez l'adulte** : la  $[\text{Cl}^-]_{\text{intra}}$  est basse grâce à l'expression du transporteur **KCC2** qui permet l'extrusion du  $\text{Cl}^-$ . L'activation des  **$\text{GABA}_A\text{-R}$**  entraîne donc une entrée de  $\text{Cl}^-$  hyperpolarisant le neurone postsynaptique. **C. En condition neuropathique** : l'expression de **KCC2** est réduite, ce qui a pour conséquence d'inverser le gradient des ions  $\text{Cl}^-$ , de façon similaire au stade juvénile. **D. En condition inflammatoire** : des changements de gradient des ions  $\text{Cl}^-$  n'ont pas été renseignés, cependant, une diminution d'expression de **KCC2** (représenté en pointillés) pourrait participer au développement ou au maintien de douleurs inflammatoires.

En effet, l'extrusion du  $\text{Cl}^-$  est deux fois plus élevée dans la lamina II que dans la lamina I (Ferrini et al., 2020). Par ailleurs, l'homéostasie des ions chlorures peut varier dans des situations pathologiques (Coull et al., 2003; Huberfeld et al., 2007) [Figure 10, C et D]. et des études suggèrent que l'augmentation de l'activité de KCC2 pourrait être une stratégie thérapeutique pour restaurer l'inhibition dans des situations de dysfonctionnement des co-transporteurs du  $\text{Cl}^-$  (Gagnon et al., 2013).

**En conclusion** : L'inhibition sous-tendue par les récepteurs  $\text{GABA}_A$  dépend de plusieurs paramètres : la quantité de molécules de GABA libérées, de la forme de la synapse, de la proximité des récepteurs du GABA ainsi que de l'organisation en sous-unités des récepteurs  $\text{GABA}_A$ . En effet, comme vu plus haut (Partie II, § A. 2. a), le sous-type de récepteur confère des propriétés physiologiques/pharmacologiques propres à chaque assemblage dont les affinités et des caractéristiques de désensibilisation spécifiques. D'autres paramètres qui définissent l'efficacité de l'inhibition, comme par exemple le gradient des ions  $\text{Cl}^-$ , et la présence de neuromodulateurs. En effet, l'efficacité inhibitrice des synapses GABAergiques dépend d'un ensemble paramètres présynaptiques, postsynaptiques et du temps de séjour du GABA dans la fente synaptique. Tous ces paramètres sont susceptibles d'être modifiés rapidement, ce qui peut sous-tendre la plasticité de ces synapses (cf Partie III).

## B. Transmission synaptique inhibitrice dans le système nociceptif spinal, et plus particulièrement dans la lamina II

Le traitement des informations par le système nociceptif spinal varie selon les conditions physiologiques et pathologiques. Selon ces conditions, différents types de douleurs peuvent survenir (voir définitions Encadré 1 et Figure 11). Les changements du traitement de l'information nociceptive survenant dans ces différentes situations impliquent notamment des modifications des transmissions synaptiques inhibitrices. De tels changements correspondent à des processus de plasticité dont la mise en place nécessite plus ou moins de temps et qui ne sont pas nécessairement dépendants de l'activité. De tels changements ne dépendant pas directement de l'activité sont traités dans cette section tandis que ceux correspondant à de la plasticité synaptique dépendante de l'activité seront abordés dans la partie III de l'introduction.



## Quelques définitions

🔍 **La douleur aiguë** est une douleur utile, qui a pour but de prévenir l'organisme d'un traumatisme. Cette douleur s'arrête à la suppression du stimulus ou lors de la guérison du traumatisme. C'est une douleur essentielle qui est transmise par l'activation des fibres A $\delta$  et C. Les informations sensorielles sont ensuite intégrées et modulées dans la corne dorsale avant leur envoi aux centres supra-spinaux pour donner lieu à une perception adéquate de la douleur.

🔍 **La douleur chronique** est une douleur qui a perdu son rôle physiologique, elle devient alors pathologique. Le terme chronique est utilisé lorsque celle-ci est récidivante ou lorsque que celle-ci persiste au-delà de 3 à 6 mois selon les définitions. La douleur chronique est le produit d'une dérégulation du traitement de l'information nociceptive lors d'une réponse à une lésion périphérique ou centrale. La douleur chronique est due à l'activation des fibres afférentes A $\delta$  et C ainsi que dans certains cas à celle des fibres A $\beta$ .

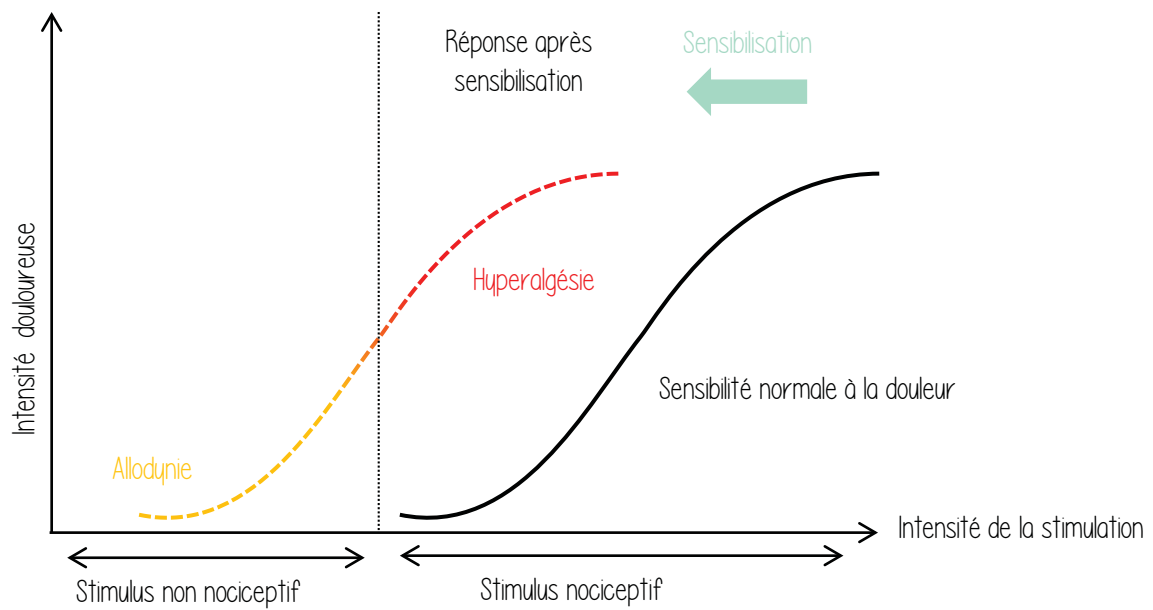
Les douleurs aiguës et chroniques peuvent être d'origine inflammatoires ou neuropathiques.

🔍 **La douleur inflammatoire** est un sous-type des douleurs dites par excès de nociception. Elle se caractérise par une stimulation persistante et excessive des nocicepteurs par des processus inflammatoires. Il n'existe pas de lésion nerveuse.

🔍 **La douleur neuropathique** se caractérise quant à elle, par une lésion du système nerveux périphérique ou central. **En condition normale**, les états d'allodynie et d'hyperalgésie sont des symptômes qui traduisent le bon fonctionnement du système nociceptif. En effet, lors d'une blessure, la vulnérabilité du tissu affecté augmente, ces symptômes sont donc des marqueurs d'un système nociceptif qui s'adapte à cette nouvelle vulnérabilité et permettent la mise en place de comportements adéquats pour protéger la zone lésée.

🔍 **Lors de douleur chronique**, l'hyperalgésie et l'allodynie peuvent persister au-delà de la cause initiale de la douleur. Ces états douloureux qui perdurent surviennent à la suite d'un dysfonctionnement du système nerveux périphérique ou central et ces signaux, utiles en condition normale, ne sont alors plus protecteurs mais deviennent des marqueurs de ce dysfonctionnement.

**Encadré 1** : Quelques définitions



**Figure 11 : Représentation schématique de l'hyperalgésie et de l'allodynie**

La courbe noire représente la **sensibilité à la douleur en condition normale** lors de l'application d'un stimulus nociceptif. Après **sensibilisation**, la courbe se décale sur la gauche. Ainsi, lors d'**hyperalgésie**, l'application d'un stimulus nociceptif produit une douleur plus intense qu'en conditions normales. Lors d'**allodynie**, un stimulus non nociceptif produit une douleur, absente en condition normale.

Dans les paragraphes qui suivent, seront présentés l'importance de la transmission synaptique inhibitrice pour le traitement des informations nociceptives en condition normale ainsi que les changements s'exerçant sur cette transmission en condition inflammatoire. Bien que la transmission glycinergique soit parfois abordée, les paragraphes qui suivent sont focalisés sur la transmission GABAergique (Zeilhofer, 2005). Les changements se déroulant en conditions neuropathiques seront rapidement abordés car ils n'ont pas été étudiés dans le cadre de mon travail de thèse.

### 1. Importance de la transmission synaptique inhibitrice dans le traitement de l'information nociceptive en conditions physiologiques de bases

La transmission synaptique inhibitrice est essentielle pour la modulation des informations nociceptives en conditions normales : elle permet de limiter l'activité des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière qui reçoivent des entrées excitatrices des afférences primaires (cf Partie I § B.).

Une altération de l'inhibition dans le système nociceptif spinal conduit à des modifications du traitement de l'information sensorielle se manifestant notamment par des phénomènes d'allodynie et d'hyperalgésie [Figure 11]. L'**allodynie** désigne une douleur évoquée par des stimuli non nociceptifs. L'allodynie fait généralement référence à la douleur occasionnée par la transmission d'informations provenant de fibres afférentes A $\beta$  ou A $\delta$  et C à bas seuil. L'**hyperalgésie** quant à elle désigne un état consécutif à la diminution du seuil d'activation des nocicepteurs.

L'administration intrathécale d'antagonistes de la transmission inhibitrice entraîne des signes comportementaux d'allodynie chez le rongeur. Ces résultats témoignent de l'importance de ces neurotransmetteurs dans les mécanismes de traitement des informations nociceptives. En effet, chez le rat, l'injection intrathécale de strychnine (un antagoniste des récepteurs glycinergiques) entraîne des comportements douloureux (Beyer, Roberts, & Komisaruk, 1985). De plus, ces animaux développent une hyperalgésie au chaud (Charlet, Lasbennes, Darbon, & Poisbeau, 2008) et une allodynie mécanique (Beyer et al., 1985; Miraucourt et al., 2007b). L'injection d'antagonistes des récepteurs GABA<sub>A</sub> (la bicuculline ou la picrotoxine) entraîne également une allodynie chez le rat (Roberts, Beyer, & Komisaruk, 1986). Il a également été montré que l'administration d'antagonistes de récepteurs de la glycine (strychnine) ou de bicuculline entraînait une hypersensibilité chez de rat lors du test de la plaque chaude (Yaksh, 1989) ainsi

qu'une allodynie mécanique chez le rat (Ishikawa, Marsala, Sakabe, & Yaksh, 2000). En revanche, l'injection d'agonistes des récepteurs GABA<sub>A</sub> ou l'augmentation de l'inhibition par transplantation de cellules synthétisant du GABA réduisent l'hyperalgésie et l'allodynie (Eaton., 1999; Hwang & Yaksh, 1997; Rode, Jensen, Blackburn-Munro, & Bjerrum, 2005 ; Stubbley et al., 2001).

**En conclusion** : Les interneurons inhibiteurs du système nociceptif spinal assurent quatre fonctions principales **1) l'atténuation** des entrées nociceptives sur les neurones de la corne dorsale pour donner lieu à une réponse appropriée aux stimuli nociceptif ; **2) l'inhibition** de l'activité spontanée des nocicepteurs ; **3) la séparation** de différentes modalités ; **4) la limitation** de la surface de projection des fibres afférentes (Sandkuhler, J. 2009).

Un dysfonctionnement de l'un ou plusieurs de ces mécanismes peut entraîner des symptômes qui surviennent également dans les états de douleur chronique comme l'allodynie, l'hyperalgésie, ou encore l'apparition de douleurs spontanées.

## 2. Modifications de la transmission synaptique inhibitrice au cours du développement

### a. L'importance du potentiel d'équilibre des ions Cl<sup>-</sup>

Le potentiel d'inversion des courants synaptiques GABAergiques dépend essentiellement de la valeur du potentiel d'équilibre des ions chlorures, mais aussi de celui des ions bicarbonate. Le potentiel d'équilibre des ions bicarbonate est voisin de 0 mV, la concentration de cet ion étant similaire dans les milieux extra- et intracellulaires. En revanche, le potentiel d'équilibre des ions chlorure, et la capacité des neurones à extruder ces ions varient selon le développement et dans certaines conditions pathologiques (cf Partie II : § A. 3 .c ; § B. 3. b. *Gradient Cl* et § B. 4.).

De P0 à P7, dans 40 % des neurones de la corne dorsale, le potentiel d'équilibre des ions chlorures est plus dépolarisé que celui de la membrane neuronale au repos. Dans ces neurones,

le GABA dépolarise la membrane mais le potentiel d'équilibre du GABA reste plus négatif que le seuil de déclenchement des PA.

### b. Cotransmission GABA/glycine

Pour qu'il y ait une cotransmission, il faut que **1)** deux neurotransmetteurs soient **colibérés** et que **2)** ces deux neurotransmetteurs soient **codétectés** par le neurone postsynaptique. Dans les laminae I et II de la CDME, la cotransmission du GABA et la Glycine a été mise en évidence par des enregistrements électrophysiologiques sur des tranches de moelle épinière de rat (Chery & de Koninck, 1999; Keller, Coull, Chery, Poisbeau, & De Koninck, 2001). Chez les rats juvéniles, des courants postsynaptiques inhibiteurs (**CPSI**) mixtes GABA/glycine sont présents dans les CDME mais disparaissent à partir de P23 (Chery & de Koninck, 1999; Keller et al., 2001).

### c. Neurostéroïdes

Dans la CDME, toutes les enzymes nécessaires à la synthèse de neurostéroïdes sont présentes. Dans la lamina II, la synthèse des neurostéroïdes est effectuée à partir de la tétrahydro-désoxycorticostérone (**THDOC**) par la *Translocator Protein 18kD* (**TSPO**), un transporteur de cholestérol impliqué dans la synthèse des neurostéroïdes, dont l'activité est modulée lors du développement et en condition inflammatoire (cf. Partie II, § B. 3. b. *Les neurostéroïdes*). Les récepteurs GABA<sub>A</sub> sont modulés positivement par les neurostéroïdes réduits en position 3 $\alpha$  comme la prégnanolone (**3 $\alpha$ 5 $\beta$ THP**), l'allopregnanolone (**3 $\alpha$ 5 $\alpha$ THP**) et la THDOC (3 $\alpha$ 5 $\alpha$  THDOC) (Rupprecht & Holsboer, 1999). L'effet des neurostéroïdes est plus important quand le récepteur comprend la sous-unité  $\delta$  (Stell, Brickley, Tang, Farrant, & Mody, 2003) mais cette sous-unité ne semble pas être exprimée dans la moelle épinière à l'âge adulte. La synthèse de neurostéroïdes 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ -réduits est élevée durant les 15 premiers jours du développement, puis diminue. Les neurostéroïdes augmentent l'affinité du récepteur GABA<sub>A</sub> pour son ligand ce qui change les caractéristiques des courants synaptiques GABAergiques. Ceci se traduit notamment par un ralentissement de la cinétique de désactivation des courants synaptiques GABAergiques (Keller, Breton, Schlichter, & Poisbeau, 2004; Keller et al., 2001). Une telle modulation des courants postsynaptiques GABAergiques par des neurostéroïdes 3 $\alpha$ 5 $\alpha$  réduits a été mise en évidence dans les couches superficielles de la moelle épinière, notamment la lamina II, lors d'une inflammation périphérique (Inquimbert, Rodeau, & Schlichter, 2008b; Poisbeau et al., 2005).

Chez le rat juvénile (P8), la production endogène de neurostéroïdes  $3\alpha5\alpha$  réduits ralentit les cinétiques des CPSI miniatures GABAergiques dans les laminae II-IV. Cet effet est dû à l'activité tonique de la TSPO contrôlant la synthèse des neurostéroïdes. L'activité de cette protéine disparaît après P8 dans les laminae III-IV et est fonctionnellement réduite dans la lamina II après P15. L'arrêt d'activité de la TSPO est corrélé avec la diminution de la durée des CPSI miniatures GABAergiques dans ces laminae (Inquimbert et al., 2008b).

### 3. En condition inflammatoire

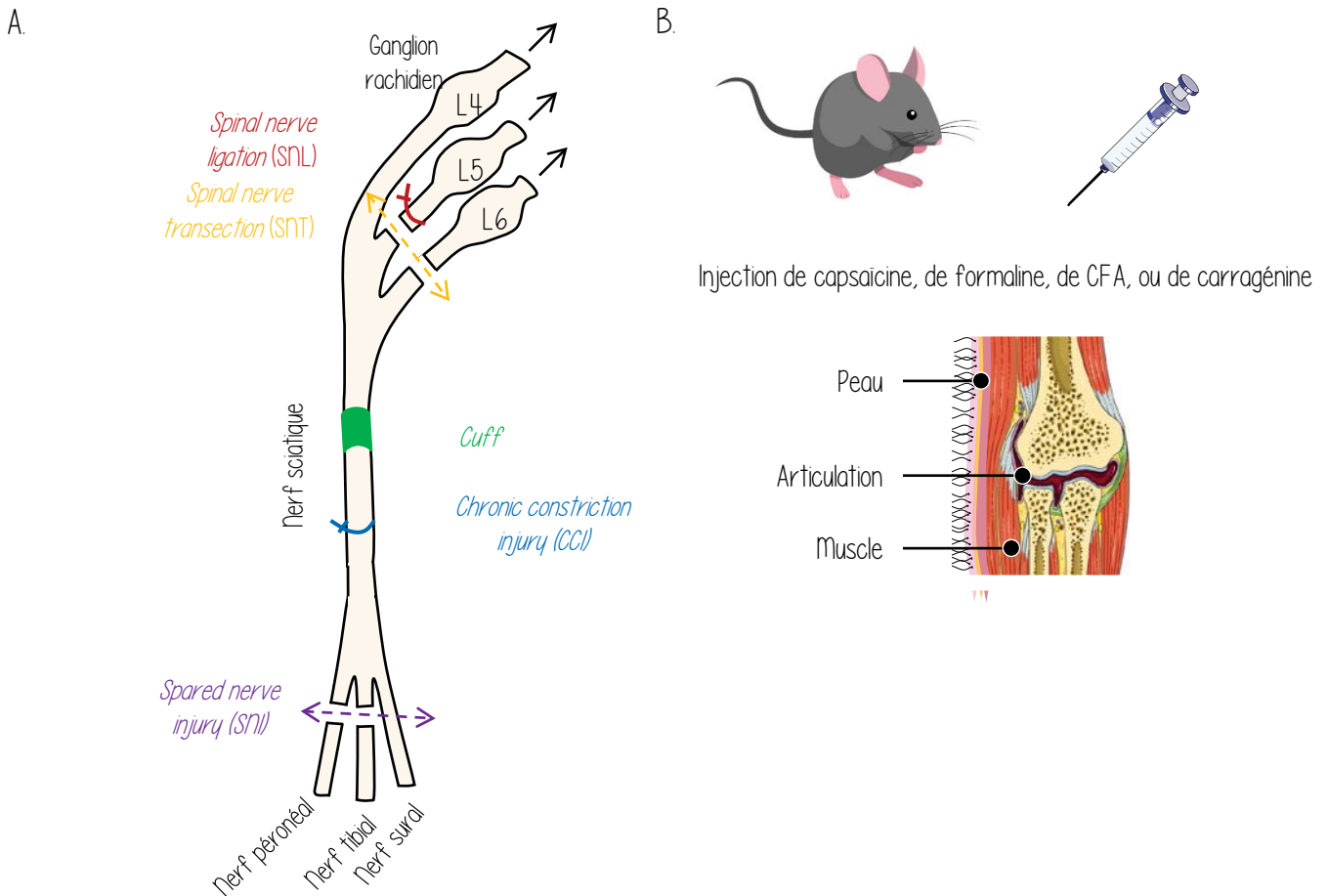
Pour étudier les mécanismes impliqués dans l'établissement de ses états douloureux, des modèles animaux « précliniques » sont utilisés. Ces modèles animaux présentent des hyperalgésies et des allodynies [Figure 11] qui sont souvent observées chez les patients présentant des douleurs neuropathiques ou inflammatoires. Les modèles décrits dans les paragraphes qui suivent sont ceux mis en œuvre chez le rongeur [Figure 12, A et B].

Des mécanismes de désinhibition modifient la balance inhibition/excitation dans la corne dorsale en condition inflammatoire. La libération locale de prostaglandines inhiberait la fonction des neurones glycinergiques, ayant pour conséquence une diminution de l'inhibition locale (Ahmadi, Lippross, Neuhuber, & Zeilhofer, 2002). En plus de cette désinhibition, des changements de la transmission excitatrice (Galan, Laird, & Cervero, 2004; Ji, Gereau, Malcangio, & Strichartz, 2009), une activation de la microglie et des astrocytes (Milligan & Watkins, 2009), ainsi que des changements dans l'activité des fibres afférentes (Baba, Doubell, & Woolf, 1999; Dickie, McCormick, Lukito, Wilson, & Torsney, 2017; Neumann, Doubell, Leslie, & Woolf, 1996; Woolf & Wall, 1986) ont également été observés dans la corne dorsale en condition inflammatoire, mais ces phénomènes ne seront pas détaillés ici.

Les paragraphes qui suivent sont centrés sur les mécanismes de désinhibition dans la corne dorsale de la moelle épinière, lors de douleur d'origine inflammatoire, aiguë ou chronique.

#### a. Mécanismes de désinhibition en condition inflammatoire

##### *La balance excitation/inhibition*



Modèle	Méthode d'induction
CCI	Ligature lâche du nerf sciatique
Cuff	Compression du nerf sciatique par un manchon en polyéthylène
SNL	Ligature serrée de la branche spinal L5
SNT	Section des branches L5-L6
SNI	Section des branches tibiale et péronéale. La branche surale est laissée intacte

**Figure 12 :** Les modèles animaux de douleur

**A. Modèles de douleur neuropathique :** Pour étudier les douleurs neuropathiques, il existe des modèles de **transections complètes** (comme le **SNT** pour *sciatic nerve transection*) ou des modèles de **transections incomplètes** (comme le **CCI** pour *Chronic Constriction Injury* [Bennett et al., 1988] ; **SNL** pour *Spinal Nerve Ligation* [Ho Kim & Mo Chung, 1992] et le **SNI** pour *Spared Nerve Injury* [Decosterd & Woolf, 2000]). Ces derniers sont considérées comme étant plus représentatifs des pathologies humaines (Todd, 2010 et Caylor et al. 2019). Il existe également le modèle du **Cuff** (Pitcher et al., 1999 ; Yalcin et al., 2014).

Pour en savoir plus sur les modèles de douleurs neuropathiques voir Todd, 2010 et Caylor, 2019.

**B. Modèles de douleur inflammatoire :** Il existe plusieurs modèles animaux permettant l'étude des douleurs inflammatoires. Les plus utilisés consistent en l'injection d'agents inflammatoires comme la **capsaïcine**, la **formaline**, le **CFA** (*Complete Freund's Adjuvant*) ou encore de **carragénine** dans la **peau**, les **muscles** ou les **articulations**. Dans le cas de la carragénine, l'inflammation peut s'étendre sur plusieurs jours voir plusieurs semaines.

Des changements dans la balance inhibition/excitation dans le réseau de la corne dorsale sont observés en condition inflammatoire. Kopach et al. en 2015, ont montré qu'il y avait des changements de transmission excitatrice en condition inflammatoire induite par injection de **CFA** (*Complete Freund's Adjuvant*) dans la patte [Figure 12, B], chez des rats juvéniles. Ceci a pour conséquence indirecte une modification de la transmission synaptique inhibitrice (Kopach, Krotov, Belan, & Voitenko, 2015). En effet, après injection de CFA, il y a une augmentation de la transmission synaptique excitatrice dans les neurones de la lamina II caractérisés par un profil de décharge de type « *adapting* » (ressemblant au profil *phasic* décrit Partie I § C. 4. b.) et une diminution dans les neurones au profil de décharge de potentiel d'action *tonic*. Les neurones *adapting* pourraient être excitateurs et les neurones *tonic* inhibiteurs, ce qui correspondrait à une augmentation de l'excitation sur les neurones excitateurs et une diminution de l'excitation sur les neurones inhibiteurs, et donc à une altération de la balance excitation/inhibition dans ce système. Ces résultats suggèrent des rôles différents dans le traitement des informations nociceptives pour ces deux populations de neurones (Kopach et al., 2015).

Comme énoncé plus haut, un des états les plus retrouvés lors de douleur chronique neuropathique ou inflammatoire, est l'allodynie mécanique. En 2021, Peirs et al. ont synthétisé la majorité des mécanismes identifiés jouant un rôle dans cet état (Peirs et al., 2021). Chez des rats préalablement injectés avec du CFA, l'application sous anesthésie de stimulus non nociceptifs sur la peau (par un coton tige), augmente la densité de neurones exprimant la protéine phospho-ERK dans la lamina I et la lamina IIe (Gao & Ji, 2010). L'activation de la protéine **ERK** (*Extracellular signal-regulated kinases*) dans la CDME peut servir de marqueur de sensibilisation des neurones de la corne dorsale dans des cas de douleur persistante. La protéine ERK est activée en temps normal par des stimuli nociceptifs à haut seuil.

Ces résultats coïncident avec ceux obtenus quelques années plus tard par Peirs et al. qui ont montré lors d'une inflammation persistante induite par injection de carragénine, qu'une stimulation mécanique par les filaments de von Frey induisait l'expression de c-Fos, un marqueur d'activité neuronale, dans les neurones situés dans la partie médiane des laminae I-II et dans les laminae IV-VI (Peirs et al., 2015).

#### *La co-transmission GABA/Glycine*

La co-transmission GABA/Glycine est présente dans la CDME mais elle disparaît chez le rat adulte (cf Partie II, § B. 2. B. Co-transmission GABA/glycine). Cependant, des CPSI mixtes



GABA/glycine témoins de cette co-transmission réapparaissent chez le rat adulte après induction d'une inflammation périphérique (Poisbeau et al., 2005). De plus, la présence de CPSI mixtes est corrélée avec la synthèse de neurostéroïdes  $3\alpha5\alpha$ -réduits (Inquimbert, Rodeau, & Schlichter, 2007a, 2008a; Keller et al., 2004).

## **b. Modulation de la transmission inhibitrice en condition inflammatoire**

### *Gradient des ions $Cl^-$*

En situation inflammatoire, tout comme en situation neuropathique, il semble qu'il y ait une modification de la balance excitation/inhibition dans les réseaux spinaux. Ce changement de balance qui implique la perte de contrôles inhibiteurs, entraînant une augmentation de l'activité neuronale, met en jeu plusieurs mécanismes regroupés sous le terme de « désinhibition ». Outre les changements dans les connexions excitatrices mentionnées dans le paragraphe précédent, il pourrait également exister des changements dans les connexions inhibitrices similaires à ce qui a été décrit en conditions neuropathiques dans lesquelles l'expression de KCC2 est réduite (Coull et al., 2003) (cf Partie II. B. 4.) Néanmoins, l'altération de l'homéostasie des ions  $Cl^-$  en conditions d'inflammation périphérique n'est pas clairement démontrée dans la littérature actuellement disponible. Une telle altération serait compatible avec des études cliniques et pré-cliniques suggérant qu'un simple changement de  $E_{Cl^-}$  peut contribuer à la douleur et l'hypersensibilité observées en situation de douleur aiguë, ou consécutives à une lésion nerveuse ou une inflammation persistante (Price et al., 2009).

Dans un modèle de douleur inflammatoire induite par injection de CFA, il a été mis en évidence une diminution de l'expression de KCC2 dans la CDME, suggérant que cette diminution d'expression de KCC2 pourrait participer au développement ou au maintien de douleurs inflammatoires chroniques (Zhang et al., 2008). Il pourrait également y avoir des altérations de  $E_{Cl^-}$  dans un modèle d'arthrose aiguë chez le rat (par injection de CFA autour de l'articulation tibio-tarsienne). Dans ce modèle, l'expression de l'**ARNm** et des protéines de KCC2 et de NKCC1 sont augmentées dans la corne dorsale superficielle mais pas dans les laminae plus profondes (Morales-Aza, Chillingworth, Payne, & Donaldson, 2004). Dans un modèle de d'arthrose chronique, l'expression d'ARNm et de protéine de NKCC1 restent élevées pendant 4 jours mais celles de KCC2 retournent aux niveaux de base (Morales-Aza et al., 2004).

Ces résultats ont plus d'une dizaine d'années et n'ont à notre connaissance pas été confirmés par des études vérifiant par une approche fonctionnelle si  $E_{Cl^-}$  et/ou la capacité d'extrusion de ces ions étaient bien altérés en conditions inflammatoires.

#### *Modification de l'excitabilité par des médiateurs de l'inflammation*

Les afférences primaires et les neurones de la corne dorsale ont une excitabilité augmentée en condition inflammatoire suite à l'action de plusieurs médiateurs de l'inflammation et neurotransmetteurs (SP, neurokinine A, CGRP, glutamate, aspartate (Kangrga & Randic, 1990)). Ce cocktail de médiateurs est impliqué dans le changement d'expression et d'activité de différents canaux (par exemple, des récepteurs du glutamate et de l'aspartate) présents à la surface de ces neurones (Coderre, 1993; Willis, 2001).

#### *Neurostéroïdes*

En condition inflammatoire, l'activité de la TSPO est modulée (Keller et al., 2004; Poisbeau et al., 2005). Lors d'une inflammation périphérique, la production de neurostéroïdes  $3\alpha,5\alpha$ -réduits est réactivée dans la lamina II (Poisbeau et al., 2005) et ces neurostéroïdes modulent positivement les récepteurs  $GABA_A$  dans les couches superficielles de la CDME en prolongeant leur cinétique de désactivation, ce qui a un effet antinociceptif (Inquimbert, Rodeau, & Schlichter, 2007b; Poisbeau et al., 2005) (cf Partie II. § B. 2. c.). L'augmentation de cette inhibition est corrélée avec une limitation sélective de l'hyperalgésie thermique induite par l'inflammation alors que l'allodynie mécanique reste inchangée (Poisbeau et al., 2005).

En 2008, Charlet et al. ont montré que l'administration intrathécale de neurostéroïdes  $3\alpha$  réduits, augmentait les seuils de sensibilité chez des rats naïfs et qu'elle réduisait également l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique au froid dans un modèle d'inflammation périphérique par injection de carragénine. L'administration de neurostéroïdes  $3\alpha,5\beta$  exerce un effet antinociceptif via une modulation allostérique positive des récepteurs  $GABA_A$  de la corne dorsale de la moelle épinière (Charlet et al., 2008; Hosie, Clarke, da Silva, & Smart, 2009; Hosie, Wilkins, da Silva, & Smart, 2006; Hosie, Wilkins, & Smart, 2007).

Par ailleurs, l'induction du modèle de d'inflammation périphérique par injection intraplantaire de carragénine restaure la synthèse de neurostéroïdes endogènes par la TSPO dans les laminae III-IV (Inquimbert et al., 2007b, 2008b).

*Remarque : Dans les neurones sensoriels primaires, en condition contrôle, l'expression de NKCC1 rend le GABA dépolarisant au potentiel de repos. Lors du développement de douleur inflammatoire ou neuropathique, l'expression de NKCC1 est augmentée dans les neurones sensoriels primaires, rendant le gradient Cl<sup>-</sup> encore plus dépolarisant (Morales-Aza et al., 2004).*

#### 4. En condition neuropathique

La diminution d'inhibition dans la corne dorsale est l'un des mécanismes expliquant la survenue de douleurs en conditions neuropathiques, l'excitation des neurones de la corne dorsale étant sous le contrôle d'interneurones inhibiteurs GABAergiques et glycinergiques. Ceci est soutenu par le fait que l'application intrathécale d'antagonistes des récepteurs GABA<sub>A</sub> et/ou de la glycine entraîne une allodynie et une hyperalgésie similaires à celles consécutives à une lésion nerveuse (Lu et al., 2013; Miraucourt et al., 2007b; Sivilotti & Woolf, 1994; Yaksh, 1989). De plus, plusieurs études ont montré une diminution des courants et des potentiels postsynaptiques inhibiteurs après une lésion nerveuse (Lu et al., 2013; Moore et al., 2002; Scholz et al., 2005). En 2003, l'équipe d'Yves DeKoninck a démontré qu'en situation neuropathique, l'expression de KCC2 était diminuée dans la corne dorsale de la moelle épinière, et que cette diminution entraînait une augmentation de [Cl<sup>-</sup>]<sub>intra</sub> responsable de la perte de l'efficacité de l'inhibition dans cette structure (Coull et al., 2003).

Cette baisse d'inhibition découle d'une baisse de l'efficacité des synapses inhibitrices résultant de la perte de la capacité des neurones à maintenir une valeur de E<sub>Cl<sup>-</sup></sub> inférieure au potentiel de repos. Dans ces conditions, bien que l'inhibition shuntante persiste, l'effet inhibiteur lié à l'hyperpolarisation est réduit ou perdu (Coull et al., 2003)

🔍 Pour en savoir plus sur les changements de la transmission synaptique inhibitrice en condition neuropathique, voir (Coull et al., 2005; Gagnon et al., 2013; Sandkuhler, 2009).

## CONCLUSION DE LA PARTIE II

**Les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière sont sous un contrôle inhibiteur permanent indispensable au bon traitement des informations nociceptives et à la**

**perception normale de la douleur. L'inhibition est principalement assurée par les récepteurs ionotropiques GABAergiques, mais également par des récepteurs glycinergiques (voir plus haut). L'inhibition GABAergique peut être modulée par différentes substances et mécanismes ainsi que lors d'états douloureux inflammatoires ou pathologiques comme en situation neuropathique. Ces changements modifient la balance excitation/inhibition au sein du système nociceptif spinal, certains d'entre eux réduisant l'inhibition et d'autres l'augmentant.**

## PARTIE III : LA PLASTICITE A COURT TERME

A la plupart des synapses du système nerveux, l'efficacité de la transmission synaptique peut être modifiée en réponse aux activités antérieures. De tels changements sont désignés sous les termes de **plasticité synaptique dépendante de l'activité**. Il existe différents types de plasticité à court-terme selon les conditions d'induction et surtout les durées durant lesquelles elles se maintiennent. L'omniprésence de la plasticité synaptique dépendante de l'activité à la plupart des synapses, et son maintien dans l'évolution du règne animal et notamment chez les vertébrés, attestent de son rôle fondamental. Au plan synaptique, la plasticité à court-terme intervient dans le traitement des informations codées en fréquence de décharge de potentiels d'action, le filtrage de l'information, et la modulation de la transmission synaptique (Markram et al., 1998). Ce type de plasticité intervient également dans la mémorisation et l'adaptation (Chance et al., 1998).

Les mécanismes de plasticité synaptique dépendante de l'activité ont été abondamment étudiés chez certaines espèces comme l'aplysie (Carew, Castellucci, & Kandel, 1971) et à certaines synapses du cerveau et du cervelet des mammifères. En revanche, cette plasticité a été très peu étudiée dans la CDME. Pourtant, des phénomènes de plasticité sont susceptibles de jouer un rôle majeur dans cette structure également, où projettent des afférences codant l'intensité des informations sensorielles en fréquence de PA.

Dans les paragraphes qui suivent, nous aborderons les différentes formes de plasticité synaptique et les mécanismes les sous-tendant. La plasticité synaptique dans la CDME sera particulièrement détaillée ainsi que son importance dans le traitement des informations nociceptives, notamment dans l'établissement et le maintien d'hyperalgésie et d'allodynie. Ceci fait l'objet d'une revue non encore publiée dont le manuscrit correspond à une partie de ce chapitre (cf Partie III, Revue 1).

### A. La plasticité synaptique dépendante de l'activité

#### 1. Les différents types de plasticité synaptique dépendante de l'activité

La plasticité synaptique correspond à la capacité qu'ont les neurones et leurs synapses à modifier leurs caractéristiques en fonction de leur activité passée. Ces changements

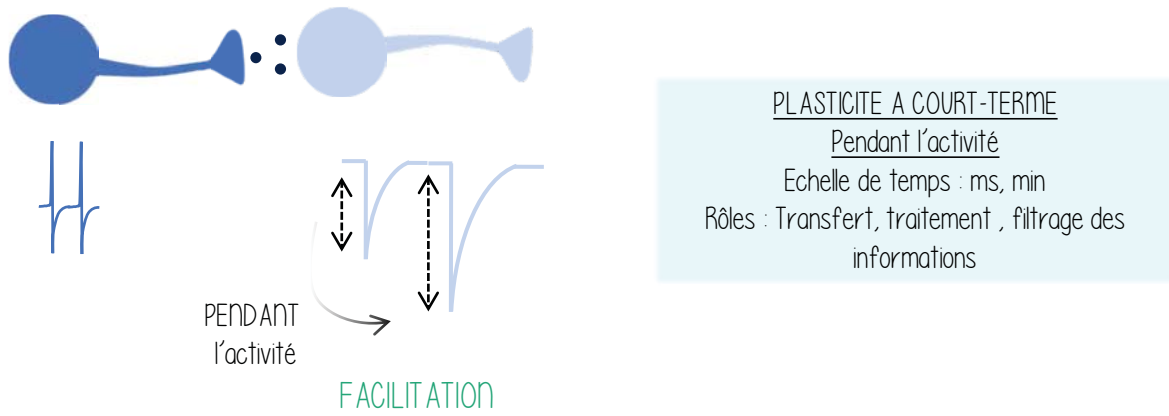
fonctionnels peuvent survenir au cours d'une courte séquence d'activités synaptiques. Les changements transitoires dont le développement et le retour à l'état initial se déroulent dans une gamme de temps de l'ordre de la milliseconde à quelques minutes sont désignés sous le nom de **plasticité synaptique à court-terme** (**STP** pour *Short-Term Plasticity*) (Abbott & Regehr, 2004) [Figure 13, A]. Ces changements entraînent selon le cas une facilitation ou une dépression transitoire de l'amplitude des courants synaptiques. Des changements plus durables de l'efficacité synaptique ont été mis en évidence à de nombreux types de synapses et sont désignés sous le terme de **plasticité à long-terme**. Ces phénomènes de plasticité à long-terme peuvent également consister en une facilitation ou en une dépression. Ils sont considérés comme des bases synaptiques de processus d'adaptation, de mémorisation et d'apprentissage [Figure 13, B] (Abbott & Regehr, 2004).

## 2. La plasticité synaptique à court-terme : généralités

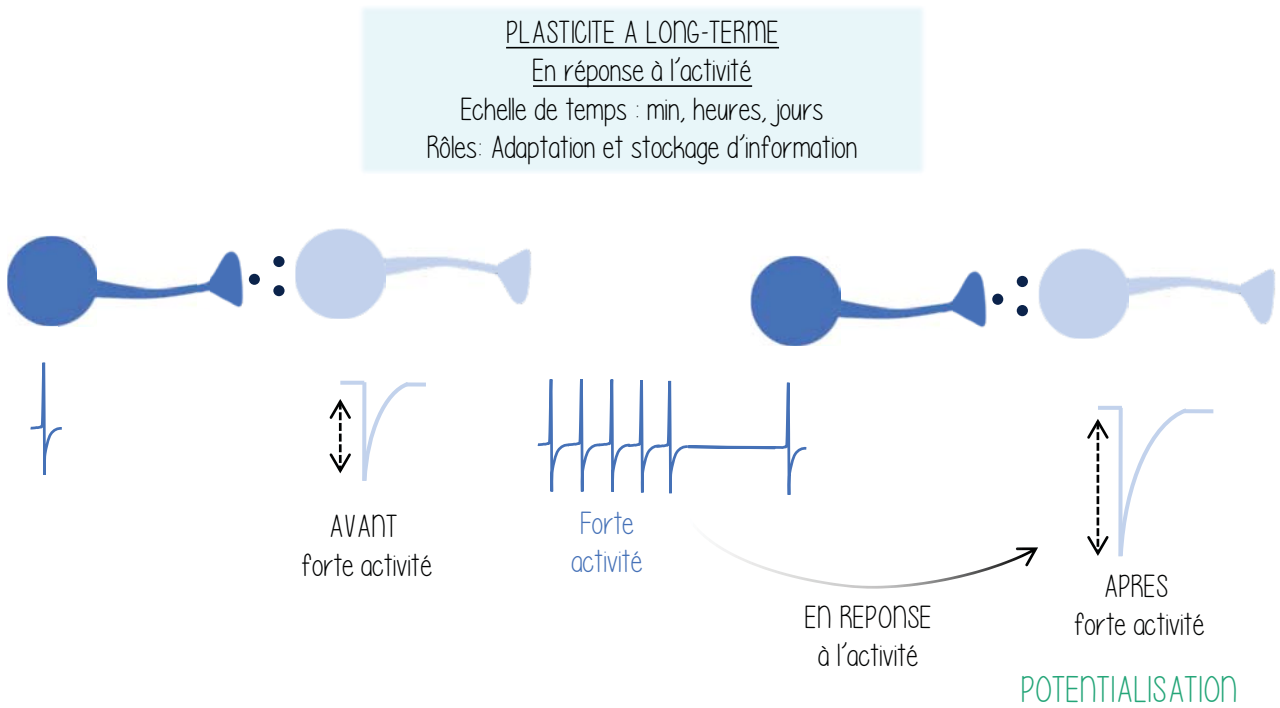
Les mécanismes de la STP ont été étudiés dans plusieurs structures telles que le cervelet, l'hippocampe et à certaines synapses particulières comme par exemple le calyx de Held (du système auditif) où la connexion entre les fibres moussues et les cellules pyramidales de la région CA3 de l'hippocampe. En revanche, ces mécanismes ont été peu étudiés dans la CDME. La majorité des mécanismes détaillés si dessous n'ont à notre connaissance pas encore été mis en évidence dans cette structure, mais pourrait être similaire dans la CDME.

Les mécanismes de STP identifiés à l'heure actuelle sont principalement d'origine présynaptique, c'est-à-dire qu'ils s'exercent et mettent en jeu des acteurs moléculaires du **neurone présynaptique**. Ces mécanismes peuvent cependant concerner d'autres étapes de la transmission synaptique et s'exercer au sein de la **fente synaptique** et dans le **neurone postsynaptique**. Les conséquences de la STP peuvent soit entraîner un renforcement (une Facilitation à court-terme, **ST-F** pour *Short-Term Facilitation*) [Figure 14, A et C] ou au contraire un affaiblissement de la transmission synaptique (une Dépression à court-terme, **ST-D** pour *Short-Term Depression*) se maintenant de quelques millisecondes à plusieurs minutes [Figure 14, B et C].

A.

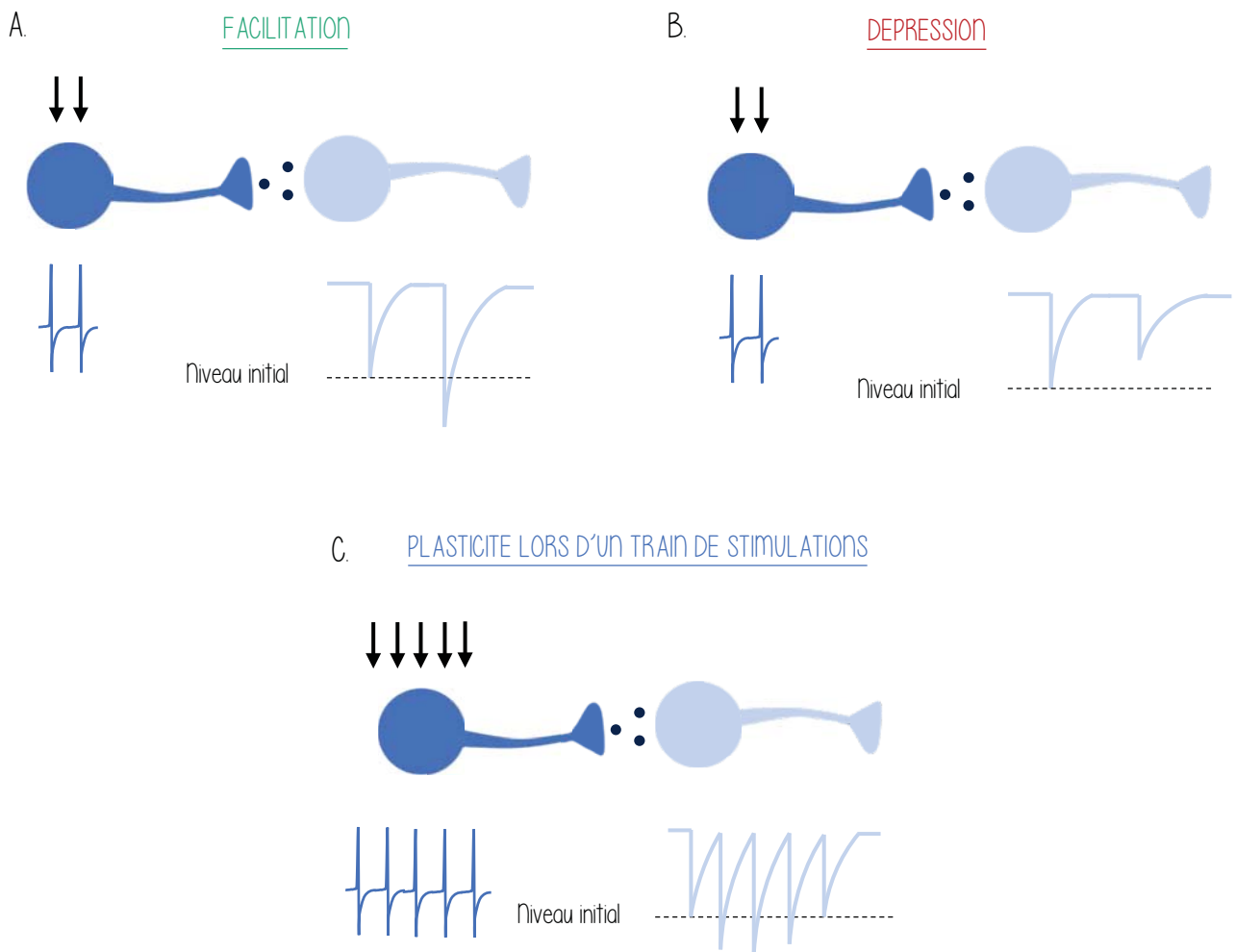


B.



**Figure 13 : Plasticité à court-terme et plasticité à long-terme**

**A.** Exemple de plasticité à court-terme. **B.** Exemple de plasticité à long-terme (**Facilitation**) .



**Figure 14 : Facilitation et dépression à court-terme**

**A. Exemple schématique d'une facilitation à court-terme** : Deux stimulations rapprochées évoquent des courants postsynaptiques d'amplitudes différentes. Dans le cas d'une **facilitation à court-terme (ST-F)**, le 2<sup>ème</sup> courant est plus grand que le premier. **B. Exemple schématique d'une dépression à court-terme** : Dans le cas d'une **dépression à court-terme (ST-D)**, le 2<sup>ème</sup> courant est plus petit que le premier. **C. Exemple schématique de plasticité à court-terme lors d'un train de stimulation** : Lors d'un **train de stimulation**, les courants postsynaptiques présentent des amplitudes différentes en fonction du rang de stimulation.



### 3. Les mécanismes de la plasticité synaptique à court-terme dépendante de l'activité

#### a. Les mécanismes de plasticité à court-terme impliquant l'élément présynaptique

*Changement de la probabilité de libération : hypothèse du « Calcium résiduel »*

La probabilité de libération vésiculaire est fortement dépendante de la **concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  libre ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intra libre}}$ )** [Figure 15]. Lors d'une première stimulation, le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intra}}$ ) est chélaté par des protéines liant le calcium, diminuant ainsi son accumulation sous forme libre dans la terminaison (Matveev, Zucker, & Sherman, 2004). En revanche, lors de stimulations ultérieures, les chélateurs déjà liés sont moins efficaces et l'élévation de la concentration de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intra libre}}$  augmente la probabilité de fusion des vésicules avec la membrane plasmique du neurone présynaptique. Ainsi, une ST-F pourrait résulter d'un plus grand pic de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intra libre}}$  survenant lorsqu'un PA a été précédé par un premier PA (Tang, Schlumpberger, Kim, Lueker, & Zucker, 2000; Zucker & Regehr, 2002). Il a été montré que l'inactivation génique de canaux calcium de type-P supprimait l'augmentation du pic de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intra libre}}$  observée lors de seconds PA, ainsi que la ST-F qui en résulte (Mochida, Few, Scheuer, & Catterall, 2008).

Tandis qu'un plus grand pic de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intra libre}}$  entraîne une ST-F, la diminution du pic de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intra libre}}$  suite à un PA provoque une ST-D. Une telle diminution de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intra libre}}$  peut être due à une diminution de l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$ . La libération de neurotransmetteurs étant fortement dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ , de faibles changements dans le pic de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intra libre}}$  résultant d'un PA peuvent avoir des répercussions sur cette libération (Neher & Sakaba, 2008). Par exemple, le Calyx de Held est une synapse qui déprime suite à la diminution de l'amplitude des pics de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intra}}$  induit par des PA successifs (Forsythe, Tsujimoto, Barnes-Davies, Cuttle, & Takahashi, 1998; Xu & Wu, 2005). De plus, il a été montré dans certaines structures que la probabilité de libération dépendait également de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{extra}}$  (Dodge & Rahamimoff, 1967; K. A. Foster, Kretzner, & Regehr, 2002; Lundberg & Quilisch, 1953; Valera, Doussau, Poulain, Barbour, & Isope, 2012). L'augmentation de la probabilité de libération par suite à l'augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intra libre}}$  dans l'élément présynaptique peut également impliquer des messagers libérés par l'élément présynaptique et agissant sur des autorécepteurs présynaptiques.

Elément présynaptique

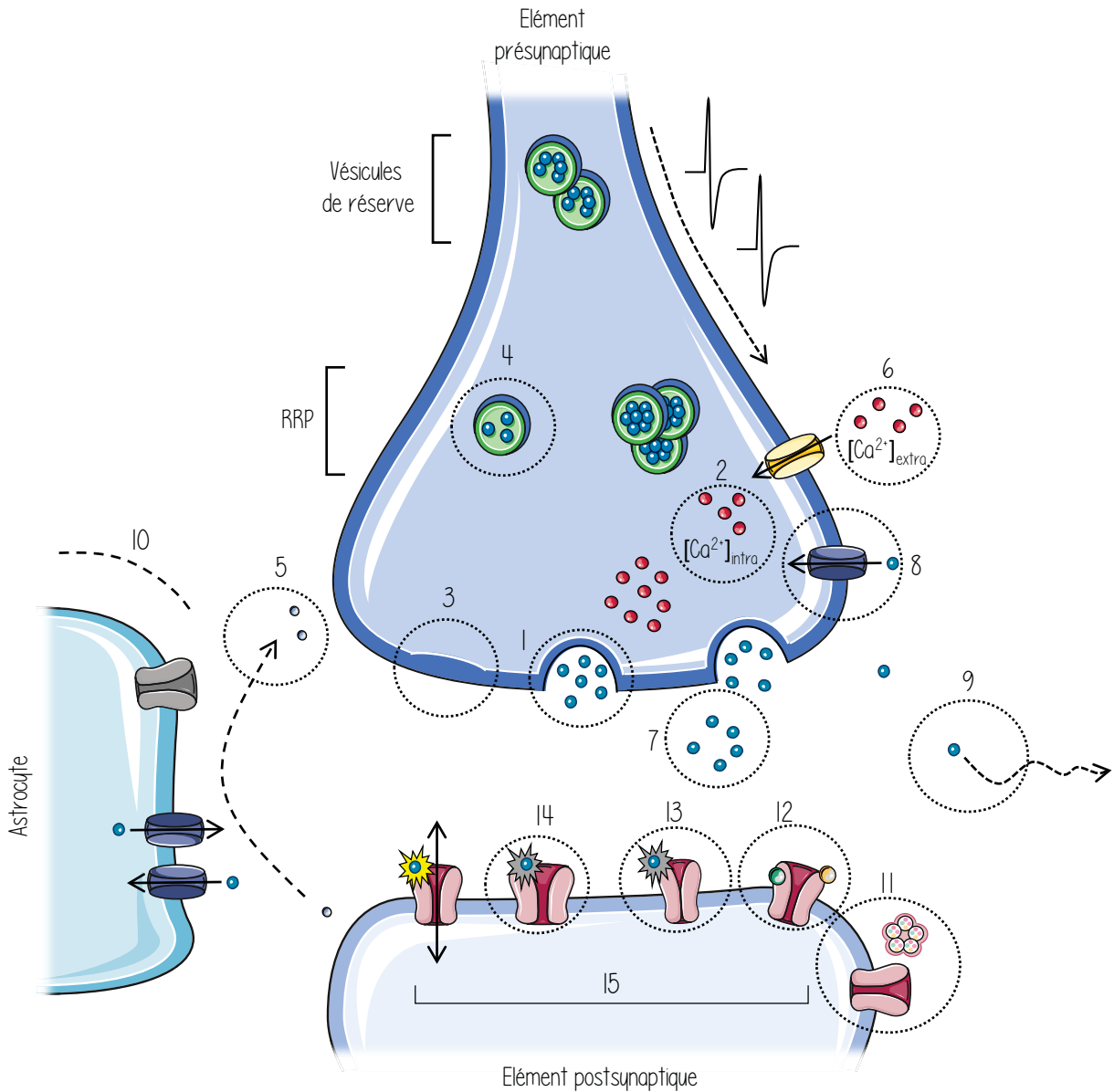
1. Probabilité de libération
2.  $[Ca^{2+}]_{intra}$
3. Nombre de sites de libération
4. Changement du RRP
5. Messagers rétrogrades

Fente synaptique

6.  $[Ca^{2+}]_{extra}$
7. Temps de séjour du neurotransmetteur dans la fente
8. Dégradation/recapture
9. Diffusion
10. Implication gliale

Elément postsynaptique

11. Composition en sous-unités des récepteurs
12. Modulateurs endo/exogènes
13. Désensibilisation des récepteur
14. Saturation des récepteurs
15. Distribution des récepteurs



**Figure 15 : Principaux mécanismes de la plasticité à court-terme**

Les mécanismes de plasticité à court-terme peuvent s'exercer sur **l'élément présynaptique (1-5)**, dans la **fente synaptique et les astrocytes (6-10)** ainsi que sur **l'élément postsynaptique (11-15)**.

C'est par exemple le cas à la synapse entre les fibres moussues issues des cellules en grains du Gyrus Denté et des cellules pyramidales de CA3 dans l'hippocampe. A cette synapse, le glutamate libéré par une première stimulation agit sur des autorécepteurs présynaptiques du kainate fortement perméables au calcium, ce qui conduit à une forte facilitation à court-terme de la libération synaptique de glutamate (Kamiya, 2002; Kamiya, Ozawa, & Manabe, 2002).

Par ailleurs, il a été montré dans l'hippocampe de souris que la protéine d'adhésion synaptique *ELFNI* (*extracellular leucine-rich repeat fibronectin containing 1*) pourrait agir en tant que régulateur de la transmission synaptique. En effet, chez des souris chez lesquelles le gène *ELFNI* est invalidé (souris KO), il y a une diminution de la facilitation accompagnée d'une augmentation de la probabilité de libération vésiculaire (Sylwestrak & Ghosh, 2012).

#### *Changements concernant les sites de libération*

Des augmentations ou des diminutions du nombre de sites de libération ont été suggérés comme étant impliqués dans les phénomènes de plasticité synaptique à court-terme. Il a été montré que la dépression pouvait être due à une **inactivation des sites de libération** [Figure 15]. Dans certains cas, malgré un ensemble de vésicules immédiatement libérables (**RRP**) suffisant, il semble que le nombre de vésicules fusionnant avec la membrane présynaptique soit diminué (Neher & Sakaba, 2008; von Gersdorff & Borst, 2002). Une étude chez l'Aplysie suggère que la ST-D n'est pas due à une diminution du nombre des vésicules prêtes à fusionner, ni à une diminution de la probabilité de libération, mais à la diminution d'une sous-population de sites de libération (Doussau, Humeau, Benfenati, & Poulain, 2010). D'autres modèles semblent impliquer une augmentation de la probabilité de libération du RRP, ainsi qu'une augmentation du nombre de sites de libération (McLachlan, 1978; Zucker, 1973).

A l'heure actuelle, plusieurs déterminants moléculaires impliqués dans la dépression à court-terme et le rétablissement de l'état basal sont connus. La suppression des protéines RIM ayant un rôle dans la fusion des vésicules, réduit la dépression à court-terme (Calakos, Schoch, Sudhof, & Malenka, 2004). Il a également été montré au niveau de la synapse entre les fibres moussues et les cellules en grain du cervelet, que la suppression la protéine Bassoon (une protéine de la zone active), amplifiait la dépression à court-terme lors de trains à haute-fréquence. Cette protéine est donc nécessaire au réapprovisionnement des sites de libération en vésicules synaptiques (Hallermann, Fejtova, et al., 2010).

### *Changement du nombre de vésicules immédiatement libérables*

Des études ont montré que la **diminution de la taille du RRP** est un des mécanismes de la ST-D [Figure 15]. Le nombre de vésicules dont la libération est synchronisée par l'arrivée d'un PA dépend de la taille du RRP ainsi que de la probabilité de libération de chacune des vésicules. L'amplitude de la dépression synaptique à court-terme augmente lorsque la fréquence de PA est élevée et que la probabilité de libération est forte. Si à l'arrivée du premier PA évoque la libération d'une forte proportion des vésicules synaptiques libérables du RRP, les réserves seront réduites lors de l'arrivée du second PA (Zucker & Regehr, 2002).

Ces mécanismes sont réversibles, il a d'ailleurs été montré que le temps de rétablissement de la dépression dépend du temps de remplissage du RRP par le pool de réserve et que celui-ci peut être accéléré par une augmentation du  $Ca^{2+}$  présynaptique de façon calmoduline-dépendante (Dittman & Regehr, 1998; Hallermann, Kittel, et al., 2010; Hosoi, Sakaba, & Neher, 2007; Sakaba, 2008; Sakaba & Neher, 2001; Yang & Xu-Friedman, 2008).

### *Les messagers rétrogrades*

A travers la libération de différents neuromodulateurs, l'élément postsynaptique est capable d'influencer la libération de neurotransmetteurs à partir de l'élément présynaptique. Par exemple, lors de la dépolarisation de l'élément postsynaptique, les dendrites sont capables de libérer des messagers rétrogrades qui, via notamment des récepteurs couplés aux protéines G localisés sur l'élément présynaptique, influencent la libération de neurotransmetteurs [Figure 15]. Différents messagers rétrogrades ont été identifiés, par exemple : la dopamine, la dynorphine, le glutamate, le GABA, le monoxyde d'azote, le **BDNF** (*brain-derived neurotrophic factor*) ainsi que l'ocytocine (Drake et al., 1994; Llano, Leresche, & Marty, 1991; Nagappan & Lu, 2005; Pitler & Alger, 1992; Zilberter, 2000; Zilberter, Kaiser, & Sakmann, 1999).

La suppression de l'inhibition ou de l'excitation induites par la dépolarisation (la **DSI** pour *depolarization-induced suppression of inhibition* et la **DSE** pour *depolarization-induced suppression of excitation*) sont des formes de STP impliquant des messagers rétrogrades. La DSI a été identifiée dans les cellules de Purkinje (Llano et al., 1991; Vincent, Armstrong, & Marty, 1992) et les cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe (Pitler & Alger, 1992, 1994). Après la dépolarisation du neurone postsynaptique, la transmission synaptique

inhibitrice GABAergique est transitoirement diminuée. Plusieurs messagers rétrogrades seraient impliqués dont le glutamate (Glitsch, Llano, & Marty, 1996) ainsi que les cannabinoïdes endogènes. En effet, les endocannabinoïdes, libérés de manière calcium dépendante, par le neurone dépolarisé se lient aux récepteurs cannabinoïdes de type 1 (**CB1**) présynaptiques qui réduisent la libération de neurotransmetteurs (Diana, Levenes, Mackie, & Marty, 2002).

**b. Les mécanismes de plasticité à court-terme mettant en jeu d'autres éléments que l'élément présynaptique**

*Mécanisme de plasticité à court-terme ayant lieu dans la fente synaptique*

Les mécanismes de plasticité à court-terme dépendent du **temps de séjour** des neurotransmetteurs dans la fente synaptique ainsi que de la possibilité de débordement du neurotransmetteur hors de la synapse et du recrutement de récepteurs localisés à distance des sites de libération [Figure 15]. En effet, plus les neurotransmetteurs restent longtemps dans l'espace extracellulaire plus ils sont susceptibles d'activer des récepteurs localisés à distance. Le temps de séjour des neurotransmetteurs dans la fente synaptique dépend de la **recapture** et de la **dégradation** éventuelle des neurotransmetteurs dans la fente synaptique. La **diffusion** des neurotransmetteurs dépend des contraintes et de la viscosité du milieu extracellulaire de la fente synaptique. Elle dépend également de la géométrie de la synapse tripartite, de l'espace extra synaptique ainsi que de la localisation des récepteurs et des transporteurs. Par exemple, dans les neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe, les GAT situés sur les synapses avoisinantes peuvent contrôler la cinétique de désactivation des CPSI via la recapture de GABA à distance (Engel et al., 1998).

*Implication de la glie dans la plasticité à court-terme*

Formant avec l'élément présynaptique et postsynaptique la synapse tripartite, les astrocytes sont bien placés pour être des acteurs de la STP [Figure 15]. Plusieurs études suggèrent leur implication dans certaines formes de STP (Araque, Carmignoto, & Haydon, 2001; Haydon, 2001; Xu-Friedman & Regehr, 2004). Ils peuvent en effet influencer sur le temps de séjour des neurotransmetteurs dans la fente synaptique (voir paragraphe précédent). Les astrocytes peuvent également détecter des messagers extracellulaires et libérer des substances qui peuvent

à leur tour affecter directement l'efficacité synaptique (Araque et al., 2001; Haydon, 2001). C'est par exemple le cas pour des astrocytes de la région CA1 de l'hippocampe qui participent à la plasticité à court-terme des synapses entre des interneurons inhibiteurs et les cellules pyramidales CA1. Dans les astrocytes, l'activation des récepteurs GABA<sub>B</sub> entraîne une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  et une libération de glutamate par ces cellules. Le glutamate agit présynaptiquement et postsynaptiquement sur les terminaisons GABAergiques via les récepteurs ionotropiques du glutamate AMPA/KAINATE et/ou NMDA (N-méthyl-D-aspartate) ce qui augmente la fréquence et l'amplitude des CPSIs GABAergiques (Kang, Jiang, Goldman, & Nedergaard, 1998).

### *Mécanisme de plasticité à court-terme ayant lieu dans le neurone postsynaptique*

#### Les propriétés fonctionnelles des récepteurs postsynaptiques

L'une des propriétés importantes est l'affinité des récepteurs pour les neurotransmetteurs et leurs différents modulateurs. Par exemple, pour le GABA, une synapse GABAergique avec des récepteurs à haute affinité saturera plus vite ce qui aura un impact sur la STP (voir ci-dessous)

#### Désensibilisation et saturation des récepteurs postsynaptiques

**La désensibilisation** des récepteurs est un mécanisme postsynaptique important de STP [Figure 15]. Ceci est particulièrement le cas pour les synapses excitatrices, les récepteurs AMPA se désensibilisant très rapidement. Ainsi, à de nombreuses synapses glutamatergiques, une première activation de la synapse désensibilise des récepteurs AMPA dont une proportion peut encore être désensibilisée lors de stimulations ultérieures. Ceci a été mis en évidence en utilisant du cyclothiazide, un modulateur allostérique des récepteurs AMPA qui inhibe leur désensibilisation (DiGregorio, Rothman, Nielsen, & Silver, 2007; Yamada & Tang, 1993). La diffusion latérale des récepteurs AMPA non désensibilisés compense partiellement ce phénomène (Heine et al., 2008).

En plus de la désensibilisation, la saturation des récepteurs représente un des mécanismes de ST-D [Figure 15]. Ceci a par exemple été montré dans une synapse dans le corps géniculé latéral du thalamus. Lorsque cette synapse est stimulée à haute fréquence, les récepteurs AMPA

désensibilisent tandis que les récepteurs NMDA saturent, ce qui conduit à la dépression à court-terme de cette transmission (C. Chen, Blitz, & Regehr, 2002).

En plus de la saturation, la désensibilisation des récepteurs est également un des mécanismes de STP pour les synapses excitatrices. Cependant, l'implication de la désensibilisation des récepteurs GABA dans des mécanismes de plasticité synaptique à court-terme n'a à notre connaissance pas encore été clairement démontrée.

### c. Plasticité à court-terme cibles-spécifiques

Lorsque la plasticité exprimée par l'élément présynaptique dépend du type d'élément postsynaptique contacté, celle-ci est désignée sous le terme de « plasticité dépendante de la cible » (*target-specific plasticity*). Dans le cervelet, Bao, Reim, and Sakaba (2010) ont identifié plusieurs connexions au profil de STP dépendant de l'élément postsynaptique (Bao et al., 2010). Ainsi, la synapse entre les fibres parallèles et les cellules de Purkinje présente une facilitation à court-terme, de même pour la synapse entre les fibres parallèles et les cellules étoilées (interneurone inhibiteur) alors que la synapse entre les fibres parallèles et les cellules en panier (autre interneurone inhibiteur) présente une dépression à court-terme (Bao et al., 2010). Il a également été montré que la transmission synaptique entre les cellules de Purkinje et les cellules de Martinotti facilitait alors que celle entre les cellules de Purkinje et les cellules en panier, déprimait (Beierlein, Gibson, & Connors, 2003; Markram et al., 1998).

Plusieurs molécules pourraient être impliquées dans ces mécanismes de signalisation rétrograde spécifique du neurone cible postsynaptique. Il semblerait que des **molécules d'adhésion** soient d'ailleurs impliquées dans la régulation rétrograde de l'élément présynaptique (Kreitzer & Regehr, 2002). Parmi ces molécules, on trouve les **cadhérines** (molécules d'adhésion synaptiques impliquées dans la formation de la synapse), les **neurexines** (exprimées à la surface d'éléments présynaptiques), et les **neuroligines** (exprimées par l'élément postsynaptique) (Dean & Dresbach, 2006).

Les cadhérines établissent l'interaction trans-synaptique via des liaisons cadhérines-cadhérines et modulent sur la probabilité de libération de neurotransmetteurs. Par exemple, dans des cultures de neurones d'hippocampe de souris, le blocage des cadhérines est accompagné d'une diminution du recyclage des vésicules synaptiques et d'une diminution de la probabilité de libération. Cette transition est due à une diminution du RRP et à une altération du recrutement

d'un groupe de vésicules immédiatement libérables, le **RRVP** (pour *ready released vesicle pool*) (Vitureira, Letellier, & Goda, 2012). Les neurologines quant à elles, interagissent avec les neurexines pour moduler les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendants (Dean & Dresbach, 2006) et la probabilité de libération des vésicules via le contrôle de la taille des pools de vésicules et la sensibilité de ces vésicules à la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intra}}$ .

En plus des protéines d'adhésion, des protéines d'échafaudage (Sank 1 et Homer) semblent également jouer un rôle dans les plasticités dépendantes du neurone postsynaptique. Par exemple, leur surexpression peut augmenter la taille du pool de vésicules (Sala et al., 2001).

**En conclusion** : Les mécanismes de ST-F et de ST-D de la transmission synaptique inhibitrice et excitatrice sont généralement **d'origine présynaptique**, impliquant des changements de **probabilité de libération**, de **sites de libération** ou encore du **RRP**. L'intervention de **messagers rétrogrades** peut également participer ou influencer la STP. La disponibilité, la phosphorylation et la désensibilisation des **récepteurs postsynaptiques** jouent également un rôle important dans la STP. Pour les synapses inhibitrices, la STP peut également faire intervenir des modifications rapides du gradient des ions  $\text{Cl}^-$ . Ces différents mécanismes peuvent **coexister** (Anwar, Li, Bucher, & Nadim, 2017) et une même synapse peut présenter des dépressions ou des facilitations selon le type d'activité et notamment selon la fréquence de stimulation.

## B. Implication des récepteurs $\text{GABA}_B$ dans la plasticité à court-terme

### 1. Généralités concernant les récepteurs $\text{GABA}_B$

Découverts en 1980 par Norman Bowery et ses collaborateurs (N. G. Bowery, Hill, & Hudson, 1983) les récepteurs  $\text{GABA}_B$  sont des récepteurs métabotropiques du GABA. Ils sont largement répartis dans le système nerveux central et notamment dans la CDME et permettent une inhibition prolongée qui contrôle l'excitation et ils sont également des acteurs importants de la plasticité synaptique (Ulrich & Bettler, 2007).



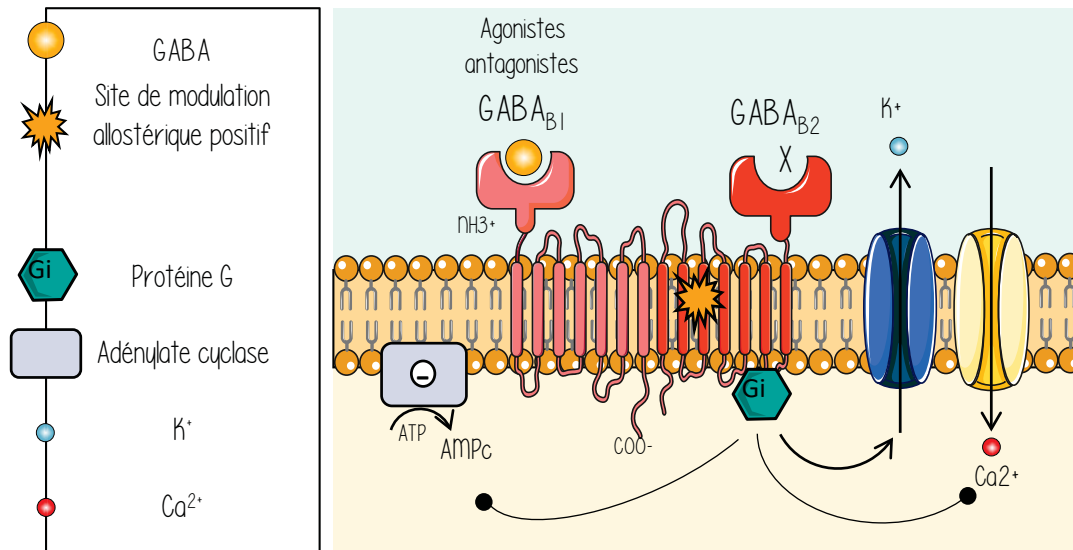
Les récepteurs GABA<sub>B</sub> agissent en tant que récepteurs inhibiteurs présynaptiques à la fois des terminaisons neuronales GABAergiques et non-GABAergiques dans le système nerveux central et périphérique. Ce sont des hétérodimères constitués de 2 sous-unités : une sous-unité GABA<sub>B1</sub> (**GB1**) et une sous-unité GABA<sub>B2</sub> (**GB2**). L'expression de ces deux sous-unités est nécessaire pour que le récepteur soit fonctionnel (Galvez et al., 2000; Marshall, Jones, Kaupmann, & Bettler, 1999) **[Figure 16, A]**.

Dans la plupart des cas, les récepteurs GABA<sub>B</sub> synaptiques ne sont pas localisés à proximité des zones actives de libération de neurotransmetteurs. Pour cette raison, il est souvent considéré que ces récepteurs ne sont pas activés directement par la libération synaptique de GABA (Lujan & Shigemoto, 2006; Lujan, Shigemoto, Kulik, & Juiz, 2004). Mais dans certains cas, notamment dans la CDME, ils peuvent être activés par le GABA libéré et agir en tant qu'autorécepteurs (Chery & De Koninck, 2000; Hugel & Schlichter, 2003). L'activation des récepteurs GABA<sub>B</sub> peut également résulter d'une activité neuronale intense (dans le cas de débordement de GABA libéré synaptiquement) (Scanziani, 2000). Cependant, les récepteurs GABA<sub>B</sub> peuvent également être activés par du GABA libéré de manière activité dépendante par des dendrites ou par la glie (Velez-Fort, Audinat, & Angulo, 2012; Zilberter et al., 1999). Il a également été montré que la concentration de GABA ambiant était suffisante pour induire une faible activation tonique des récepteurs GABA<sub>B</sub>, permettant ainsi un rétrocontrôle de la libération de GABA (Laviv et al., 2010).

Les récepteurs GABA<sub>B</sub> peuvent se trouver sur l'élément présynaptique et postsynaptique et ce, sur des neurones inhibiteurs comme excitateurs (Benke, Zemoura, & Maier, 2012) à la fois dans les zones synaptiques et extra-synaptiques (Boyes & Bolam, 2003).

Le rôle modulateur de ces récepteurs dans la transmission synaptique a été mis en évidence par Dutar et Nicoll en 1988 dans l'Hippocampe de rat (Dutar & Nicoll, 1988). Lorsqu'ils sont situés sur l'élément présynaptique, les récepteurs GABA<sub>B</sub> ont pour effet principal d'inhiber la libération vésiculaire de neurotransmetteurs en inhibant l'activité de canaux du Ca<sup>2+</sup> sensibles au potentiel (Pinard, Seddik, & Bettler, 2010), mais l'activation de ces récepteurs entraîne également une diminution de l'activité de l'adénylate cyclase, ces effets mettant en jeu des protéines-G de type G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub> (C. Chen et al., 2002). Lorsque les récepteurs GABA<sub>B</sub> sont placés sur le corps cellulaire, ces récepteurs entraînent une hyperpolarisation en activant des conductances aux ions K<sup>+</sup>.

A.



B.

Localisation	En condition neuropathique	En condition inflammatoire
Sur les neurones (LI-III) et les astrocytes	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dissociation de GABA<sub>B1</sub> et GABA<sub>B2</sub></li> <li>Diminution de l'expression des sous-unités dans les fibres afférentes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diminution du nombre de neurones exprimant les récepteurs GABA<sub>B</sub></li> </ul>
Agoniste : Antinociceptif Antagoniste : Pronociceptif		

**Figure 16 : Structure et caractéristiques principales des récepteurs GABA<sub>B</sub>**

**A. Structure des récepteurs GABA<sub>B</sub>** : Les récepteurs GABA<sub>B</sub> sont des hétérodimères constitués de 2 sous-unités : une sous-unité GABA<sub>B1</sub> et une sous-unité GABA<sub>B2</sub>. Dans les neurones, ils sont généralement couplés aux protéines G<sub>i</sub>. L'activation des récepteurs GABA<sub>B</sub> entraîne une inhibition de l'adénylate cyclase, l'activation de canaux K<sup>+</sup>, et l'inhibition de canaux Ca<sup>2+</sup> dépendants du potentiel.

**B. Caractéristiques principales des récepteurs GABA<sub>B</sub>** : Les récepteurs GABA<sub>B</sub> sont présents principalement sur les neurones des laminae I-III et sur les astrocytes de CDME. Les agonistes des récepteurs GABA<sub>B</sub> ont des effets antinociceptifs chez les rongeurs alors que les antagonistes ont des effets pronociceptifs. En condition neuropathique, ces récepteurs se dédimérisent et leur expression par les fibres afférentes diminue. En condition inflammatoire, le nombre de neurones exprimant les récepteurs GABA<sub>B</sub> diminue.

Les récepteurs GABA<sub>B</sub> sont également exprimés par des cellules non neuronales du système nerveux. En effet, les sous-unités GABA<sub>B1a</sub>, GABA<sub>B1b</sub> et GABA<sub>B2</sub> ont été détectées dans les astrocytes et la microglie chez le rat (Charles, Deuchars, Davies, & Pangalos, 2003). Alors que dans les neurones, l'activation des récepteurs GABA<sub>B</sub> entraîne une diminution du  $[Ca^{2+}]_{intra}$  via leur couplage aux protéines G<sub>i/o</sub>, leur couplage pourrait être différent dans la glie. Ceci est suggéré par plusieurs études indiquant que l'activation des récepteurs GABA<sub>B</sub> des astrocytes induit une augmentation de calcium intracellulaire (Kang et al., 1998; Nilsson, Eriksson, Ronnback, & Hansson, 1993). Par ailleurs, le GABA libéré par la glie peut agir sur les récepteurs GABA<sub>B</sub> présynaptiques et diminuer la probabilité de libération de neurotransmetteurs (Kaneda & Kita, 2005). Les récepteurs GABA<sub>B</sub> sont donc impliqués dans les interactions neurones/glie.

Les paragraphes qui suivent détailleront la fonction de ces récepteurs dans la CDME et leur rôle crucial dans le traitement des informations nociceptives [voir aussi [Figure 16, B](#)].

🔍 Pour en savoir plus voir Malcangio 2018

## 2. Les récepteurs GABA<sub>B</sub> dans la CDME

### a. Localisation cellulaire des récepteurs GABA<sub>B</sub> dans la corne dorsale

Contrairement aux récepteurs GABA<sub>A</sub>, qui sont présents dans toute la substance grise de la moelle épinière, les récepteurs GABA<sub>B</sub> semblent plutôt localisés dans les laminae les plus superficielles (I-III) chez le rat (G. W. Price, Wilkin, Turnbull, & Bowery, 1984) et plus particulièrement dans la **lamina II** (Malcangio, Da Silva, & Bowery, 1993; Waldvogel et al., 1990). Dans ces laminae, ces récepteurs sont localisés sur les terminaisons des fibres afférentes ainsi que sur des neurones de la corne dorsale (Calver et al., 2000).

Curieusement, dans des conditions neuropathiques, la « dé-dimérisation » des récepteurs GABA<sub>B</sub> est associée à une sur-expression de 14-3-3 $\zeta$ , une protéine de liaison de la sous-unité GABA<sub>B1</sub> dans la CDME (Laffray et al., 2012).

#### *Dans les neurones*

Dans la lamina I, les récepteurs GABA<sub>B</sub> sont exprimés dans des neurones possédant les caractéristiques de neurones de projections (Castro, Pinto, Lima, & Tavares, 2004). Dans les

laminae les plus superficielles de la corne dorsale, l'immunoréactivité des récepteurs GABA<sub>B</sub> est observée dans les neurones exprimant c-fos en réponse à l'application d'un stimulus mécanique nocif sur la peau ainsi que dans ceux n'exprimant pas c-fos (Castro et al., 2004).

L'expression des récepteurs GABA<sub>B</sub> est régulée en fonction des conditions physiologiques et pathologiques. Par exemple, le nombre de neurones immunoréactifs aux sous-unités des récepteurs GABA<sub>B</sub> est réduit dans la lamina I de rats monoarthritiques (Castro, Pinto, Lima, & Tavares, 2005). De plus, dans un modèle de neuropathie induite par la ligature de nerfs, les sous-unités des récepteurs GABA<sub>B</sub> sont sous-exprimées dans les neurones sensoriels (Engle, Merrill, Marquez De Prado, & Hammond, 2012). Il a également été montré que la stimulation chronique des fibres afférentes pouvait dissocier les hétérodimères GABA<sub>B</sub> dans ces neurones (Engle et al., 2012).

Associés à la diminution de l'expression des récepteurs GABA<sub>B</sub>, ces mécanismes peuvent expliquer la réduction de contrôles fonctionnels exercés par les récepteurs GABA<sub>B</sub> observée dans les afférences primaires alors que leur fonction n'est pas altérée dans les interneurons inhibiteurs de rats porteurs d'une neuropathie diabétique (Laffray et al., 2012; Wang, Zhang, Chen, & Pan, 2007; Wang et al., 2011).

#### *Dans les astrocytes et les cellules microgliales*

Les récepteurs GABA<sub>B</sub> sont également exprimés **dans les astrocytes** de la moelle épinière. Dans des cultures primaires d'astrocytes préparées à partir de moelle épinière d'embryons de rat, des agonistes GABA<sub>B</sub> induisent une hyperpolarisation de la majorité des astrocytes (Hosli & Hosli, 1990 ; Hosli et al., 1990).

L'expression et le rôle de récepteurs GABA<sub>B</sub> dans les cellules microgliales ont été explorés sur de la microglie néocorticale (Kuhn et al., 2004). L'immunoréactivité des récepteurs GABA<sub>B</sub> est détectée dans les cellules microgliales néocorticales de rat ainsi que dans des cultures. Dans ces dernières, l'activation des récepteurs GABA<sub>B</sub> ouvre une conductance K<sup>+</sup> et augmente transitoirement le Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (Kuhn et al., 2004). Dans les cellules microgliales en culture, la libération d'interleukines induite par les lipopolysaccharides (**LPS**) est diminuée lorsque les récepteurs GABA<sub>B</sub> sont activés (Kuhn et al., 2004).

## **b. Rôle des récepteurs GABA<sub>B</sub> de la corne dorsale dans la nociception**

Les récepteurs GABA<sub>B</sub> semblent jouer un rôle crucial dans le traitement des informations nociceptives. En effet, il a été montré que le blocage des récepteurs GABA<sub>B</sub> entraînait des vocalisations chez les rongeurs lors de l'application de stimuli mécaniques non douloureux (Hao, Xu, & Wiesenfeld-Hallin, 1994). De plus, l'application d'agonistes des récepteurs GABA<sub>B</sub> chez la souris et le rat entraîne une analgésie et un effet anti-hyperalgésique dans des modèles de douleur aiguë et chronique (Sawynok & LaBella, 1982; Wilson & Yaksh, 1978)

Le rôle des récepteurs GABA<sub>B</sub> dans le traitement des informations nociceptives a été évalué par l'application d'agonistes de ces récepteurs, le baclofène étant le plus utilisé. Les premiers travaux ont montré que le baclofène avait des effets analgésiques en plus que sur la spasticité musculaire chez le rat (voir par exemple Cutting and Jordan (1975)). Cette action analgésique du baclofène observée chez le rat implique au moins un effet sur les récepteurs de la CDME (Thomas, Navarrete, Graham, McGowan, & Hammond, 1996). Le baclofène, traversant la barrière hémato-encéphalique, plusieurs méthodes d'administration sont possibles (Bowery, 2006). Cependant, la capacité de cette substance à traverser cette barrière est faible et requiert pour une administration systémique des concentrations élevées qui sont susceptibles d'induire des effets secondaires comme des nausées, vomissement ou sédation (Brennan & Whittle, 2008; Stempien & Tsai, 2000). L'injection intrathécale de baclofène à des concentrations dépourvues d'effet sur le système moteur augmente le temps de latence de retrait dans le test de la plaque chaude chez des rats (Hammond & Drower, 1984; Wilson & Yaksh, 1978). Le baclofène présente également un effet analgésique chez le macaque (Yaksh & Reddy, 1981). Curieusement, les récepteurs GABA<sub>B</sub> semblent être impliqués dans l'analgésie muscarinique. En effet, l'injection intrathécale d'antagonistes des récepteurs GABA<sub>B</sub> empêche l'action analgésique muscarinique (Chen & Pan, 2003; Li et al., 2002). De plus, le baclofène réduit la libération de glutamate, de SP ainsi que de CGRP, tous les trois étant impliqués dans la transmission d'informations nociceptives (Sawynok, 1987).

Chez l'humain, le baclofène n'a pas d'effet analgésique, sauf pour des cas particuliers comme pour des douleurs liées à des lésions de la moelle épinière (Malcangio, Libri, Teoh, Constanti, & Bowery, 1995). Il a également été montré que l'hypoalgésie induite chez les souris par la stimulation des fibres afférentes A $\delta$  impliquait l'activation de récepteurs GABA<sub>B</sub> exprimés à la terminaison des fibres afférentes de type C. En effet, la suppression de l'activation de la

sous-unité GABA<sub>B1a</sub> dans les fibres afférentes entraîne une diminution de cette hypoalgésie, témoignant de leur implication (Jones, Sweitzer, Peters, Wilson, & Yeomans, 2005; Melin, Jacquot, Dallel, & Artola, 2013).

Schuler et Luscher ont montré en 2001 que les souris dépourvues de récepteurs GABA<sub>B</sub> présentent une hyperalgésie aux stimuli nocifs chauds ainsi que des seuils de retrait plus bas lors de l'application d'une pression mécanique (Schuler et al., 2001). Ces résultats sont cohérents avec l'effet antinociceptif des agonistes GABA<sub>B</sub> et suggèrent que ces récepteurs sont sous une activation tonique (voir plus bas).

#### *En condition inflammatoire*

Plusieurs équipes ont étudié l'impact analgésique des agonistes des récepteurs GABA<sub>B</sub> lors d'états inflammatoires. La plupart de ces travaux montrent une perte de l'effet analgésique des agonistes de ces récepteurs en condition inflammatoire induite par injection de CFA chez des rats (Patel et al., 2001 ; Smith et al., 1994). Cependant, une étude a rapporté un effet analgésique d'injections intrathécales de baclofène lors de la phase I et II du test à la formaline chez le rats (Kataoka, Hara, Haranishi, Terada, & Sata, 2013). Cette divergence d'effet pourrait être due aux effets moteurs du baclofène. En effet, les effets moteurs apparaissent à des concentrations proches de celles n'étant qu'antihyperalgésiques dans des modèles de douleurs neuropathiques (ceci est suggéré dans (Patel et al., 2001)).

Par ailleurs, les récepteurs GABA<sub>B</sub> peuvent être activés dans certains modèles de douleur inflammatoire, ce qui pourrait masquer les effets des agonistes exogènes de ces récepteurs (voir ci-dessous). En effet, les concentrations de GABA augmentent dans les homogénats de CDME de rongeurs chez lesquels une inflammation a été provoquée par injection de CFA dans la patte (Castro-Lopes, Tavares, Tolle, Coito, & Coimbra, 1992).

La fonction des récepteurs GABA<sub>B</sub> dans la CDME semble donc modifiée en conditions inflammatoire, ce qui pourrait contribuer aux changements de traitement des informations nociceptives par les réseaux de cette structure lors d'une inflammation périphérique.

### *En condition neuropathique*

Des injections intrathécales d'agonistes des récepteurs GABA<sub>B</sub> reversent l'hyperalgésie mécanique dans des modèles de douleur neuropathique chez le rat (Hwang & Yaksh, 1997 ; Malan et al., 2002 ; Patel et al., 2001 ; Smith et al., 1994).

Les récepteurs GABA<sub>B</sub> de la CDME sont également impliqués dans l'analgésie induite par un inhibiteur des GAT-3 chez des rats neuropathiques (Kataoka et al., 2013). Dans un modèle de neuropathie diabétique chez le rat, l'activation des récepteurs GABA<sub>B</sub> reverse l'hyperalgésie mécanique et thermique, et réduit l'expression du récepteur TLR4 (*Toll-Like Receptor 4*) qui est impliqué dans le développement de neuropathies diabétiques (pendant lesquelles l'expression des récepteurs GABA<sub>B</sub> est réduite, voir ci-dessous) (P. Liu et al., 2018).

L'injection intrathécale de baclofène est également analgésique sur d'autres types de douleurs, telles que des douleurs osseuses associées au cancer (Zhou et al., 2017) ou des douleurs associées à une dyspepsie fonctionnelle (Liu et al., 2011).

Dans la corne dorsale, une sous-expression des récepteurs GABA<sub>B</sub> est observée dans des cas de douleurs neuropathiques diabétiques (Wang et al., 2011)

Les récepteurs GABA<sub>B</sub> semblent donc également impliqués dans les changements de transmission synaptique observés en conditions de douleurs neuropathiques.

**En conclusion** : Les récepteurs GABA<sub>B</sub> sont fortement exprimés dans les neurones et la glie de la lamina II de CDME. Le blocage de ces récepteurs entraîne des comportements douloureux chez le rongeur témoignant de leur **rôle fondamental** dans le traitement des informations nociceptives. En **condition inflammatoire**, l'administration d'agonistes des récepteurs GABA<sub>B</sub> n'a généralement **pas d'effet analgésique**. En **condition neuropathique**, ces récepteurs sont sous-exprimés, et les agonistes des récepteurs GABA<sub>B</sub> ont **un effet analgésique**.

Ces récepteurs dont la contribution semble modifiée en conditions inflammatoire et neuropathique ont également un rôle important dans la plasticité à court-terme de la transmission synaptique entre les neurones de la CDME. Ce point a été détaillé dans la Partie III correspondant au manuscrit d'une revue non encore publiée (Revue 1).

## C. Implication des récepteurs de l'adénosine dans la plasticité à court-terme

### 1. Généralité sur l'adénosine et ses récepteurs

#### a. L'adénosine

L'adénosine est un des neuromodulateurs les plus répandus dans le cerveau. Son origine dans l'espace extracellulaire vient des dégradations successives de l'**ATP** (adénosine-5'-triphosphate) (lui-même libéré par les neurones et les cellules gliales), de l'**ADP** (adénosine-5'-diphosphate) et de l'**AMP** (adénosine-5'-monophosphate) extracellulaires. Ces déphosphorylations de l'ATP sont produites par des ectonucléotidases (Dunwiddie, Diao, Kim, Jiang, & Jacobson, 1997; Zimmermann, Zhou, & Taussig, 1998). Cependant, il a été montré que les neurones et les cellules gliales étaient également capables de libérer directement de l'adénosine (Wall & Dale, 2008). La présence d'adénosine dans le milieu extracellulaire est indirectement liée à l'activité synaptique puisque les vésicules synaptiques contiennent de l'ATP qui est rapidement métabolisée en adénosine après libération.

#### b. Les récepteurs de l'adénosine

Cette partie de l'introduction traitera principalement des caractéristiques et le rôle du récepteur **A1** qui est impliqué dans des modulations que j'ai étudiées durant ma thèse. Une revue relative aux récepteurs **A2** et **A3** est disponible (Stone, Ceruti, & Abbracchio, 2009).

Les récepteurs A1, A2 et A3 sont des récepteurs membranaires couplés aux protéines G et spécifiques de l'adénosine.

Les récepteurs A1 sont couplés aux protéines Gi. Ils sont présents chez quasiment tous les mammifères y compris chez l'humain, et s'expriment à la surface des neurones et de la glie (Fiebich et al., 1996; Goodman & Synder, 1982; K. S. Lee & Reddington, 1986; Ochiishi, Chen, et al., 1999; Ochiishi, Saitoh, et al., 1999; Rivkees, Price, & Zhou, 1995). Il s'agit du récepteur de l'adénosine le plus retrouvé dans le cerveau (Dunwiddie & Masino, 2001). Les récepteurs A1 sont très présents dans les laminae superficielles de la CDME (Choca, Green, & Proudfit, 1988a; Geiger, LaBella, & Nagy, 1984). Ces récepteurs peuvent être exprimés sur les éléments présynaptiques et sur le corps cellulaire et/ou les dendrites des neurones (Ochiishi, Chen, et al., 1999; Ochiishi, Saitoh, et al., 1999).



Lors de l'activation des récepteurs A1, la sous unité  $\alpha$  des protéines  $G_i$  inhibe l'adénylate cyclase qui catalyse la production d'**AMPc** (adénosine monophosphate cyclique) intracellulaire à partir de l'ATP [Figure 17, A].

En général, l'activation de ces récepteurs entraîne une diminution de la libération de neurotransmetteurs (glutamate : Butcher, Bullock, Graham, and McCulloch (1990) acetylcholine : Brown, James, Reddington, and Richardson (1990); dopamine (Michaelis, Michaelis, & Myers, 1979)) suite à la réduction de l'influx  $Ca^{2+}$  en réponse à l'arrivée du PA (Wu & Saggau, 1997). Néanmoins, dans certains cas, les récepteurs A1 de l'adénosine peuvent être couplés à la protéine  $G_q$  dont la sous-unité  $\alpha$  entraîne l'activation de la phospholipase C permettant le clivage du **PIP2** (phosphatidylinositol-4,5-diphosphate) en **IP3** (inositol triphosphate). La conséquence de cette activation est la libération de  $Ca^{2+}$  à partir du réticulum endoplasmique.

Les effets de l'adénosine peuvent être pro- ou antinociceptifs. Ceci dépend du modèle et des récepteurs impliqués [Figure 17, B]. Il a été montré que des niveaux élevés d'adénosine endogène pouvaient altérer la transmission des informations nociceptives en agissant au niveau spinal, supra-spinal et en périphérie (mentionné sans citation dans Vincenzi, Pasquini, Borea, and Varani (2020)). Les agonistes des récepteurs A1 semblent avoir un effet antinociceptif sur les douleurs aiguës, neuropathique, inflammatoire, viscérale et post-opératoire (Vincenzi et al., 2020).

## 2. Les récepteurs de l'adénosine dans la CDME

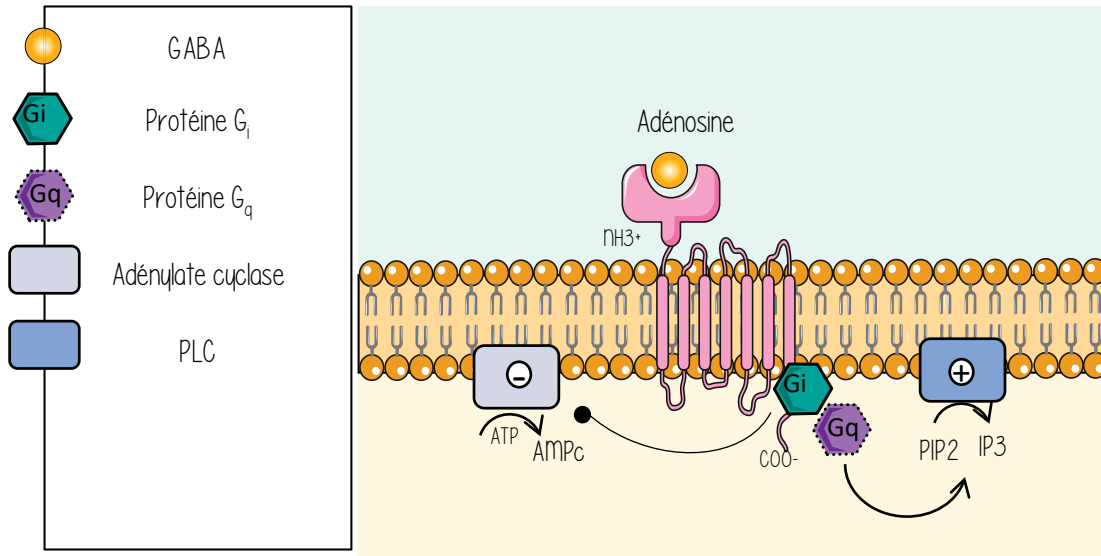
### a. Localisation cellulaire des récepteurs de l'adénosine dans la CDME

#### *Dans les neurones*

Les récepteurs A1 sont exprimés par les neurones de la CDME (Choca, Green, & Proudfit, 1988b) (Guntz et al., 2008) et particulièrement par ceux localisés dans les couches superficielles (Choca et al., 1988a; Geiger et al., 1984), ainsi que par les fibres afférentes primaires (Coppi et al., 2019).

#### *Dans les astrocytes et la microglie*

A.



B.

Localisation	En condition neuropathique	En condition inflammatoire
Sur les neurones de la CDME superficielle et les cellules gliales	<ul style="list-style-type: none"> <li>L'application d'un modulateur allostérique positif des récepteurs A1 a un effet analgésique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>L'activation des récepteurs A1 diminue le nombre de marqueurs d'activation astrocytaire</li> </ul>
Agoniste : Antinociceptif Antagoniste : Pronociceptif		

**Figure 17 : Structure des récepteurs A1 de l'adénosine et caractéristiques principales des récepteurs A1**

**A. Structure des récepteurs A1 :** Les récepteurs **A1** sont des récepteurs couplés à la **protéine Gi** ou **Gq**. Couplés à la **protéine Gq**, ces récepteurs activent la **PKC** permettant le clivage du **PIP2** (phosphatidylinositol-4,5-diphosphate) en **IP3** (inositol triphosphate) entraînant la libération de  $Ca^{2+}$  du réticulum endoplasmique. Couplés à la **protéine Gi**, ils inhibent l'**adénylate cyclase** catalysant la production d'**AMPc** intracellulaire à partir de l'**ATP**. **B. Caractéristiques principales des récepteurs A1 :** Les récepteurs **A1** sont présents sur les neurones de la CDME superficielle et sur les cellules gliales. Les **agonistes** des récepteurs **A1** ont des effets **antinociceptifs** chez les rongeurs alors que les **antagonistes** ont des effets **pronociceptifs**. En condition neuropathique, l'application d'un modulateur allostérique positif des récepteurs **A1** présente un effet analgésique impliquant un niveau basal d'adénosine élevé dans le milieu extracellulaire de la moelle épinière. En condition inflammatoire, l'activation des récepteurs **A1** diminue le nombre de marqueurs d'activation des astrocytes.

Dans la CDME et plus largement dans le système nerveux central, les cellules gliales semblent exprimer tous les types de récepteurs de l'adénosine (Gessi et al., 2013; Janes et al., 2015; Peakman & Hill, 1994; Popoli & Peponi, 2012; van Calker, Muller, & Hamprecht, 1979).

🔍 Pour en savoir plus sur les récepteurs à l'adénosine dans les astrocytes et la microglie, voir Fields et Burnstock 2006).

### **b. Rôle des récepteurs de l'adénosine dans la CDME et dans la nociception**

L'effet antinociceptif de l'adénosine semble impliquer majoritairement l'activation des récepteurs A1 (Varani, Vincenzi, Merighi, Gessi, & Borea, 2017) et l'efficacité de plusieurs agonistes ou modulateurs allostériques de ces récepteurs a été démontré dans plusieurs modèles animaux de différents types de douleur (Vincenzi et al., 2020). Ces résultats sont également soutenus par le fait que l'administration d'antagonistes des récepteurs A1 (le **DPCXP** - 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine) reverse l'effet antinociceptif du paracétamol et du tramadol lors du test de la formaline (J. Liu, Reid, & Sawynok, 2013).

De plus, l'adénosine augmente les seuils nociceptifs via l'activation des récepteurs A1 de la CDME (Borghi et al., 2002; Nascimento et al., 2010) et chez les souris dépourvues de récepteurs A1, les réponses nociceptives sont exacerbées (W. P. Wu et al., 2005). Par ailleurs, l'activation des récepteurs A1 de la CDME engendre également un effet « rétrograde » impactant l'accumulation de neutrophiles dans l'inflammation cutanée (Bong, Rosengren, & Firestein, 1996).

La stimulation des récepteurs A1 réduit l'expression de marqueurs d'activation des astrocytes dans un modèle de douleur inflammatoire induite par le LPS (Gessi et al., 2013). Les récepteurs de l'adénosine sont également exprimés dans le système immunitaire (Inoue, 2008; Koizumi, Ohsawa, Inoue, & Kohsaka, 2013).

Les récepteurs A1 sont des cibles prometteuses pour les approches analgésiques non-opioïdiques pour traiter les douleurs neuropathiques (Draper-Joyce et al., 2021; Nakamura, Ohta, & Kemmotsu, 1997; Poon & Sawynok, 1998). Draper-Joyce et al. (2021) ont montré dans un modèle de neuropathie chez le rat que l'application d'un modulateur allostérique positif des récepteurs A1 induisait une analgésie. Cette analgésie met en jeu de l'adénosine endogène dont le niveau est augmenté dans la moelle épinière en conditions neuropathiques.

Il existe par ailleurs une relation entre les récepteurs A1 et l'acupuncture. En effet, plusieurs études indiquent que l'effet antinociceptif de cette approche analgésique implique l'activation des récepteurs A1. Les concentrations d'adénosine extracellulaire sont augmentées lors de protocoles d'acupuncture chez la souris, et l'expression de ces récepteurs est nécessaire pour générer l'effet analgésique de l'adénosine lors de l'acupuncture (Goldman et al., 2010). L'implication des récepteurs A1 dans l'analgésie induite par l'électroacupuncture a également été montrée dans un modèle de douleur neuropathique (CCI voir **Figure 12, A**) (Zhang et al., 2018) et des résultats similaires ont été obtenus dans le cas de douleurs inflammatoires (CFA voir **Figure 12, A**) (Liao, Hsieh, Huang, & Lin, 2017). D'autres résultats suggèrent que l'effet analgésique de l'électroacupuncture peut dépendre d'une surexpression des récepteurs A1 dans la moelle épinière (Dai et al., 2020).

*Remarque : Les récepteurs A1 de l'adénosine semblent représenter des cibles intéressantes pour les approches analgésique non-opioïdergiques et non-invasives. Leur implication dans une approche thérapeutique non-pharmacologique, la stimulation médullaire (SCS) et la TENS est évoquée dans une revue préparée dans le cadre de ma thèse (voir Revue 2, Annexe)*

### **En conclusion :**

L'adénosine semble avoir un rôle pro ou antinociceptif en fonction des types douleur et des récepteurs activés. Les récepteurs A1 sont largement exprimés dans les neurones et la glie de la CDME. L'activation de ces récepteurs produit une analgésie tant en situation de douleur d'origine neuropathique, qu'inflammatoire. Les récepteurs A1 sont donc des acteurs potentiels des mécanismes de plasticité à court-terme intervenant dans le traitement des informations nociceptives, notamment en conditions douloureuses.

Plusieurs études suggèrent d'ailleurs que ces récepteurs pourraient représenter des cibles intéressantes pour de nouvelles approches thérapeutiques.

Lou, je suis fier de toi.

Fin de la Partie III de l'introduction sous la forme d'un manuscrit d'article de revue

# REVUE 1

*Short term plasticity (STP) in the spinal nociceptive system*

Manuscrit non-soumis



**Title:****Short term plasticity (STP) in the spinal nociceptive system**

Authors:

Cathenaut L<sup>1</sup>, Schlichter R<sup>1</sup> & Hugel S<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, 67000 Strasbourg, France.

\* Corresponding author

**Abstract**

Somatosensory information is delivered to neuronal networks of dorsal horn (DH) of the spinal cord by the axons of primary afferent neurons that encode the intensity of peripheral sensory stimuli under the form of a code based on the frequency of action potential firing. The efficient processing of these messages within the DH involves synapses that are frequency-tuned, a phenomenon that is linked to their ability to display activity-dependent forms of short-term plasticity (STP). By affecting differently excitatory and inhibitory synaptic transmissions these STP properties allow a powerful gain control in DH neuronal networks that may be critical for the integration of nociceptive messages before they are forwarded to the brain where they may be ultimately interpreted as pain at the cortical level. Moreover, these STPs can be finely modulated by endogenous signaling molecules such as neurosteroids, adenosine or GABA. The STP properties of DH inhibitory synapses might also, at least in part, participate in the pain-relieving effect on non-pharmacological analgesic procedures such as Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (TENS), electroacupuncture or Spinal Cord Stimulation (SCS). The properties of target-specific STP at inhibitory DH network synapses and their possible contribution to electrical stimulation-induced reduction of hyperalgesic and/or allodynic states in chronic pain will be reviewed and discussed.

**Introduction**

In sensory neurons, the average number of spikes per unit of time encodes the intensity of adequate stimuli (Adrian, 1920; Adrian and Zotterman, 1926; Torebjork and Hallin, 1974; Campero et al., 1996), and temporal summation in response to electrical, thermal or mechanical stimulation, is frequency-dependent (Lundberg et al., 1992; Vierck et al., 1997; Andrew and Greenspan, 1999). As a consequence, the subjective magnitude of pain perceived by humans during intraneural stimulations of sensory fibers increases monotonously with the frequency of electrical impulses (Lundberg et al., 1992). Among sensory neurons, C and A $\delta$  primary afferents conveying nociceptive information project to networks within the DH (DH) of the spinal cord, and mainly to superficial-most layers (layers I-III) (Cordero-Erausquin et al., 2016). The impact of C and A $\delta$  primary afferent recruitment by a natural stimulation at a given intensity is therefore expected to strongly depend on the frequency-response properties of synapses among neurons within these DH networks. Indeed, in other structures of the nervous system, frequency-selective synapses have been involved in the processing of frequency-coded information. These synapses display short-term plasticity processes changing dynamically their efficacy over time as a function of the

time interval between presynaptic action potentials (Buonomano, 2007; Motanis et al., 2018). Short-term plasticity can either correspond to a short-term potentiation or a short-term depression during repetitive activity. This kind of plasticity can therefore be expressed even in the case of a single pair of synaptic events: the first event impacting on the efficacy of the second. A third type of plasticity, e.g. when short-lasting changes are induced following repeated activity is also recognized as a situation of short-term plasticity: (Zucker and Regehr, 2002). Activity-dependent short-term plasticity has been observed in numerous structures (Froemke et al., 2007; Letzkus et al., 2011; Kuhlman et al., 2013), including in the spinal nociceptive system. Here we review recent insights into the short-term plasticities expressed at synapses within DH networks as well as the involvement of endogenous modulators in these processes. The possible impact of these plasticities on the processing of nociceptive information within the DH as well as their possible contribution to the analgesic effects of non-pharmacological neuromodulatory spinal cord stimulation approaches will be discussed.

## **1. Nociceptive information and spinal nociceptive networks**

### **1.1. Frequency coding of stimulation intensity by primary afferent fibers**

In basal physiological conditions, nociceptors are not spontaneously active (Andrew and Greenspan, 1999), but these can discharge action potentials despite the absence of nociceptive behavioral responses (Torebjork and Hallin, 1974; Fleischer et al., 1983). For example, activity  $\leq 2$  Hz occurs in vivo in rat C-fibers during non-noxious stimulations (Fleischer et al., 1983), indicating that downstream networks filter these low frequency inputs which are not relevant for nociception in control conditions. Upon stimulation with adequate stimuli, nociceptors discharge action potentials at frequencies correlated with stimulus intensities (Adrian, 1920; Adrian and Zotterman, 1926; Torebjork and Hallin, 1974; Handwerker et al., 1987; Campero et al., 1996). At stimulation onset, primary afferents display a dynamic response adapting more or less rapidly with time, depending on the type of primary afferent fiber. During the first hundreds of milliseconds, the instantaneous frequency of action potential discharges can reach several tens of Hz in C- fibers (Torebjork and Hallin, 1974; Dickhaus et al., 1985; Handwerker et al., 1987; Puig and Sorkin, 1996) (see Table 1). Since C-fibers adapt rapidly, the frequency calculated over the first second drops to ca. 10 Hz or below (Campero et al., 1996; Andrew and Greenspan, 1999) (Table 1). The discharge frequency of C fibers reach a plateau of only a few Hertz when longer and/or later time windows are considered (Adrian and Zotterman, 1926; Handwerker et al., 1987; Campero et al., 1996; Andrew and Greenspan, 1999). However the lower frequencies observed during the plateau phase of C-fiber discharges are still correlated with the intensity of the applied stimulus (Handwerker et al., 1987; Andrew and Greenspan, 1999).

In A $\delta$  fibers, the instantaneous frequency at the stimulation onset exceeds 50 Hz (Handwerker et al., 1987; Puig and Sorkin, 1996; Andrew and Greenspan, 1999). Some A $\delta$  fibers adapt rapidly whereas other adapt much more slowly and the average frequencies measured over the first second of stimulation are comprised between 5 and 50 Hz (Andrew and Greenspan, 1999). Interestingly, regardless of the stimulation intensity, the final firing rate of A $\delta$  fibers approaches a common value of 5 Hz (Handwerker et al., 1987). Therefore, in contrast with the initial dynamic phase of A $\delta$  fiber activity, the late plateau firing frequency of these fibers does not encode stimulus intensity.

Importantly, the frequency of inputs onto DH neurons might not be strictly correlated with the frequency of primary afferent discharge initially induced in the fiber at the peripheral nerve terminal following sensory transduction. Indeed, in 70% of C fibers and in 10 % of A $\delta$



fibers recorded in vitro, there were at least some failures to trigger antidromic action potentials with 20 extracellular stimulations at 10 Hz (Nakatsuka et al., 2000), suggesting that failures of action potential propagation might occur, particularly in a large proportion of C fibers.

The above presented experimental evidence suggests that (1) nociceptive stimulus intensity is encoded by an action-potential frequency code for both C and A $\delta$  fibers, with a possible exception for the late phase of A $\delta$  fibers activity and that (2) most neurons in DH networks might receive synaptic inputs at frequencies that can reach at least several tens of Hz during the initial phase of the nociceptive message.

### **1.2. Convergence of sensory afferents onto DH neurons**

Most neurons in DH lamina II receive mono or polysynaptic inputs from C-primary afferents, with about three quarter receiving monosynaptic C-fibers inputs (Grudt and Perl, 2002; Liu et al., 2021). Among these neurons, 30-80 % are directly contacted by TRPV1-expressing nociceptors (Nakatsuka et al., 2002; Petitjean et al., 2012), and over 20% of GABAergic neurons in lamina II are contacted by A $\delta$  fibers (Liu et al., 2021).

Moreover, primary afferent fibers converge onto DH neurons, including fibers having distinct conduction velocities and stimulation thresholds (Grudt and Perl, 2002). This convergence is particularly large for C-fibers contacting islet cells in lamina II (Grudt and Perl, 2002).

The discharge frequency of primary afferents together with their convergence onto DH neurons, particularly in lamina II, indicate that these neurons can be activated at up to several tens of Hertz at the onset of nociceptive stimulations.

Neurons within these networks can discharge action potentials in response to the stimulation of these primary afferent inputs (Lu and Perl, 2003; Liu et al., 2021). Moreover, lamina II neurons can reliably discharge action potentials following the stimulation of excitatory inputs, at least up to frequencies of 50 Hz (Cathenaut et al., 2021).

## **2. The wind-up phenomenon**

The wind-up phenomenon corresponds to increased responses evoked by strong repetitive stimulation of C-fibers at constant frequency  $\geq 0.33$  Hz (Mendell and Wall, 1965) (usually electrical, but also mechanical). Such short-lasting changes induced in response to a repeated activity is considered as a type of short-term plasticity (Zucker and Regehr, 2002). Wind-up is among the first short-term plasticities described in the in the spinal cord (Mendell, 1966). Wind-up has been measured in various areas of dorsal and ventral spinal-cord, including in motoneurons (comprehensively reviewed in (Herrero et al., 2000)). Wind-up involves NMDA receptors, but these receptors are also involved in wind-up depression (Davies and Lodge, 1987; Dickenson and Sullivan, 1987; Woda et al., 2004). Wind-up involve also the NK1 receptors (Xu et al., 1992; Coste et al., 2008), the L-type calcium current and the Ca<sup>2+</sup>-activated non-specific cationic current (Fossat et al., 2007). The DH neurons that are most likely to display a wind-up receive non-nociceptive and nociceptive inputs and are localized in deep DH (Schouenborg and Sjolund, 1983). No wind-up was detected in lamina II neurons recorded in transverse rat spinal cord slice preparations (Yoshimura, 1996). Although the exact relevance of wind-up is not straightforward (Herrero et al., 2000), there are clear links between wind-up and nociceptive information processing. Together with other phenomena such as activity-dependent slowing in action potential propagation (Shim et al., 2007; Dickie et al., 2009), the windup appears as an important phenomenon controlling dynamically action potential frequency-coding in the spinal nociceptive system.

### **3. Short-term plasticity of excitatory synaptic transmission in the DH.**

#### **Paired-pulse ratio**

The paired-pulse ratio (PPR) at excitatory synapses has been examined in lamina II of 2-6 weeks old rats (Santos et al., 2009) and in lamina II-V of 1-2.5 weeks old Syrian hamsters (Zhang and Schneider, 2011). In both studies, excitatory synapses displayed paired-pulse depression (i.e.  $PPR < 1$ ) at least for some inter-stimulus intervals (see below). However, the intervals at which paired-pulse depression occurred were very different in the two studies. In Santos et al (2009), PPR was significantly different from 1 for intervals of 320 ms and 640 ms, but not for shorter intervals. In Zhang & Schneider (2011), excitatory synapses displayed a strong paired-pulse depression at a short stimulation interval of 25 ms, and a reduced depression at longer intervals. Indeed although reduced in magnitude, the depression remained significant at intervals of 500 ms. It is important to emphasize that these two studies not only used different the animal species (rat vs hamster), but also differed with respect to the age, the recording mode (current clamp vs. voltage clamp) and the frequency of paired-pulse stimulation (every 5 s versus every 10 s).

#### **Trains of action potentials**

The short-term plasticity expressed in the DH by excitatory connections during trains of stimulation has been little examined. STP evoked during 10 Hz stimulation of presynaptic glutamatergic synapses is illustrated in Zhang & Schneider (2011), however without detailed analysis. It appears that at least some excitatory synaptic connections display short term depression, reaching a maximal amplitude of depression after the 3<sup>rd</sup> stimulation. It must be emphasized, that given the high repetition rate of the stimulation trains (every 10 seconds) tonic modulations might be engaged. These studies nevertheless concur in showing that excitatory connections within the DH displayed mainly short-term depression during paired-pulse or stimulation trains experiments.

### **4. Short-term plasticity of inhibitory synaptic transmission in the DH**

#### **Paired-pulse ratio**

The paired-pulse ratio of inhibitory synapses between DH neurons has been examined only in a small number of studies (Chery and De Koninck, 2000; Hugel and Schlichter, 2003; Zhang and Schneider, 2011; Kloc et al., 2019; Cathenaut et al., 2021). In spinal acute slices of adult rats, minimal electrical stimulation within lamina I evoked glycinergic inhibitory postsynaptic currents (eIPSCs) in lamina I neurons. When paired stimulations were applied, the second glycinergic eIPSC was smaller in amplitude with a maximal depression of about 50% for inter-stimulus intervals of 150-200 ms (Chery and De Koninck, 2000). In GAD65-expressing neurons of lamina II, glycinergic eIPSCs showed a paired-pulse facilitation (PPR of 1.2) for inter-stimulus intervals of 50 ms (Kloc et al., 2019). In laminae II-V of 1-2.5 weeks old Syrian hamsters (Zhang and Schneider, 2011), evoked inhibitory postsynaptic potentials displayed preferentially paired-pulse facilitation but paired-pulse depression was sometimes observed (Zhang and Schneider, 2011). At facilitating synapses, facilitation was significant for 50-100 ms intervals but not for longer intervals; at depressing synapses, depression was significant at 50 ms intervals but not for longer intervals (Zhang and Schneider, 2011). In primary cultures of superficial DH neurons from postnatal rats, paired-pulse depression of GABAergic eIPSCs

was preferentially observed (84 %), but paired-pulse facilitation was also occasionally present (16 %) (Hugel and Schlichter, 2003).

In all these studies, the repetition rate of paired-pulse stimulation might speculatively engage tonic modulations, particularly for repetitions at short intervals (3.3 s in (Chery and De Koninck, 2000), 5 s in (Zhang and Schneider, 2011).

Paired-pulse ratio of GABAergic connections onto inhibitory or excitatory neurons was assessed in lamina II neurons from acute slices prepared from adult GAD65-eGFP mice (Cathenaut et al., 2021). Inhibitory connections onto excitatory or inhibitory neurons either displayed paired-pulse facilitation or paired-pulse depression, but the proportion of connections showing facilitation or depression depended on the inter-stimulation interval (ISI) and on the excitatory or inhibitory nature of the postsynaptic neuron. Most GABAergic connections onto excitatory neurons displayed a paired-pulse facilitation, particularly at short ISIs (25-50 ms). No preferential plasticity was displayed by GABAergic connections onto inhibitory neurons for ISIs up to 100 ms, but depression was dominant for longer ISIs (200-300 ms) (Cathenaut et al., 2021). These results indicate that in some instances short-term plasticity might be target specific.

### **Trains of action potentials**

The short-term plasticity of inhibitory synaptic transmission in the DH evoked during trains of activity has been assessed in few works, using frequencies of stimulation ranging from 2.5 Hz to 50 Hz (Hugel and Schlichter, 2003; Cordero-Erausquin et al., 2005; Labrakakis et al., 2009; Zhang and Schneider, 2011; Ferrini et al., 2020; Cathenaut et al., 2021).

In primary cultures of superficial DH neurons from postnatal rats, amplitudes of GABAergic eIPSCs depressed during trains at 2.5 Hz (Hugel and Schlichter, 2003).

The impact of trains at 5 Hz has been assessed on GABAergic transmission between DH neurons. GABAergic neurons of lamina II simultaneously contacted excitatory and inhibitory neurons, but these connections displayed very different frequency-dependent short-term plasticities. Connection onto excitatory interneurons displayed no plasticity during 5 Hz trains, whereas connections onto inhibitory ones displayed a strong depression (Cathenaut et al., 2021).

Zhang and Schneider (2011), have stimulated inhibitory synapses in laminae II-V of Syrian hamsters with trains at 10 Hz and noticed that eIPSPs either potentiated or depressed. However, it cannot be excluded that these data were impacted by intra-train shifts in intracellular concentrations of Cl<sup>-</sup>, as shown by Cordero-Erausquin et al. (2005), since animals used in that work were quite young.

In lamina II of adult mice, Labrakakis et al. (2009) examined the plasticity expressed during trains at 20 Hz delivered to a presynaptic inhibitory neuron synapsing onto a postsynaptic inhibitory neuron (Labrakakis et al., 2009). The amplitude of the 1<sup>st</sup> eIPSC of the 1<sup>st</sup> train was significantly smaller than that of the 1<sup>st</sup> eIPSC in subsequent trains, indicating the engagement of a train-to-train plasticity. However, the authors did not distinguish between glycinergic or GABAergic components or nature of eIPSCs. Therefore, the facilitation in the first train might speculatively involve glycinergic component which has been shown to display strong paired-pulse facilitation (Kloc et al., 2019). Within individual trains, short-term plasticity followed opposite trends, depending whether the 1<sup>st</sup> eIPSC of the train was potentiated or not (larger or not than that from isolated eIPSCs): potentiated 1<sup>st</sup> eIPSCs were followed by a depression during the train whereas non-potentiated 1<sup>st</sup> eIPSCs were followed by a facilitation during the train. Therefore, first trains usually had a non-potentiated 1<sup>st</sup> eIPSC followed by potentiated

eIPSCs whereas subsequent trains had potentiated 1<sup>st</sup> eIPSCs followed by a short term depression of subsequent trains.

During trains at 50 Hz, GABAergic connections onto excitatory neurons in lamina II displayed no plasticity, allowing a time-dependent summation, whereas connections onto GABAergic neurons displayed strong depression (Cathenaut et al., 2021).

These results indicated that inhibitory connections onto lamina II neurons displayed different forms of activity-dependent plasticities. These plasticities appeared to differ as a function of the neurotransmitter involved: glycinergic connections onto inhibitory neurons displayed a strong paired-pulse potentiation at short ISIs whereas GABAergic connections onto inhibitory neurons displayed little or no potentiation at these intervals. These plasticities also depended on the postsynaptic target: GABAergic connections onto excitatory neurons showed potentiation at short ISIs and during trains of stimulation, whereas GABAergic connections onto inhibitory neurons displayed little paired-pulse plasticity and depressed during trains of stimulation.

In addition, train repetition had an impact on the plasticity expressed during the trains. Such combinations of plasticities at different repetition frequencies, and time scales has been observed in other CNS structures such as hippocampal networks, and may represent a relatively common phenomenon (Anwar et al., 2017).

#### **Short-term plasticities and Cl<sup>-</sup>-extrusion capability.**

Rapid changes in the equilibrium potential of Cl<sup>-</sup> ions can be involved in STP at GABAergic synapses. In lamina I neurons recorded in acute slices from immature rats (before 3 weeks), Cordero-Erausquin et al (2005) examined the eIPSCs evoked by trains of 20 local stimulations applied at various frequencies (20, 40 and 100 Hz). In a proportion of neurons responding to single stimulations by outward eIPSCs, the direction of eIPSCs changed from outward to inward during the train. The proportion of neurons displaying such a shift in eIPSCs direction during the train increased with the frequency of stimulation. This shift in eIPSCs direction during sustained activity is due to reduced Cl<sup>-</sup>-extrusion capability by immature DH neurons (Cordero-Erausquin et al., 2005). Recent work by the same team indicated that, in lamina I, repeated activity of inhibitory synapses was sufficient to induce a significant shift in Cl<sup>-</sup> equilibrium potential, even in adult mice (Ferrini et al., 2020). Such a shift accounted for one quarter of the eIPSC amplitude decrease observed at the end of 25 stimulations at 20 Hz, and was only observed in lamina I and not lamina II neurons (Ferrini et al., 2020). These data indicate that even in adult animals, the Cl<sup>-</sup>-extrusion capability can be challenged at physiologically relevant frequencies in lamina I. Importantly, reduced Cl<sup>-</sup>-extrusion capability is also observed in neuropathic conditions (Coull et al., 2003). Experimental and modeling studies suggest that gradients of intracellular concentrations of Cl<sup>-</sup> can exist between the cell bodies and the dendrites of the same neurons (Staley and Proctor, 1999; Doyon et al., 2011). These results support the idea that different short-term plasticities occur at somatic and dendritic inhibitory synapses due to differences in local changes of intracellular Cl<sup>-</sup> concentrations in these distinct compartments. Importantly, inhibition mediated by GABA<sub>A</sub> and glycine receptors involve an hyperpolarizing shift of membrane potential with respect to action potential threshold and an electrical shunting of membrane resistance that reduces the impact of incoming excitatory postsynaptic potentials. Interestingly, these mechanisms operate at distinct spatial and temporal scales (Jean-Xavier et al., 2007). Therefore, the outcome of depolarizing IPSCs results from the complex interplay between parameters

including Cl<sup>-</sup>-conductance and driving-force, and the frequency of activity (Branchereau et al., 2016); trains of depolarizing IPSPs being excitatory at low frequency and inhibitory at higher frequency (Branchereau et al., 2016).

### **5. Target-specific short-term plasticities and their possible impacts**

The characteristics of short-term plasticities has been shown to depend on the nature of either pre- and/or postsynaptic neurons (Markram et al., 1998; Beierlein et al., 2003; Bao et al., 2010) with some exceptions (Dorgans et al., 2019). GABAergic interneurons from lamina II simultaneously contact excitatory and inhibitory interneurons from the same lamina, and these connections display very distinct short-term plasticities ((Cathenaut et al., 2021), see above). Importantly, such a differential target-specific short-term plasticity involving synapses contacting excitatory and inhibitory neurons directly impacts the dynamic properties of networks and their excitation/inhibition balance (Buonomano, 2000; Pouille and Scanziani, 2004; Klyachko and Stevens, 2006; Lovett-Barron et al., 2012; Royer et al., 2012; Bartley and Dobrunz, 2015; Moreno et al., 2016). We have shown that in lamina II of the adult mouse spinal cord, stimulation of GABAergic presynaptic neurons at frequencies comparable to those of primary nociceptor discharges triggered by low intensity sensory stimulation will induce short-term depression at synapses with postsynaptic inhibitory (GABAergic) neurons whereas the inhibitory control onto excitatory neurons will not display short term-plasticity. However, at frequencies corresponding to sensory fiber activity at high intensity of sensory stimulation, the inhibitory control onto excitatory neurons will be increased owing to time-dependent summation whereas it will remain unaffected at inhibitory synapses onto inhibitory neurons. Inhibitory neurons display a tonic action-potential firing profile upon membrane depolarization (Lu and Perl, 2003). It follows that these inhibitory neurons can probably follow excitatory synaptic inputs at relatively high frequencies. Therefore, in order to secure an efficient control of synaptic excitation in these neurons there must be a reliable and stable inhibitory control of these neurons in GABAergic inputs. It is therefore important that the GABAergic inputs to these inhibitory neurons displays no (or very limited) frequency depression.

To summarize, under basal physiological conditions, both target-specific STP characteristics and the firing properties of excitatory vs inhibitory postsynaptic neurons will concur to favor an inhibitory control of nociceptive messages in Lamina II of the DH, in particular at high intensity of sensory stimulation (Cathenaut et al., 2021).

### **6. Modulation of short term plasticities**

#### **Frequency dependent short-term plasticities and deactivation kinetics of postsynaptic currents**

Temporal summation of postsynaptic currents, and of the corresponding changes in membrane potential can lead to short-term plasticity. This short-term plasticity depends on the degree of saturation of postsynaptic receptors by the synaptically released neurotransmitter (Xu-Friedman and Regehr, 2004). A summation of synaptic currents can occur during trains of activity when the current has not fully returned to baseline at the onset of the following stimulation. The required conditions for a summation to occur will depend on both the frequency of stimulation and the deactivation kinetics of the synaptic currents. Interestingly, GABAergic eIPSCs recorded in lamina II inhibitory neurons have been shown to display slower decay kinetics than those recorded in excitatory neurons (Labrakakis et al., 2014). Such slower kinetics should allow a better temporal summation of eIPSCs during trains

of activity. Nevertheless, at high frequency, summated eIPSCs recorded in excitatory neurons reached larger amplitudes than summated eIPSCs in inhibitory neurons, indicating that differences in decay kinetics can be compensated/counterbalanced by other target-specific properties of GABAergic synapses (Cathenaut et al., 2021), and might possibly involve distinct degrees of postsynaptic receptors saturation.

Importantly, since summation resulted from an interplay between the frequency and synaptic currents deactivation kinetics, modulators inducing changes in these kinetics may impact the frequency-dependence of this type of short-term plasticity. This may be particularly relevant for GABAergic eIPSCs in lamina II neurons, the decay kinetics of which are prolonged by locally synthesized  $3\alpha,5\alpha$ -reduced neurosteroids during early postnatal developmental stages as well as following peripheral inflammation, this phenomenon having an antihyperalgesic effect (Keller et al., 2004; Poisbeau et al., 2005; Schlichter et al., 2006; Inquimbert et al., 2008).

### **Activity-dependent activation of GABA<sub>B</sub> receptors**

Several studies have indicated that synaptically released GABA can modulate synaptic transmission by activating GABA<sub>B</sub> receptors. In lamina I of the DH, minimal electrical stimulation-evoked synaptic GABA release can preferentially activate presynaptic GABA<sub>B</sub> autoreceptors leading to a paired-pulse depression of glycinergic IPSCs that can amount 50 % of reduction in IPSC amplitude at ISIs of 150-200 ms. This depression involved presynaptic GABA<sub>B</sub> autoreceptors activated by the GABA coreleased with glycine, but that was not codetected by the postsynaptic neuron (Chery and De Koninck, 2000).

In cultured DH neurons, presynaptic GABA<sub>B</sub> autoreceptors control a subset of GABAergic synapses in an activity-dependent manner (Hugel and Schlichter, 2003). At synapses displaying a GABA/ATP cotransmission, the four last eCPSIs of the train (8 stimulations with an ISI of 400 ms (2.5 Hz)) were under phasic inhibitory control by GABA<sub>B</sub> and A1 receptors. By contrast, GABAergic-only synapses were under tonic inhibition involving GABA<sub>B</sub> receptors only. Both effects involved at least presynaptic GABA<sub>B</sub> and A1 autoreceptors (Hugel and Schlichter, 2003), but recording conditions may have precluded the observation of postsynaptic effects.

Our recent results also indicate that in lamina II of control adult mice, GABA<sub>B</sub> receptors are also involved in a phasic modulation of GABAergic connections between lamina II neurons. This involvement of GABA<sub>B</sub> receptors is target- and frequency-specific: it only occurs at synapses between two inhibitory neurons and at low stimulation frequency (Cathenaut et al., 2021).

In addition to these phasic actions of endogenously released GABA on GABA<sub>B</sub> receptors, a tonic activation GABA<sub>B</sub> receptors by ambient extracellular GABA has been reported. Importantly, affinity of GABA<sub>B</sub> receptors for GABA is higher than that of GABA<sub>A</sub> receptors. Therefore GABA<sub>B</sub> receptors might be the main target at low ambient GABA concentrations (Yoon and Rothman, 1991; Isaacson et al., 1993).

Activation of spinal muscarinic receptors evokes the release of GABA (Baba et al., 1998), which can activate GABA<sub>B</sub> receptors localized on presynaptic terminals of glutamatergic neurons and inhibit the release of glutamate (Li et al., 2002). Inhibition of GAT-3 transporters in the DH induces antinociception in control rats by a mechanism involving at least in part the activation GABA<sub>B</sub> receptors (Kataoka et al., 2013).

It has also been shown that antagonists of GABA<sub>B</sub> receptors increase the frequency of glutamatergic EPSCs recorded in vivo in rats (Fukuhara et al., 2013) and that glutamate release from A $\beta$  fibers in deep laminae of rat DH is placed under a tonic inhibition by presynaptic GABA<sub>B</sub> receptors (Salio et al., 2017).

Interestingly, injection of GABA<sub>B</sub> antagonists in the DH is pronociceptive in rats *in vivo* (Malan et al., 2002). Moreover, in monkey spinothalamic neurons, GABA<sub>B</sub> receptor antagonists increase spontaneous action potential discharge activity as well as action potential firing following cutaneous stimulation (Lin et al., 1996).

These results indicate that GABA<sub>B</sub> receptors can be tonically activated in the DH under basal physiological conditions, as suggested by the fact that mice lacking the obligatory GABA<sub>B</sub>1 subunit of GABA<sub>B</sub> receptors are hyperalgesic (Schuler et al., 2001).

Tonic activation of GABA<sub>B</sub> receptors by endogenous GABA can be increased by positive allosteric modulators of these receptors such as 5,7-ditert-butyl-3-hydroxy-3-(trifluoromethyl)-1-benzofuran-2-one (rac-BHFF) which has analgesic effects on control but not on neuropathic mice (Zemoura et al., 2016). This is in line with previous work suggesting that the GABA tone in the DH may be reduced in neuropathic conditions (Lever et al., 2003), whereas it is increased in inflammatory conditions (Castro-Lopes et al., 1992). This situation could in part explain why GABA<sub>B</sub> agonists are apparently ineffective to alleviate nociception in inflammatory pain models whereas these are analgesic in most neuropathic pain models.

### **Activity dependent activation of adenosine receptors**

Endogenous levels of adenosine can phasically or tonically modulate synaptic transmission. Under basal physiological conditions, the estimated extracellular concentration of adenosine in the striatum of awake rats ranges from 40 to 460 nM (Ballarin et al., 1991). At such concentrations, adenosine can significantly activate A1 and A2A receptors, and this could account for the inhibitory effect of adenosine, and the excitatory effect of A1 and A2A antagonists, which have been reported in various models (Dunwiddie and Masino, 2001). Adenosine may speculatively be linked to circadian changes in pain sensitivity observed in humans and various animal models (see for example (Saini et al., 2013)). Indeed, regulation of ATP release from astrocytes is regulated by glucocorticoids and this release impacts pain sensitivity (Koyanagi et al., 2016).

In lamina II of the DH, glutamatergic transmission is under an inhibitory tone of endogenous adenosine (Tian et al., 2010). Interestingly, the data presented in this work do not fully support a modulation of mEPSCs by adenosine tone, and may suggest that spontaneous activity is required to reveal this tone.

In cultured DH neurons, presynaptic A1 autoreceptors control a subset of GABAergic synapses in an activity dependent manner (Hugel and Schlichter, 2003). These synapses are also under the inhibitory control of GABA<sub>B</sub> autoreceptors; both signaling pathways engaged by A1 and GABA<sub>B</sub> receptors being convergent (Hugel and Schlichter, 2003). Interestingly, the synapses modulated by A1 receptors coreleased GABA and ATP.

Recent results indicate that in lamina II of control adult GAD65-eGFP mice, A1 receptors tonically inhibit GABAergic connections onto excitatory neurons by 50% when trains at 5 Hz and 50 Hz are applied. This tonic control was only engaged when trains were repeated every 20 s and not every 60 s, indicating that the tone of adenosine controlling GABAergic connections onto excitatory neurons was linked to the level of activity of the modulated synapse. Adenosine also tonically controlled GABAergic connections onto inhibitory neurons, but this effect was still present when trains were repeated every 60 s. These results indicated that A1 receptors could tonically inhibit GABAergic connections in lamina II. This tonic inhibition was stronger on connections onto excitatory neurons and only experimentally detected when trains were repeated at short intervals (Cathenaut et al., 2021).

### **Electrical stimulation procedures for alleviating pain: possible contribution of activity-dependent tones of adenosine and GABA controlling short-term plasticities**

By applying repeated stimulations to the spinal nociceptive system, non-pharmacological procedures used to alleviate pain such as Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (TENS), electroacupuncture or Spinal Cord Stimulation (SCS) engage activity dependent processes which could in part correspond to the short-term plasticities presented above.

The analgesia induced by TENS is blocked by caffeine at concentrations that may be reached by dietary sources (Marchand et al., 1995). The primary targets of caffeine are A1 and A2A receptors; other effects of caffeine such as inhibition of phosphodiesterases, release of Ca<sup>2+</sup> from internal stores, etc. occur at higher concentrations (Fredholm et al., 1999). This suggests that stimulations at standard TENS frequencies induce the activation of adenosine receptors with antinociceptive properties. This is in line with data from *in vivo* recordings in the cat showing that vibrations in the periphery induce adenosine-mediated inhibitory potentials in the DH (De Koninck and Henry, 1992). Dietary caffeine consumption may therefore interfere with this mechanism, but this has not been confirmed by preliminary clinical investigations (Dickie et al., 2009). Interestingly, TENS frequencies are in the same range as those inducing a strong tonic inhibition of GABAergic transmission on glutamatergic neurons of lamina II by adenosine (Cathenaut et al., 2021). More generally, endogenous adenosine has been involved in the modulation and/or the effect of various pharmacological antinociceptive agents (this point has been extensively reviewed in (Sawynok, 2016)). Spinal adenosine is also involved in the analgesic effects of electroacupuncture in a rodent model of neuropathic pain (Dai et al., 2020).

Since endogenous adenosine acting on A1 receptors seems to be a major player in endogenous antinociceptive mechanisms, the use of A1 receptors positive allosteric modulators appear as a promising antinociceptive strategy (Fredholm et al., 2011). Nevertheless, the development of such clinically-relevant A1 modulators proved to be challenging, although recent advances are promising (Baraldi et al., 2000; Imlach et al., 2015; Jacobson et al., 2019; Draper-Joyce et al., 2021).

Interestingly, the analgesic effect of spinal cord stimulation is potentiated by intrathecal injection of GABA<sub>B</sub> and A1 agonists whereas it is inhibited by antagonists of these receptors (Cui et al., 1998; Lind et al., 2004; Lind et al., 2008). Thus one could speculate that activation of these receptors by GABA and adenosine released in an activity-dependent manner might play a key role in the analgesia mediated by spinal cord stimulation. This is in agreement with experimental evidence showing that spinal cord stimulation increased the release of GABA in the spinal cord of responding animals (Baba et al., 1994; Stiller et al., 1996; Cui et al., 1997b; Cui et al., 1997a; Cui et al., 1998).

The combination of non-pharmacological neuromodulation approaches together with pharmacological modulations targeting GABA<sub>B</sub> and A1 receptors may therefore represent a promising strategy for pain alleviation.



## References

- Adrian ED (1920) The recovery process of excitable tissues: Part I. *J Physiol* 54:1-31.
- Adrian ED, Zotterman Y (1926) The impulses produced by sensory nerve endings: Part 3. Impulses set up by Touch and Pressure. *J Physiol* 61:465-483.
- Andrew D, Greenspan JD (1999) Peripheral coding of tonic mechanical cutaneous pain: comparison of nociceptor activity in rat and human psychophysics. *J Neurophysiol* 82:2641-2648.
- Anwar H, Li X, Bucher D, Nadim F (2017) Functional roles of short-term synaptic plasticity with an emphasis on inhibition. *Curr Opin Neurobiol* 43:71-78.
- Baba H, Yoshimura M, Nishi S, Shimoji K (1994) Synaptic responses of substantia gelatinosa neurones to dorsal column stimulation in rat spinal cord in vitro. *J Physiol* 478 ( Pt 1):87-99.
- Baba H, Kohno T, Okamoto M, Goldstein PA, Shimoji K, Yoshimura M (1998) Muscarinic facilitation of GABA release in substantia gelatinosa of the rat spinal dorsal horn. *J Physiol* 508 ( Pt 1):83-93.
- Ballarin M, Fredholm BB, Ambrosio S, Mahy N (1991) Extracellular levels of adenosine and its metabolites in the striatum of awake rats: inhibition of uptake and metabolism. *Acta Physiol Scand* 142:97-103.
- Bao J, Reim K, Sakaba T (2010) Target-dependent feedforward inhibition mediated by short-term synaptic plasticity in the cerebellum. *J Neurosci* 30:8171-8179.
- Baraldi PG, Zaid AN, Lampronti I, Fruttarolo F, Pavani MG, Tabrizi MA, Shryock JC, Leung E, Romagnoli R (2000) Synthesis and biological effects of a new series of 2-amino-3-benzoylthiophenes as allosteric enhancers of A1-adenosine receptor. *Bioorg Med Chem Lett* 10:1953-1957.
- Bartley AF, Dobrunz LE (2015) Short-term plasticity regulates the excitation/inhibition ratio and the temporal window for spike integration in CA1 pyramidal cells. *Eur J Neurosci* 41:1402-1415.
- Beierlein M, Gibson JR, Connors BW (2003) Two dynamically distinct inhibitory networks in layer 4 of the neocortex. *J Neurophysiol* 90:2987-3000.
- Branchereau P, Cattaert D, Delpy A, Allain AE, Martin E, Meyrand P (2016) Depolarizing GABA/glycine synaptic events switch from excitation to inhibition during frequency increases. *Sci Rep* 6:21753.
- Buonomano DV (2000) Decoding temporal information: A model based on short-term synaptic plasticity. *J Neurosci* 20:1129-1141.
- Buonomano DV (2007) The biology of time across different scales. *Nat Chem Biol* 3:594-597.
- Campero M, Serra J, Ochoa JL (1996) C-polymodal nociceptors activated by noxious low temperature in human skin. *J Physiol* 497 ( Pt 2):565-572.
- Castro-Lopes JM, Tavares I, Tolle TR, Coito A, Coimbra A (1992) Increase in GABAergic Cells and GABA Levels in the Spinal Cord in Unilateral Inflammation of the Hindlimb in the Rat. *Eur J Neurosci* 4:296-301.
- Cathenaut L, Leonardon B, Kuster R, Inquimbert P, Schlichter R, Hugel S (2021) Inhibitory interneurons with differential plasticities at their connections tune excitatory/inhibitory balance in the spinal nociceptive system. *Pain*.
- Chery N, De Koninck Y (2000) GABA(B) receptors are the first target of released GABA at lamina I inhibitory synapses in the adult rat spinal cord. *J Neurophysiol* 84:1006-1011.
- Cordero-Erausquin M, Inquimbert P, Schlichter R, Hugel S (2016) Neuronal networks and nociceptive processing in the dorsal horn of the spinal cord. *Neuroscience* 338:230-247.
- Cordero-Erausquin M, Coull JA, Boudreau D, Rolland M, De Koninck Y (2005) Differential maturation of GABA action and anion reversal potential in spinal lamina I neurons: impact of chloride extrusion capacity. *J Neurosci* 25:9613-9623.
- Coste J, Voisin DL, Miraucourt LS, Dallel R, Luccarini P (2008) Dorsal horn NK1-expressing neurons control windup of downstream trigeminal nociceptive neurons. *Pain* 137:340-351.
- 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.

- Cui JG, Sollevi A, Linderroth B, Meyerson BA (1997a) Adenosine receptor activation suppresses tactile hypersensitivity and potentiates spinal cord stimulation in mononeuropathic rats. *Neurosci Lett* 223:173-176.
- Cui JG, Meyerson BA, Sollevi A, Linderroth B (1998) Effect of spinal cord stimulation on tactile hypersensitivity in mononeuropathic rats is potentiated by simultaneous GABA(B) and adenosine receptor activation. *Neurosci Lett* 247:183-186.
- Cui JG, O'Connor WT, Ungerstedt U, Linderroth B, Meyerson BA (1997b) Spinal cord stimulation attenuates augmented dorsal horn release of excitatory amino acids in mononeuropathy via a GABAergic mechanism. *Pain* 73:87-95.
- Dai QX, Huang LP, Mo YC, Yu LN, Du WW, Zhang AQ, Geng WJ, Wang JL, Yan M (2020) Role of spinal adenosine A1 receptors in the analgesic effect of electroacupuncture in a rat model of neuropathic pain. *J Int Med Res* 48:300060519883748.
- Davies SN, Lodge D (1987) Evidence for involvement of N-methylaspartate receptors in 'wind-up' of class 2 neurones in the dorsal horn of the rat. *Brain Res* 424:402-406.
- De Koninck Y, Henry JL (1992) Peripheral vibration causes an adenosine-mediated postsynaptic inhibitory potential in dorsal horn neurons of the cat spinal cord. *Neuroscience* 50:435-443.
- Dickenson AH, Sullivan AF (1987) Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurones following C fibre stimulation. *Neuropharmacology* 26:1235-1238.
- Dickhaus H, Pauser G, Zimmermann M (1985) Tonic descending inhibition affects intensity coding of nociceptive responses of spinal dorsal horn neurones in the cat. *Pain* 23:145-158.
- Dickie A, Tabasam G, Tashani O, Marchant P, Johnson MI (2009) A preliminary investigation into the effect of coffee on hypalgesia associated with transcutaneous electrical nerve stimulation. *Clin Physiol Funct Imaging* 29:293-299.
- Dorgans K, Demais V, Bailly Y, Poulain B, Isope P, Doussau F (2019) Short-term plasticity at cerebellar granule cell to molecular layer interneuron synapses expands information processing. *Elife* 8.
- Doyon N, Prescott SA, Castonguay A, Godin AG, Kroger H, De Koninck Y (2011) Efficacy of synaptic inhibition depends on multiple, dynamically interacting mechanisms implicated in chloride homeostasis. *PLoS Comput Biol* 7:e1002149.
- Draper-Joyce CJ et al. (2021) Positive allosteric mechanisms of adenosine A1 receptor-mediated analgesia. *Nature* 597:571-576.
- Dunwiddie TV, Masino SA (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24:31-55.
- Ferrini F, Perez-Sanchez J, Ferland S, Lorenzo LE, Godin AG, Plasencia-Fernandez I, Cottet M, Castonguay A, Wang F, Salio C, Doyon N, Merighi A, De Koninck Y (2020) Differential chloride homeostasis in the spinal dorsal horn locally shapes synaptic metaplasticity and modality-specific sensitization. *Nat Commun* 11:3935.
- Fleischer E, Handwerker HO, Joukhadar S (1983) Unmyelinated nociceptive units in two skin areas of the rat. *Brain Res* 267:81-92.
- Fossat P, Sibon I, Le Masson G, Landry M, Nagy F (2007) L-type calcium channels and NMDA receptors: a determinant duo for short-term nociceptive plasticity. *Eur J Neurosci* 25:127-135.
- Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zvartau EE (1999) Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* 51:83-133.
- Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Linden J, Muller CE (2011) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacol Rev* 63:1-34.
- Froemke RC, Merzenich MM, Schreiner CE (2007) A synaptic memory trace for cortical receptive field plasticity. *Nature* 450:425-429.
- Fukuhara K, Katafuchi T, Yoshimura M (2013) Effects of baclofen on mechanical noxious and innocuous transmission in the spinal dorsal horn of the adult rat: in vivo patch-clamp analysis. *Eur J Neurosci* 38:3398-3407.

- Grudt TJ, Perl ER (2002) Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *J Physiol* 540:189-207.
- Handwerker HO, Anton F, Reeh PW (1987) Discharge patterns of afferent cutaneous nerve fibers from the rat's tail during prolonged noxious mechanical stimulation. *Exp Brain Res* 65:493-504.
- Herrero JF, Laird JM, Lopez-Garcia JA (2000) Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? *Prog Neurobiol* 61:169-203.
- Hugel S, Schlichter R (2003) Convergent control of synaptic GABA release from rat dorsal horn neurones by adenosine and GABA autoreceptors. *J Physiol* 551:479-489.
- Imlach WL, Bhola RF, May LT, Christopoulos A, Christie MJ (2015) A Positive Allosteric Modulator of the Adenosine A1 Receptor Selectively Inhibits Primary Afferent Synaptic Transmission in a Neuropathic Pain Model. *Mol Pharmacol* 88:460-468.
- Inquimbert P, Rodeau JL, 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.
- Isaacson JS, Solis JM, Nicoll RA (1993) Local and diffuse synaptic actions of GABA in the hippocampus. *Neuron* 10:165-175.
- Jacobson KA, Tosh DK, Jain S, Gao ZG (2019) Historical and Current Adenosine Receptor Agonists in Preclinical and Clinical Development. *Front Cell Neurosci* 13:124.
- Jean-Xavier C, Mentis GZ, O'Donovan MJ, Cattaert D, Vinay L (2007) Dual personality of GABA/glycine-mediated depolarizations in immature spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:11477-11482.
- Kataoka K, Hara K, Haranishi Y, Terada T, Sata T (2013) The antinociceptive effect of SNAP5114, a gamma-aminobutyric acid transporter-3 inhibitor, in rat experimental pain models. *Anesth Analg* 116:1162-1169.
- Keller AF, Breton JD, Schlichter R, Poisbeau P (2004) Production of 5alpha-reduced neurosteroids is developmentally regulated and shapes GABA(A) miniature IPSCs in lamina II of the spinal cord. *J Neurosci* 24:907-915.
- Kloc ML, Pradier B, Chirila AM, Kauer JA (2019) NMDA receptor activation induces long-term potentiation of glycine synapses. *PLoS One* 14:e0222066.
- Klyachko VA, Stevens CF (2006) Excitatory and feed-forward inhibitory hippocampal synapses work synergistically as an adaptive filter of natural spike trains. *PLoS Biol* 4:e207.
- Koyanagi S, Kusunose N, Taniguchi M, Akamine T, Kanado Y, Ozono Y, Masuda T, Kohro Y, Matsunaga N, Tsuda M, Salter MW, Inoue K, Ohdo S (2016) Glucocorticoid regulation of ATP release from spinal astrocytes underlies diurnal exacerbation of neuropathic mechanical allodynia. *Nat Commun* 7:13102.
- Kuhlman SJ, Olivas ND, Tring E, Ikrar T, Xu X, Trachtenberg JT (2013) A disinhibitory microcircuit initiates critical-period plasticity in the visual cortex. *Nature* 501:543-546.
- Labrakakis C, Rudolph U, De Koninck Y (2014) The heterogeneity in GABAA receptor-mediated IPSC kinetics reflects heterogeneity of subunit composition among inhibitory and excitatory interneurons in spinal lamina II. *Front Cell Neurosci* 8:424.
- Labrakakis C, Lorenzo LE, Bories C, Ribeiro-da-Silva A, De Koninck Y (2009) Inhibitory coupling between inhibitory interneurons in the spinal cord dorsal horn. *Mol Pain* 5:24.
- Letzkus JJ, Wolff SB, Meyer EM, Tovote P, Courtin J, Herry C, Luthi A (2011) A disinhibitory microcircuit for associative fear learning in the auditory cortex. *Nature* 480:331-335.
- Lever I, Cunningham J, Grist J, Yip PK, Malcangio M (2003) Release of BDNF and GABA in the dorsal horn of neuropathic rats. *Eur J Neurosci* 18:1169-1174.
- Li DP, Chen SR, Pan YZ, Levey AI, Pan HL (2002) Role of presynaptic muscarinic and GABA(B) receptors in spinal glutamate release and cholinergic analgesia in rats. *J Physiol* 543:807-818.
- Lin Q, Peng YB, Willis WD (1996) Role of GABA receptor subtypes in inhibition of primate spinothalamic tract neurons: difference between spinal and periaqueductal gray inhibition. *J Neurophysiol* 75:109-123.

- Lind G, Meyerson BA, Winter J, Linderoth B (2004) Intrathecal baclofen as adjuvant therapy to enhance the effect of spinal cord stimulation in neuropathic pain: a pilot study. *Eur J Pain* 8:377-383.
- Lind G, Schechtmann G, Winter J, Meyerson BA, Linderoth B (2008) Baclofen-enhanced spinal cord stimulation and intrathecal baclofen alone for neuropathic pain: Long-term outcome of a pilot study. *Eur J Pain* 12:132-136.
- Liu P, Zhang X, He X, Jiang Z, Wang Q, Lu Y (2021) Spinal GABAergic neurons are under feed-forward inhibitory control driven by A-delta and C fibers in Gad2 td-Tomato mice. *Mol Pain* 17:1744806921992620.
- Lovett-Barron M, Turi GF, Kaifosh P, Lee PH, Bolze F, Sun XH, Nicoud JF, Zemelman BV, Sternson SM, Losonczy A (2012) Regulation of neuronal input transformations by tunable dendritic inhibition. *Nat Neurosci* 15:423-430, S421-423.
- Lu Y, Perl ER (2003) A specific inhibitory pathway between substantia gelatinosa neurons receiving direct C-fiber input. *J Neurosci* 23:8752-8758.
- Lundberg LE, Jorum E, Holm E, Torebjork HE (1992) Intra-neural electrical stimulation of cutaneous nociceptive fibres in humans: effects of different pulse patterns on magnitude of pain. *Acta Physiol Scand* 146:41-48.
- Malan TP, Mata HP, Porreca F (2002) Spinal GABA(A) and GABA(B) receptor pharmacology in a rat model of neuropathic pain. *Anesthesiology* 96:1161-1167.
- Marchand S, Li J, Charest J (1995) Effects of caffeine on analgesia from transcutaneous electrical nerve stimulation. *N Engl J Med* 333:325-326.
- Markram H, Wang Y, Tsodyks M (1998) Differential signaling via the same axon of neocortical pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5323-5328.
- Mendell LM (1966) Physiological properties of unmyelinated fiber projection to the spinal cord. *Exp Neurol* 16:316-332.
- Mendell LM, Wall PD (1965) Responses of Single Dorsal Cord Cells to Peripheral Cutaneous Unmyelinated Fibres. *Nature* 206:97-99.
- Moreno A, Morris RGM, Canals S (2016) Frequency-Dependent Gating of Hippocampal-Neocortical Interactions. *Cereb Cortex* 26:2105-2114.
- Motanis H, Seay MJ, Buonomano DV (2018) Short-Term Synaptic Plasticity as a Mechanism for Sensory Timing. *Trends Neurosci* 41:701-711.
- 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.
- Nakatsuka T, Ataka T, Kumamoto E, Tamaki T, Yoshimura M (2000) Alteration in synaptic inputs through C-afferent fibers to substantia gelatinosa neurons of the rat spinal dorsal horn during postnatal development. *Neuroscience* 99:549-556.
- Petitjean H, Rodeau JL, Schlichter R (2012) Interactions between superficial and deep dorsal horn spinal cord neurons in the processing of nociceptive information. *Eur J Neurosci* 36:3500-3508.
- 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.
- Pouille F, Scanziani M (2004) Routing of spike series by dynamic circuits in the hippocampus. *Nature* 429:717-723.
- Puig S, Sorkin LS (1996) Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain* 64:345-355.
- Royer S, Zemelman BV, Losonczy A, Kim J, Chance F, Magee JC, Buzsaki G (2012) Control of timing, rate and bursts of hippocampal place cells by dendritic and somatic inhibition. *Nat Neurosci* 15:769-775.

- Saini A, Tucci M, Tampellini M, Maina D, Bouraouia K, Giuliano PL, Termine A, Castellano M, Campagna S, Laciura P, Berruti A (2013) Circadian variation of breakthrough pain in cancer patients. *Eur J Pain* 17:264-270.
- Salio C, Merighi A, Bardoni R (2017) GABAB receptors-mediated tonic inhibition of glutamate release from Abeta fibers in rat laminae III/IV of the spinal cord dorsal horn. *Mol Pain* 13:1744806917710041.
- Santos SF, 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.
- Sawynok J (2016) Adenosine receptor targets for pain. *Neuroscience* 338:1-18.
- Schlichter R, Keller AF, De Roo M, Breton JD, Inquimbert P, Poisbeau P (2006) Fast nongenomic effects of steroids on synaptic transmission and role of endogenous neurosteroids in spinal pain pathways. *J Mol Neurosci* 28:33-51.
- Schouenborg J, Sjolund BH (1983) Activity evoked by A- and C-afferent fibers in rat dorsal horn neurons and its relation to a flexion reflex. *J Neurophysiol* 50:1108-1121.
- Schuler V et al. (2001) Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B(1)). *Neuron* 31:47-58.
- Shim B, Ringkamp M, Lambrinos GL, Hartke TV, Griffin JW, Meyer RA (2007) Activity-dependent slowing of conduction velocity in uninjured L4 C fibers increases after an L5 spinal nerve injury in the rat. *Pain* 128:40-51.
- Staley KJ, Proctor WR (1999) Modulation of mammalian dendritic GABA(A) receptor function by the kinetics of Cl<sup>-</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport. *J Physiol* 519 Pt 3:693-712.
- Stiller CO, Cui JG, O'Connor WT, Brodin E, Meyerson BA, Linderth B (1996) Release of gamma-aminobutyric acid in the dorsal horn and suppression of tactile allodynia by spinal cord stimulation in mononeuropathic rats. *Neurosurgery* 39:367-374; discussion 374-365.
- Tian L, Ji G, Wang C, Bai X, Lu Y, Xiong L (2010) Excitatory synaptic transmission in the spinal substantia gelatinosa is under an inhibitory tone of endogenous adenosine. *Neurosci Lett* 477:28-32.
- Torebjork HE, Hallin RG (1974) Responses in human A and C fibres to repeated electrical intradermal stimulation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 37:653-664.
- Vierck CJ, Jr., Cannon RL, Fry G, Maixner W, Whitsel BL (1997) Characteristics of temporal summation of second pain sensations elicited by brief contact of glabrous skin by a preheated thermode. *J Neurophysiol* 78:992-1002.
- Woda A, Blanc O, Voisin DL, Coste J, Molat JL, Luccarini P (2004) Bidirectional modulation of windup by NMDA receptors in the rat spinal trigeminal nucleus. *Eur J Neurosci* 19:2009-2016.
- Xu-Friedman MA, Regehr WG (2004) Structural contributions to short-term synaptic plasticity. *Physiol Rev* 84:69-85.
- Xu XJ, Dalsgaard CJ, Wiesenfeld-Hallin Z (1992) Spinal substance P and N-methyl-D-aspartate receptors are coactivated in the induction of central sensitization of the nociceptive flexor reflex. *Neuroscience* 51:641-648.
- Yoon KW, Rothman SM (1991) The modulation of rat hippocampal synaptic conductances by baclofen and gamma-aminobutyric acid. *J Physiol* 442:377-390.
- Yoshimura M (1996) Slow synaptic transmission in the spinal dorsal horn. *Prog Brain Res* 113:443-462.
- Zemoura K, Ralvenius WT, Malherbe P, Benke D (2016) The positive allosteric GABAB receptor modulator rac-BHFF enhances baclofen-mediated analgesia in neuropathic mice. *Neuropharmacology* 108:172-178.
- Zhang W, Schneider SP (2011) Short-term modulation at synapses between neurons in laminae II-V of the rodent spinal dorsal horn. *J Neurophysiol* 105:2920-2930.
- Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64:355-405.

**Table 1. Frequency of action-potentials induced by nociceptive stimulations of C and Aδ fibers.**

Type of fibers	Model	Stimulation	Phase of response	Action-Potential Frequency	Reference
C	Human	pinpricks or heat (burning match)	Initial (First hundreds of ms)	50-60 Hz	(Torebjork and Hallin, 1974)
C	Rat	acute subcutaneous injection of formalin in hind paw	Initial (mean peak firing in the first 10 min, 100 ms time windows)	82.3 Hz	(Puig and Sorkin, 1996)
C	Rat	calibrated noxious mechanical simulation of tail	Initial (Peak of instantaneous frequency at stimulation onset)	ca. 20 Hz (4 N) > 50 Hz (6 N) > 100 Hz (8 N)	(Handwerker et al., 1987)
C	Cat	Thermic stimulations at 50°C	Initial (Maximum discharge rate)	ca. 100 Hz	(Dickhaus et al., 1985)
C	Cat	Mechanical stimulation	Initial (Peak at stimulus onset)	15 Hz (50 g) 57 Hz (100 g) 140 Hz (250 g) 170 Hz (500 g)	(Adrian and Zotterman, 1926)
C	Rat	noxious mechanical simulation of paw	First second	> 5 Hz (25 g) > 10 Hz (50-100 g)	(Andrew and Greenspan, 1999)
C	Human	Mechanical	First second	11 Hz	(Campero et al., 1996)
C	Human	Heat (50°C)	First second	8 Hz	(Campero et al., 1996)
C	Human	Cold (0°C)	First second	4 Hz	(Campero et al., 1996)
C	Rat	noxious mechanical simulation of paw	Late (25 s after stimulation onset)	≥ 1 Hz	(Andrew and Greenspan, 1999)
C	Rat	acute subcutaneous injection of formalin in hind paw	Late (Average from first 150 s)	3 Hz	(Puig and Sorkin, 1996)
C	Human	Mechanical	Late (at 5 s)	ca. 0 Hz	(Campero et al., 1996)
C	Human	Heat (50°C)	Late (at 5 s)	2 Hz	(Campero et al., 1996)
C	Human	Cold (0°C)	Late (at 30 s)	< 0.5 Hz	(Campero et al., 1996)
C	Rat	calibrated noxious mechanical simulation of tail	Late (after 120 s)	0.6 Hz (4 N) 0.9 Hz (6 N) 1.2 Hz (8 N)	(Handwerker et al., 1987)
Aδ	Rat	acute subcutaneous injection of formalin in hind paw	Initial (mean peak firing in the first 10 min, 100 ms time windows)	115 Hz (60 Hz glabrous skin fibers, 143 Hz Hairy skin fibers)	(Puig and Sorkin, 1996)
Aδ	Rat	calibrated noxious mechanical simulation of tail	Initial (Peak of instantaneous frequency at stimulation onset)	ca. 20 Hz (4 N) > 50 Hz (6 N) > 100 Hz (8 N)	(Handwerker et al., 1987)
Aδ	Rat	noxious mechanical simulation of paw	First second	ca. 5 Hz (25 g) ca. 15 Hz (50-100 g)	(Andrew and Greenspan, 1999)
Aδ	Rat	acute subcutaneous injection of formalin in hind paw	Late (Average from first 150 s)	ca. 2.5 Hz (glabrous skin) ca. 6 Hz (hairy skin)	(Puig and Sorkin, 1996)
Aδ	Rat	noxious mechanical simulation of paw	Late (25 s after stimulation onset)	≥ 5 Hz (slowly adapting Aδ fibers) < 1 Hz (rapidly adapting fibers)	(Andrew and Greenspan, 1999)
Aδ	Rat	calibrated noxious mechanical simulation of tail	Late (After 120 s)	ca. 5 Hz (at 4, 6, 8 N)	(Handwerker et al., 1987)

**Table 2. Short-term plasticity of inhibitory connections during trains of stimulation**

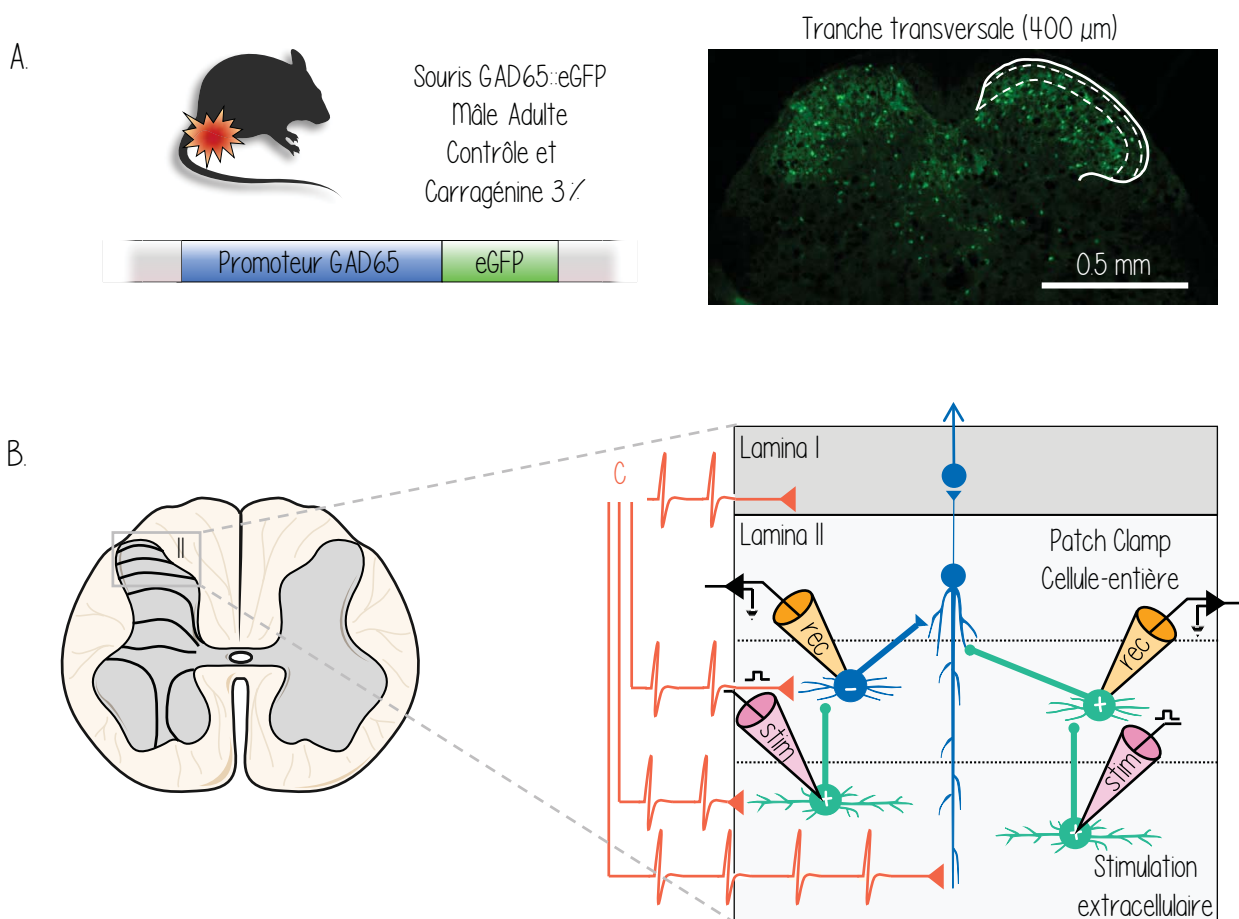
Model	Lamina	Post-synaptic neuron	Type of transmission	Stimulation	Effect	Reference
Primary culture (postnatal rat)	I-III	Unknown	GABAergic	8 stimulations @ 2.5 Hz repeated every 20 s	Depression during the trains involving GABA <sub>B</sub> and A1 receptors	(Hugel and Schlichter, 2003)
Adult GAD65-eGFP mice	II	Excitatory (eGFP-)	GABAergic	11 stimulations @ 5 Hz repeated every 20 s	No change in eIPSCs amplitude	(Cathenaut et al., 2021)
Adult GAD65-eGFP mice	II	Inhibitory (eGFP+)	GABAergic	11 stimulations @ 5 Hz repeated every 20 s	Depression during the train, involving GABA <sub>B</sub> receptors	(Cathenaut et al., 2021)
1-2.5 week old Syrian hamsters	II-V	Unknown	GABAergic and/or glycinergic	10 stimulations @ 10 Hz	Potentiation or depression during the train	(Zhang and Schneider, 2011)
Adult GAD65-eGFP mice	II	Inhibitory (eGFP+)	GABAergic and/or glycinergic	12 stimulations at 20 Hz repeated every 20 s	train-to-train plasticity (the first train different from the next ones) depression or potentiation during the train	(Labrakakis et al., 2009)
Adult GAD65-eGFP mice	II	Excitatory (eGFP-)	GABAergic	11 stimulations @ 50 Hz repeated every 20 s or 60 s	No change in eIPSCs amplitude, but large temporal summation. Involve strong activity dependent inhibition by A1 receptors	(Cathenaut et al., 2021)
Adult GAD65-eGFP mice	II	Inhibitory (eGFP+)	GABAergic	11 stimulations @ 50 Hz repeated every 20 s or 60 s	Depression during the train. Involve weak inhibition by A1 receptors	(Cathenaut et al., 2021)





**RESUME DU MATERIELS  
ET METHODES**





**Figure 18 : Enregistrements électrophysiologiques de la transmission GABAergique dans les neurones de la lamina II**

**A.** Les enregistrements électrophysiologiques sont réalisés sur des tranches aiguës provenant de souris transgéniques ♂ adultes exprimant l'eGFP sous le contrôle du promoteur de la GAD65. Des souris **contrôle** ou en condition d'**inflammation périphérique** induite par injection intraplantaire de **carragénine** sont utilisées. **B.** Des neurones **excitateurs (eGFP-)** ou **inhibiteurs (eGFP+)** de la **lamina II** sont enregistrés en configuration **cellule entière** tandis qu'un neurone inhibiteur de la lamina II est **stimulé** électriquement par une électrode **extracellulaire**. Lors des enregistrements, le **profil de décharge** de potentiels d'action du neurone enregistré est déterminé. Une fois une connexion trouvée par un protocole de **stimulations appariées**, un train à **5 Hz** (toutes les 20 s) est répété 10 fois, puis un train à **50 Hz** (toutes les 60 s) est répété 10 fois également. Ces trains permettent d'étudier la STP de la connexion enregistrée lors de stimulations à **basse fréquence** (5 Hz) et à **haute fréquence** (50 Hz), correspondant respectivement à l'activité des afférences primaires lors de stimulations nociceptives de **faible** et de **forte intensité**. Afin d'isoler la transmission synaptique inhibitrice **GABAergique**, les transmissions glutamatergiques et glycinergiques sont bloquées respectivement par le CNQX (10 µM) et la strychnine (1 µM). Dans les expériences étudiant l'activation des récepteurs GABA<sub>β</sub> et A1, leurs antagonistes sont appliqués dans le bain le CGP55845 (10 µM) ou le DPCPX (10 µM) respectivement.



# RESULTATS



# ARTICLE 1

*Inhibitory interneurons with differential plasticities at their connections tune  
excitatory–inhibitory balance in the spinal nociceptive system*

Pain 163 (2022) e675–e688





# Inhibitory interneurons with differential plasticities at their connections tune excitatory–inhibitory balance in the spinal nociceptive system

Lou Cathenaut, Benjamin Leonardon, Robin Kuster, Perrine Inquimbert, Rémy Schlichter, Sylvain Hugel\*

## Abstract

Networks of the dorsal horn of the spinal cord process nociceptive information from the periphery. In these networks, the excitation–inhibition balance is critical to shape this nociceptive information and to gate it to the brain where it is interpreted as pain. Our aim was to define whether short-term plasticity of inhibitory connections could tune this inhibition–excitation balance by differentially controlling excitatory and inhibitory microcircuits. To this end, we used spinal cord slices from adult mice expressing enhanced green fluorescent protein (eGFP) under the GAD65 promoter and recorded from both eGFP+ (putative inhibitory) and eGFP– (putative excitatory) neurons of lamina II while stimulating single presynaptic GABAergic interneurons at various frequencies. Our results indicate that GABAergic neurons of lamina II simultaneously contact eGFP– and eGFP+ neurons, but these connections display very different frequency-dependent short-term plasticities. Connections onto eGFP– interneurons displayed limited frequency-dependent changes and strong time-dependent summation of inhibitory synaptic currents that was however subjected to a tonic activity-dependent inhibition involving A1 adenosine receptors. By contrast, GABAergic connections onto eGFP+ interneurons expressed pronounced frequency-dependent depression, thus favoring disinhibition at these synapses by a mechanism involving the activation of GABA<sub>B</sub> autoreceptors at low frequency. Interestingly, the balance favors inhibition at frequencies associated with intense pain, whereas it favors excitation at frequencies associated with low pain. Therefore, these target-specific and frequency-specific plasticities allow to tune the balance between inhibition and disinhibition while processing frequency-coded information from primary afferents. These short-term plasticities and their modulation by A1 and GABA<sub>B</sub> receptors might represent an interesting target in pain-alleviating strategies.

**Keywords:** Nociceptive information processing, Synaptic plasticity, Excitation–inhibition balance, Frequency-coded information, Spinal cord stimulation, GABA, Adenosine

## 1. Introduction

Nociceptive information conveyed from the periphery by primary afferents is integrated in the dorsal horn of the spinal cord before being forwarded to the brain where it can lead to pain perception. Among sensory neurons, C-primary and A $\delta$ -primary afferents conveying nociceptive information mostly project to networks within dorsal horn superficial layers (laminae I–III). In lamina II (LII), primary afferents synapse with local excitatory or inhibitory interneurons.<sup>24,30,33,34</sup> In turn, LII inhibitory interneurons contact either excitatory or inhibitory interneurons.<sup>24,33,34,44,54</sup> Inhibitory interneurons in these networks play a critical role in the processing

of nociceptive information, and alteration of inhibition is associated with physiological or pathological pain states.<sup>23,39,48,50</sup> Lamina II interneurons are inhibited by both GABAergic and glycinergic connections, but local inhibitory connections between LII neurons are mostly GABAergic.<sup>27,33</sup>

Sensory neurons projecting to these networks encode the intensity of adequate stimuli using an action potential frequency code.<sup>1,2,7,51</sup> In other regions of the central nervous system, the processing of such frequency-coded information is known to involve frequency-selective synapses.<sup>13,26,29</sup> These synapses display short-term plasticity (STP) processes changing dynamically their efficacy over time as a function of the delay between presynaptic action potentials.<sup>6,37</sup> Therefore, networks in the spinal nociceptive system are also expected to display STP to process frequency-coded sensory information. Surprisingly, this question has been little addressed experimentally and has mostly used simple paired-pulse stimulation protocols<sup>8,20,24,43,53</sup> and very rarely protocols using trains of stimulations.<sup>9,20,27,53</sup>

Data on the impacts of stimulation trains in information processing in the dorsal horn are also pending to fully understand the mechanisms engaged by the rapidly expanding stimulation approaches used in pain alleviation such as spinal cord stimulation.<sup>17,22</sup> Together with other targets, this approach has indeed been suggested to activate inhibitory LII interneurons.<sup>22</sup>

The objective of this study was to examine short-term plasticities of GABAergic connections onto LII neurons and to

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

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

\*Corresponding author. Address: Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, 8 allée du Général Rouvillois, F-67000 Strasbourg, France. Tel.: +33388456666. E-mail address: hugels@inci-cnrs.unistra.fr (S. Hugel).

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

PAIN 163 (2022) e675–e688

© 2021 International Association for the Study of Pain

<http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002460>

determine whether such plasticities were different when the synapses involved an excitatory or an inhibitory postsynaptic (target) neuron. To this end, we prepared acute slices from mice expressing enhanced green fluorescent protein (eGFP) under the control of the GAD65 promoter.<sup>10</sup> We recorded from either eGFP-expressing (eGFP+) or eGFP-negative (eGFP-) neurons and also performed simultaneous recordings of eGFP+ and eGFP- neurons while stimulating single presynaptic GABAergic neurons.

Our results indicate that GABAergic connections onto eGFP+ neurons of LII display different short-term plasticities than those onto eGFP- neurons, favoring inhibition at frequencies occurring during intense nociceptive stimulation and favoring excitation at frequencies occurring during nociceptive stimulation of low intensity.

## 2. Methods

### 2.1. Animals

For all experiments, we used male heterozygous C57BL/6 BAC transgenic mice eGFP under the control of the GAD65 promoter obtained from Ferenc Erdelyi and Gabor Szabo (Institute of Experimental Medicine, Budapest).<sup>10</sup> In these mice, ~80% of LII eGFP+ neurons are GABA immunopositive and ~60% of GABA-immunopositive neurons are eGFP+.<sup>10</sup> These mice were interbred at the local animal facility, the Chronobiotron (agreement number: A67-2018-38). The animals were housed at room temperature (22–25°C) with a 12-hour light–dark cycle with free access to food and water. All procedures used were in accordance with laws for laboratory animal welfare and approved by the Local Ethical Committee of the University of Strasbourg (CREMEAS; agreement number: APAFIS#8138-2016121008385362 v3).

### 2.2. Slicing procedure

Adult transgenic mice (5–9 weeks) were anaesthetized with urethane (1.9 g·kg<sup>-1</sup>). Under deep anesthesia, intracardiac perfusion was performed with oxygenated ice-cold (~4°C) sucrose artificial cerebrospinal fluid (sACSF) bubbled with carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) containing (in mM) 248 sucrose, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 11 glucose, 2 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgSO<sub>4</sub>, 1.25 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 2.5 kynurenic acid. The lumbar part (L3–L5) of the spinal cord was removed by laminectomy, and 400- $\mu$ m-thick transverse slices were cut with a vibrating microtome (Leica, VT1200S). Slices were kept until recording at room temperature (~25°C) in oxygenated ACSF containing (in mM) 126 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 10 glucose.

### 2.3. Patch-clamp recordings

After recovery (~1 hour), slices were transferred to the recording chamber, maintained at 32 ± 1°C and continuously perfused by oxygenated ACSF at 3 to 4 mL/min. To isolate GABAergic inhibitory postsynaptic currents (IPSCs), glycinergic and glutamatergic ionotropic transmissions were blocked by adding in ACSF 1  $\mu$ M strychnine and 10  $\mu$ M 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), respectively. Whole-cell patch recordings were made from inhibitory (eGFP+) and putative excitatory (eGFP-) LII neurons. Recording and extracellular stimulation electrodes (4–7 M $\Omega$ ) were pulled from borosilicate glass capillaries (1.2 mm inner diameter, 1.69 mm outer diameter, Warner Instruments, Harvard Apparatus) using a P1000 electrode puller (Sutter Instruments). Recording electrodes were filled with (in mM) 140 KCl, 2 MgCl, 10 HEPES, and 2 MgATP; pH 7.3. In experiments using increased stimulation amplitudes, 1 mM

QX314 was added to this intrapipette solution to prevent spiking of the recorded neuron. Junction potentials were not corrected. Whole-cell patch clamp recordings (in current-clamp and voltage-clamp recording modes) were made using a MultiClamp 700A amplifier (Molecular Devices). Signals were low-pass filtered at 5 kHz, sampled at 20 kHz, digitized using a BNC-2110 data acquisition card (National Instruments) and acquired with Strathclyde Electrophysiology Software (WinWCP, John Dempster, University of Strathclyde, Glasgow, United Kingdom).

### 2.4. Experimental design

Our recordings started in the current-clamp mode. Holding current was adjusted to keep the recorded neuron at a membrane potential of -60 mV. In this mode, firing patterns were determined in response to 1-s long depolarizing current injections through the recording electrode (20–80 pA in 20 pA steps). For some experiments in the current-clamp mode, we simulated excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) by injecting EPSC traces. These EPSC traces were constructed by averaging excitatory postsynaptic currents evoked by local electrical extracellular stimulation (eEPSCs) recorded in LII neurons (same protocol as for evoked inhibitory postsynaptic currents [eIPSCs] described below) with 10  $\mu$ M bicuculline and 1  $\mu$ M strychnine. In these conditions, the average eEPSC was of 88.9 ± 10.6 pA with a rise time of 2.1 ± 0.3 milliseconds and a decay time constant of 5.7 ± 0.9 milliseconds (n = 4 neurons). To simulate the convergence of excitatory inputs as suggested by Grudt and Perl (2002) who recorded C-fiber-mediated EPSCs in islet cells of above 400 pA, we injected the current corresponding to 4 times the average eEPSC we measured.

After this initial phase, neurons were recorded in the voltage-clamp mode at a holding potential of -60 mV. Monosynaptic IPSCs were evoked by local extracellular electrical stimulation. This stimulation was performed by applying current steps (0.25 ms; 0.10–0.40 mA; average 0.21 ± 0.01 mA) through a patch pipette filled with ACSF. This stimulation electrode was placed at a distance of 20 to 150  $\mu$ m from the cell body of the recorded neuron. For each recorded neuron, the lowest amplitude of stimulation evoking inhibitory postsynaptic currents was determined. This amplitude was increased by 0.05 mA to eIPSCs for each stimulation applied. Synaptic contacts were identified as monosynaptic unitary connections when the following criteria were satisfied: (1) all-or-none appearance of eIPSCs, (2) absence of increase in eIPSC amplitude when minimal stimulation amplitude was increased by 0.05 mA, (3) disappearance of eIPSCs when stimulation polarity was inverted, and (4) constant latency of the eIPSCs.

The same criteria were applied for simultaneous recordings of pairs of eGFP- and eGFP+ neurons connected by the same presynaptic neuron.

For all neurons, paired-pulse stimulations were applied with an interstimulation interval (ISI) of 200 milliseconds repeated every 10 seconds. In a subset of neurons, paired-pulse stimulations with multiple ISIs were applied (ISIs of 20, 50, 75, 100, 200, and 300 ms) and pairs of stimulation were separated by 10 seconds. Trains of 11 stimulations repeated 10 times were used in most experiments. Unless otherwise stated, trains applied at 5 Hz were repeated every 20 seconds, whereas trains applied at 50 Hz were applied every 60 seconds.

### 2.5. Data quantification and analysis

Action potential firing patterns were analyzed offline using Clampfit 10 (Molecular Devices). Neurons firing multiple spikes

during the whole duration of the depolarizing current step and displaying a constant interval between each spike were classified as tonic firing (tonic) type (Fig. 1A); neurons with a burst of spikes at the beginning of depolarizing current step and showing a decrease in interspike interval duration during the step as well as a progressive reduction of spike amplitudes were classified as initial bursting (IB) type (Fig. 1A); neurons fulfilling neither of these criteria were classified as “other type” of firing pattern.

Evoked inhibitory postsynaptic currents were also analyzed offline using Clampfit 10. Synaptic inhibitory transmission was quantified by measuring the amplitude of individual eIPSCs. To take into account baseline changes due to eIPSC summation, the amplitude immediately before stimulation was subtracted from the peak amplitude of each eIPSC. Unless otherwise stated, stimulation protocols were applied 10 times in each neuron and the within-cell average across trials was calculated by averaging eIPSC amplitudes from these 10 repetitions. When protocols consisted of trains of stimulations, amplitudes of eIPSCs of the same rank in the train were averaged. These within-cell averages across 10 trials were used for statistical analysis (Fig. S1, <http://links.lww.com/PAIN/B478>).

Averaging amplitudes of raw eIPSCs gives greater weight to connections in which eIPSCs display larger amplitudes. Therefore, in addition to analyzing raw eIPSC amplitudes, we calculated normalized eIPSC amplitudes. These were calculated by normalizing for each neuron the averaged eIPSC amplitudes to the averaged amplitude of the first eIPSCs in the train. This allowed to analyze relative changes in amplitude during trains regardless of the initial raw amplitude values of eIPSCs.

Both raw and normalized eIPSC amplitudes were used for statistical analysis.

For paired-pulse stimulation experiments, the paired-pulse ratio (PPR) was calculated as the amplitude of the second eIPSC divided by the amplitude of the first eIPSC.

The weighted decay time constant ( $\tau_w$ ) was calculated as described in the study by Labrakakis et al.<sup>28</sup> from biexponential fits using Equation 1.

$$\tau_w = (\tau_f \cdot A_f + \tau_s \cdot A_s) / (A_f + A_s) \quad (1)$$

where  $\tau_f$  and  $\tau_s$  are the fast and slow decay time constants, respectively, and  $A_f$  and  $A_s$  the corresponding amplitudes used as weighting factors.

For experiments with GABA<sub>B</sub> and A1 antagonists, trains of stimulations were repeated before, during, and after perfusion of the antagonists. Ten trains were applied in control conditions, and the antagonist was subsequently applied for 10 minutes. The effect of antagonists was measured after at least 3 minutes of perfusion. For each neuron, amplitudes of eIPSCs of the same rank in the 2 conditions (ie, control vs antagonist) were averaged. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM.

For some experiments, we recorded miniature IPSCs. These synaptic events were detected using WinEDR (V3.8.6, Strathclyde Electrophysiology Software, John Dempster, University of Strathclyde, Glasgow, United Kingdom) with an amplitude threshold detection algorithm and were visually inspected for validity. Peak amplitude of miniature IPSCs was determined using WinWCP (version 5.4.5). Events were detected during at least 200 seconds.

## 2.6. Statistics

Statistical analyses were performed using averaged eIPSC amplitudes (ie, within-cell average across trials) of each neurons

(Fig. S1, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). These were calculated for each neuron by averaging amplitudes of eIPSCs of the same rank (2 ranks for paired-pulse experiments and 11 ranks for trains of stimulations). The number of neurons is given as the *n* value in the Results section.

The Student *t*-test was used to compare amplitudes of isolated eIPSCs, decay time constants, and miniature IPSCs (mIPSCs) after having tested for data normality (Kolmogorov–Smirnov test,  $P > 0.05$ ).

For paired-pulse protocols, the proportions of neurons displaying a facilitation (PPR  $> 1.1$ ), a depression (PPR  $< 0.9$ ), or no change in PPR (0.9–1.1) were analyzed with a log-linear analysis performed on the 3-way contingency table of the proportion of facilitation, ISI, and eGFP+/eGFP– condition using Statistica 13 (StatSoft). The  $\chi^2$  values and *P* values given in the text correspond to those of marginal associations between the 2 parameters examined. To compare amplitudes of the 2 first eIPSCs during stimulation trains protocols, the Wilcoxon signed-rank test for paired data was used because data were not always normally distributed.

Nonlinear regression analysis<sup>38</sup> was used to analyze PPR values as a function of ISIs and changes in eIPSC amplitudes during stimulation train protocols. Individual data of all neurons were always used for curve fitting, and average values were used for illustration (Fig. S1, <http://links.lww.com/PAIN/B478>).

Paired-pulse ratio values as a function of ISIs for eGFP+ and eGFP– neurons were fitted with Equation 2.

$$Y = A1 + ((A1 - A2) \times \text{EXP}(-X/A3)) \quad (2)$$

where A1 corresponded to *Y* value for ISI = 0, A2 corresponded to the asymptotic value of the fit, and A3 corresponded to the exponential decay constant of PPR value as a function of ISIs. Parameters A1, A2, and A3 were determined by nonlinear curve fitting using KyPlot 6.0 (KyensLab, Tokyo, Japan). A global fit on the same data was also performed using the same equation. This global fit was compared with the sum of fits from separated data obtained from eGFP+ and eGFP– neurons.

Nonlinear curve fitting was used to analyze and compare changes in eIPSC amplitudes during stimulation train protocols. This analysis was performed using averaged eIPSC amplitudes of each neurons.

Amplitudes of eIPSCs as a function of their respective rank in the train were fitted using Equation 3.

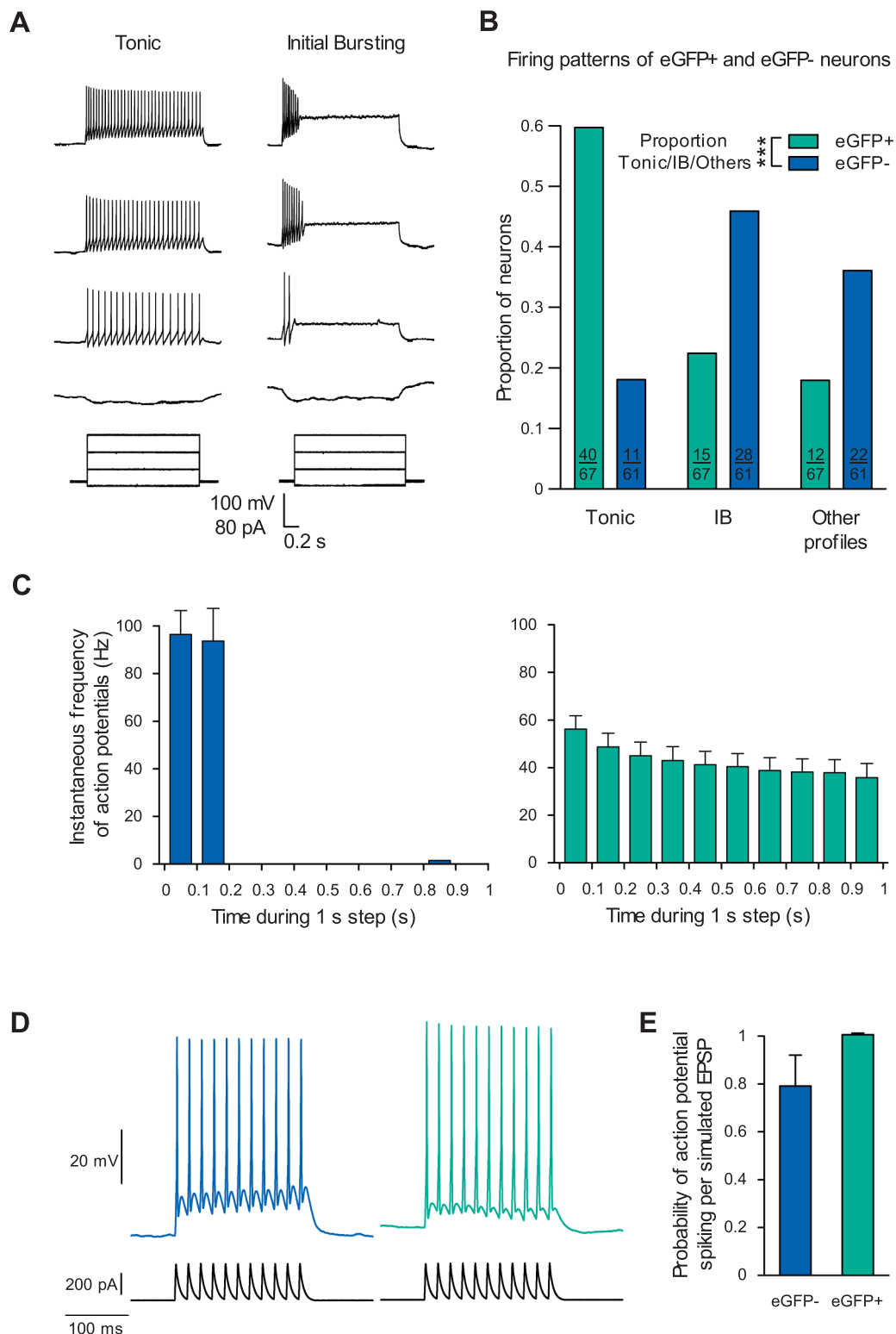
$$Y = A1 + A2 \times (1 - \text{EXP}(-X/A3)) \quad (3)$$

where A1 corresponded to *Y* value of the first eIPSCs of the train, A2 corresponded to the change in amplitude for the curve asymptote, and A3 corresponded to the constant of the exponential function.

A1 and A2 are in pA for fits of raw eIPSC amplitudes and are dimensionless for fits of normalized eIPSC amplitudes. A3 unit is the rank of stimulation in the train.

To define whether STP was expressed during trains of stimulations, ie, whether significant changes in amplitude occurred during the train, fits with Equation 3 were compared with linear fits with slope values forced to 0. When fits with Equation 3 provided statistically significant improvements with respect to the linear fit with slope value forced to 0, the connections were considered as displaying a significant STP during the corresponding protocol.<sup>38</sup>

To compare 2 different conditions (eg, eGFP– vs eGFP+ or presence/absence of antagonists), data from each conditions



**Figure 1.** Action potential firing patterns in eGFP+ and eGFP- neurons. (A) Example of a tonic firing eGFP+ neuron (left) and of an initial bursting eGFP- neuron (right). (B) A majority of eGFP+ neurons were of tonic firing type (tonic), whereas a majority of eGFP- neurons were of initial bursting (IB) type. Proportions of firing patterns were significantly different in eGFP+ and eGFP- neurons (Fisher exact test,  $P = 6.3 \cdot 10^{-6}$ ;  $n = 67$  eGFP+ neurons and 61 eGFP- neurons). (C) Instantaneous firing frequency in 100 millisecond bins in response to 1-s long 80 pA current injections in eGFP- IB neurons (left) and eGFP+ tonic neurons (right). (D) Spiking in an eGFP- (left) and an eGFP+ (right) neuron during a 50 Hz train of simulated EPSCs. (E) Probability of action potential spiking per simulated EPSPs in eGFP- neurons ( $n = 7$ ) and eGFP+ neurons ( $n = 4$ ). eGFP+, enhanced green fluorescent protein positive; eGFP-, enhanced green fluorescent protein negative; EPSP, excitatory postsynaptic potential.

were fitted with Equation 3, either individually (sum of 2 functions) or pooled (1 single function). When the sum of 2 individual fits provided statistically significant improvements about the fit of

pooled data, the 2 conditions were considered as having distinct effects.<sup>38</sup> Fits of pooled data are illustrated (in black) when the 2 conditions were not different, whereas individual fits are illustrated

(in color) when the 2 conditions were significantly different. For illustration purpose, these fits are illustrated together with the averages of “cross-trial averages.”

In the Results section, *P* value of model comparisons are given as well as the corresponding number of neurons (*n*). The significance level used for all analysis was set at 0.05. The goodness of fit was also compared by calculating for both conditions the Bayesian information criterion (BIC), Akaike information criterion (AIC), and corresponding sample size bias-corrected values (AICc).<sup>47</sup> A model was considered as better if model comparison *P* value was < 0.05 and if the model provided a reduction in AICc. The only case where the *P* value and AICc are in conflict (*P* < 0.05 and increase in AICc for the effect of DPCPX on eGFP+ neurons) is mentioned in the Results section. Details of all models (A1, A2, A3, degree of freedom, residual sum of squares, AIC, AICc, and BIC) as well as details of model comparison (F, *P*, differences in AIC, AICc, and BIC) are given in Supplementary Tables 1 to 8 (available at <http://links.lww.com/PAIN/B478>).

### 2.7. Drug application or pharmacology

All pharmacological agents were bath applied. To isolate GABAergic eIPSCs, 1  $\mu$ M strychnine and 10  $\mu$ M CNQX were present in all our electrophysiological experiments. CGP55845 ((2S)-3-[[[(1S)-1-(3,4-dichlorophenyl)ethyl]amino-2-hydroxypropyl]](phenylmethyl)phosphinic acid hydrochloride; 10  $\mu$ M, Tocris) and DPCPX (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine solid; 10  $\mu$ M, Sigma) were used to block GABA<sub>B</sub> receptors and adenosine A1 receptors, respectively. In a subset of experiments, eEPSCs were recorded in presence of strychnine (1  $\mu$ M) and bicuculline (10  $\mu$ M, sigma). Miniature IPSCs were recorded in the presence of tetrodotoxin (0.5  $\mu$ M, Latoxan). CNQX and CGP55845 were dissolved in DMSO, DPCPX was dissolved in ethanol, and strychnine in water; all were prepared as  $\times 10,000$  concentrated stock solutions. For experiments with these antagonists, analysis of changes in normalized eIPSC amplitudes allowed to detect modulations engaged during the train (phasic modulation). All substances were diluted to their final concentration in ACSF at the beginning of each experiment.

## 3. Results

### 3.1. Firing properties of enhanced green fluorescent protein-positive and enhanced green fluorescent protein-negative neurons

Lamina II neurons responded to sustained depolarizing current injections with various patterns of action potential firing.<sup>19,24,34</sup> Two main firing patterns dominated (Figs. 1A and B and S2, <http://links.lww.com/PAIN/B478>): tonic type (40%, 51/128) and IB type (34%, 43/128). Other firing patterns were less frequently observed (altogether 27%, 34/128). Most of eGFP- neurons displayed an IB firing pattern (46%, 28/61) and a lower proportion of tonic (36%, 11/61) and other firing patterns (18%, 22/61). Most of eGFP+ neurons displayed a tonic pattern (60%, 40/67) and a lower proportion of IB (22%, 15/67) and other firing patterns (18%, 12/67). The proportions of IB, tonic, and other firing patterns in eGFP- and eGFP+ neurons were significantly different (Fisher exact test,  $P = 6.3 \cdot 10^{-6}$ , Fig. 1B). The average firing frequency of both eGFP- IB neurons and eGFP+ tonic neurons was above 50 Hz during the first 200 milliseconds of 80 pA current steps ( $95.1 \pm 11.9$  Hz and  $52.4 \pm 5.7$  Hz, respectively, Fig. 1C). When EPSPs were simulated by injection of EPSCs at

50 Hz during 200 milliseconds, the proportion of EPSPs triggering an action potential was of  $79.1 \pm 13.0\%$  in eGFP- neurons (*n* = 7) and  $100.0 \pm 13.0\%$  in eGFP+ neurons which occasionally discharge more than one action potential per simulated EPSP (*n* = 4; Figs. 1D and E). These data indicate that neurons of LII are able to discharge action potentials at several tens of hertz, at least during few hundreds of milliseconds.

### 3.2. GABAergic synaptic transmission in lamina II

The average amplitude of pharmacologically isolated eIPSCs (Fig. 2A) was not significantly different when recorded in eGFP- neurons ( $-60.5 \pm 5.1$  pA; *n* = 54) and eGFP+ neurons ( $-55.6 \pm 4.4$  pA; *n* = 49) (unpaired Student *t*-test,  $t = -0.709$ , *df* = 101,  $P = 0.48$ ). Evoked inhibitory postsynaptic currents were evoked at similar stimulation amplitude intensity in eGFP- neurons ( $0.21 \pm 0.01$  mA; *n* = 53) and eGFP+ neurons ( $0.21 \pm 0.01$  mA; *n* = 45) (unpaired Student *t*-test,  $t = 0.176$ , *df* = 96,  $P = 0.86$ ).

The weighted decay time constant ( $\tau_w$ ) measured for isolated eIPSCs (Fig. 2B) was not significantly different when recorded in eGFP- neurons ( $32.8 \pm 2.8$  ms; *n* = 29) and eGFP+ neurons ( $31.1 \pm 4.5$  ms, *n* = 18) (unpaired Student *t*-test,  $t = -0.340$ , *df* = 45,  $P = 0.736$ ).

In the same preparation, the amplitude of mIPSCs (Fig. 2C) was not significantly different when recorded in eGFP- neurons ( $-16.7 \pm 0.9$  pA; *n* = 9) and eGFP+ neurons ( $-17.8 \pm 1.2$  pA; *n* = 22) (unpaired Student *t*-test,  $t = 0.526$ , *df* = 29,  $P = 0.603$ ). Therefore, eIPSC amplitude represented on average 3 times the amplitude of mIPSCs.

### 3.3. Postsynaptic target-specific paired-pulse plasticity at GABAergic connections in lamina II

Short-term synaptic plasticity was first examined using paired-pulse stimulation protocols with various ISIs.

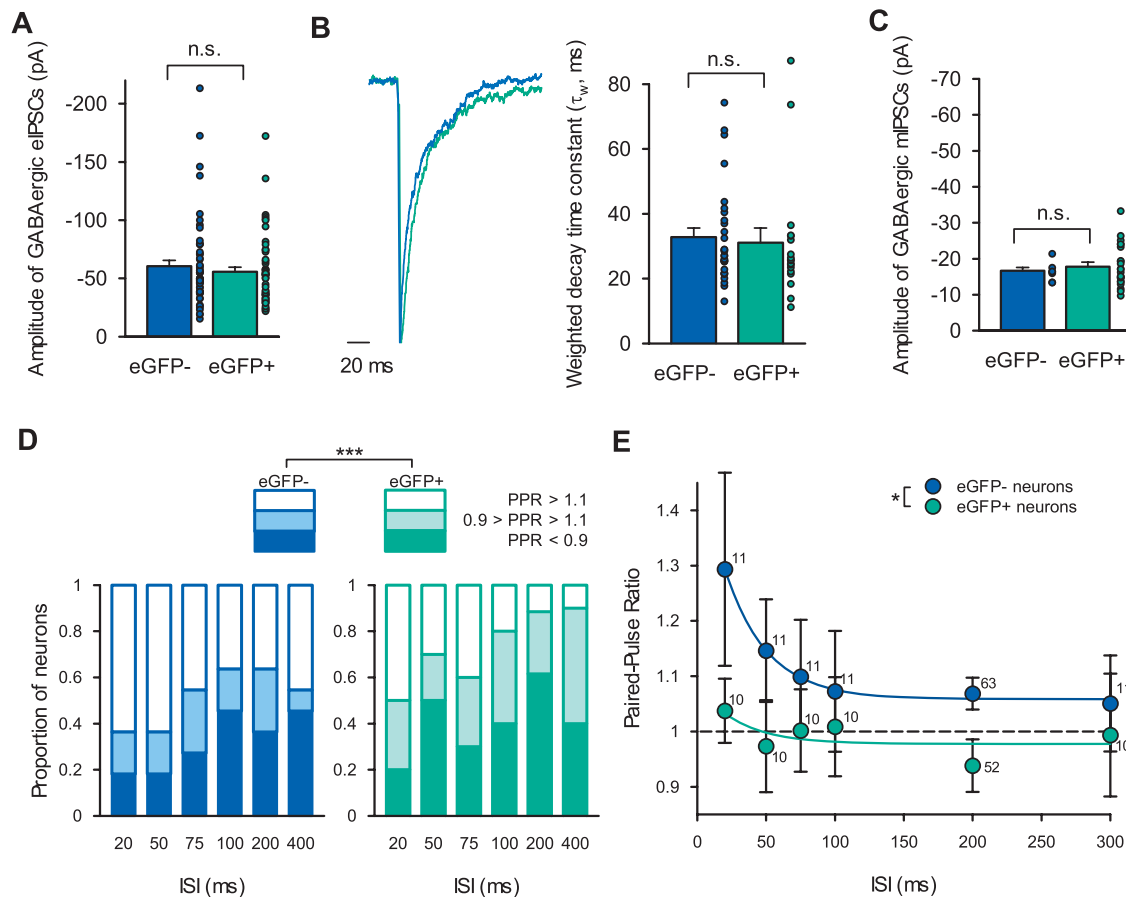
Inhibitory connections onto eGFP+ or eGFP- neurons can display paired-pulse facilitation (PPR > 1.1), paired-pulse depression (PPR < 0.9), or no change in PPR (PPR: 0.9-1.1). The proportions of neurons in each category were significantly different in eGFP- and eGFP+ neurons (Fig. 2D;  $\chi^2 = 11.97$ ;  $P = 0.003$ ), with a larger proportion of paired-pulse facilitation in eGFP- neurons.

Values of PPR at various ISIs were significantly different in eGFP+ and eGFP- neurons (nonlinear curve fitting,  $P = 7.2 \cdot 10^{-3}$ , Table S1, <http://links.lww.com/PAIN/B478>, Fig. 2E). In eGFP+ neurons, the average PPR values were close to 1 at all tested ISIs, whereas in eGFP- neurons, the average PPR values were above 1.1 for ISIs below 100 milliseconds and progressively decreased at longer ISIs.

These data indicate that GABAergic connections onto eGFP- neurons preferentially displayed facilitation at short ISIs and that GABAergic connections onto eGFP+ neurons preferentially displayed depression at long ISIs. Although PPR revealed differences between connections onto eGFP+ and eGFP- neurons, incoming information from the periphery is usually under the form of trains of action potentials rather than isolated pairs of impulses. In the following experiments, we therefore examined the effect of trains of stimulations.

### 3.4. Short-term plasticity during 5 Hz activation of GABAergic connections in lamina II

We examined the short-term synaptic plasticity expressed by GABAergic connections onto LII neurons during their repeated activation at low frequency. We applied trains of 11 stimulations at 5 Hz (Fig. 3A). These trains were repeated 10 times at an interval



**Figure 2.** GABAergic IPSCs recorded in eGFP+ and eGFP– neurons. (A) Amplitude of eIPSCs is similar in eGFP+ (green) and eGFP– neurons (blue). (B) Left: example of eIPSCs recorded in an eGFP+ and an eGFP– neuron (average of 10 eIPSCs; eIPSCs are scaled). Right: Weighted decay time constant of GABAergic eIPSCs is similar in eGFP+ and eGFP– neurons. (C) Amplitudes of mIPSCs are similar in eGFP+ and eGFP– neurons. (D) Proportions of neurons displaying a paired-pulse facilitation (PPR > 1.1), a paired-pulse depression (PPR < 0.9), or no change in PPR (0.9–1.1) at various ISIs in eGFP+ and eGFP– neurons. These proportions are significantly different in eGFP+ and eGFP– neurons (log-linear analysis;  $P = 0.003$ ). (E) Paired-pulse ratios as a function of ISIs were significantly different in eGFP+ and eGFP– neurons (nonlinear curve fitting,  $P = 7.20 \cdot 10^{-3}$ ). Curves correspond to fits with monoexponential functions. Numbers beside the points correspond to the number of neurons recorded. eIPSC, evoked inhibitory postsynaptic current; IPSC, inhibitory postsynaptic current; ISI, interstimulation interval; PPR, paired-pulse ratio.

of 20 seconds. For these experiments, 54 eGFP– and 49 eGFP+ neurons were recorded (averages from individual neurons Figs. S3A and B, <http://links.lww.com/PAIN/B478>; individual neurons Figs. S4A–D, <http://links.lww.com/PAIN/B478>).

Evolution of eIPSC amplitudes during 5 Hz trains remained similar in the first 5 and the last 5 trains for both eGFP– and eGFP+ neurons, indicating that no train-to-train plasticity was engaged under these experimental conditions ( $P_{\text{eGFP-}} = 0.889$ ,  $P_{\text{eGFP+}} = 0.312$ , Table S2, <http://links.lww.com/PAIN/B478>, Fig. 3). Moreover, eIPSC2/eIPSC1 remained unchanged in the first 5 and the last 5 trains for connections on both eGFP– and eGFP+ neurons ( $P_{\text{eGFP-}} = 0.678$ ,  $P_{\text{eGFP+}} = 0.223$ , Wilcoxon signed-rank test for paired data, Fig. S5A, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). Therefore, for each neuron, amplitudes of eIPSCs of the same rank in all 10 trains were averaged.

The average amplitude of the first eIPSCs of 5 Hz trains was not significantly different when recorded in eGFP– or eGFP+ neurons ( $P = 0.349$ ). However, evolution of normalized eIPSC amplitudes during 5 Hz trains was significantly different in eGFP– or eGFP+ neurons ( $P = 1.94 \cdot 10^{-14}$ , Table S2, <http://links.lww.com/PAIN/B478>, Fig. 3B). Such significant difference between eGFP– and eGFP+ neurons was also observed in experiments where stimulation amplitudes were increased from 0.20 mA to 0.45 mA (11 eGFP– neurons and 11 eGFP+ neurons,  $P_{\text{normalized}} = 8.70 \cdot 10^{-15}$ , Table S3 and Fig. S6,

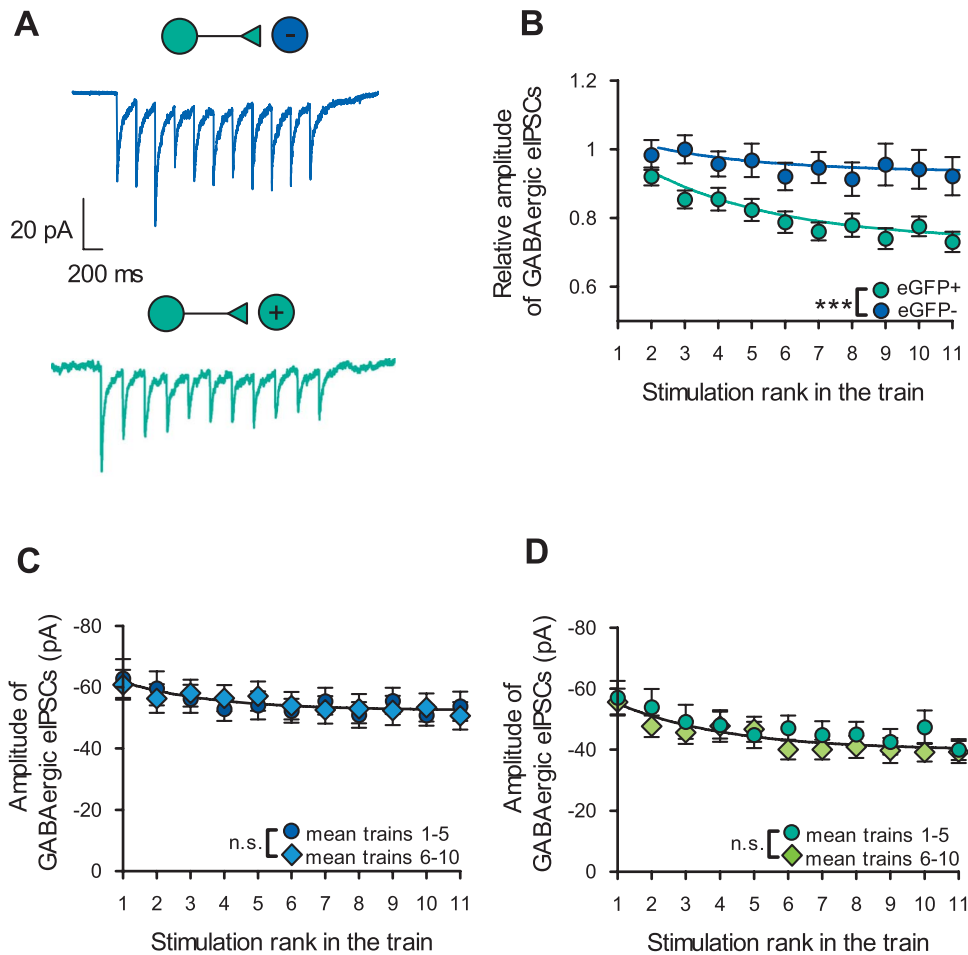
<http://links.lww.com/PAIN/B478>), indicating that changes in stimulation efficacy during trains of stimulations were unlikely to influence our results.

In eGFP– neurons, amplitudes of normalized eIPSCs did not significantly change (Fig. 3B and S3B, <http://links.lww.com/PAIN/B478>), indicating that no plasticity was expressed during the train ( $P_{\text{normalized}} = 0.451$ , Table S2, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). Contrasting with these data, the amplitude of normalized eIPSCs recorded from eGFP+ neurons significantly decreased during the train ( $P_{\text{normalized}} = 4.17 \cdot 10^{-7}$ , Fig. 3B), decreasing by 20% at the asymptote (see parameters of the curve fitting Table S2, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). Similar data were obtained for raw eIPSC amplitudes (Fig. S3A and Table S2, <http://links.lww.com/PAIN/B478>).

These data indicated that on average, GABAergic connections onto eGFP– neurons displayed no plasticity during 5 Hz trains, whereas connections onto eGFP+ neurons displayed strong depression.

### 3.5. Short-term plasticity during 50 Hz activation of GABAergic connections in lamina II

We examined the short-term synaptic plasticity expressed by GABAergic connections onto LII neurons during their repetitive



**Figure 3.** Short-term plasticity of GABAergic connections during trains at 5 Hz. (A) Representative average current trace recorded in an eGFP<sup>-</sup> neuron (top) and eGFP<sup>+</sup> neuron (bottom). (B) Relative amplitudes of GABAergic eIPSCs recorded in eGFP<sup>-</sup> and eGFP<sup>+</sup> neurons (amplitudes relative to eIPSCs of rank 1). (C, D) Changes in eIPSC amplitudes during the trains remained similar in the first 5 and the last 5 trains for connections on both eGFP<sup>-</sup> (C) and eGFP<sup>+</sup> (D) neurons. Results of nonlinear regressions used to compare conditions are given as  $P > 0.5$ ; n.s. and  $P < 0.001$ ; \*\*\*  $n = 54$  eGFP<sup>-</sup> and  $n = 49$  eGFP<sup>+</sup> neurons. Details of regressions and the corresponding analysis are given in Supplementary Table 1 (available at <http://links.lww.com/PAIN/B478>). eGFP<sup>+</sup>, enhanced green fluorescent protein positive; eGFP<sup>-</sup>, enhanced green fluorescent protein negative; eIPSC, evoked inhibitory postsynaptic current.

activation at high frequency ( $n = 27$  eGFP<sup>-</sup> neurons and  $n = 19$  eGFP<sup>+</sup> neurons). We applied trains of 11 stimulations at 50 Hz (Fig. 4A). These trains were repeated 10 times (averages from individual neurons Figs. S3C-F, <http://links.lww.com/PAIN/B478>; individual neurons Figs. S4E-H, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). In a first set of experiments, trains were repeated with long intertrain intervals of 60 seconds to limit the development of train-to-train plasticities. In these conditions, evolution of eIPSC amplitudes during 50 Hz trains remained similar in the first 5 and the last 5 trains for both eGFP<sup>-</sup> and eGFP<sup>+</sup> neurons ( $P_{\text{eGFP}^-} = 0.278$ ;  $P_{\text{eGFP}^+} = 0.391$ , Fig. 4, Table S4, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). This indicates, that no train-to-train plasticity was engaged under these experimental conditions allowing to average the traces of the 10 trains for each neuron.

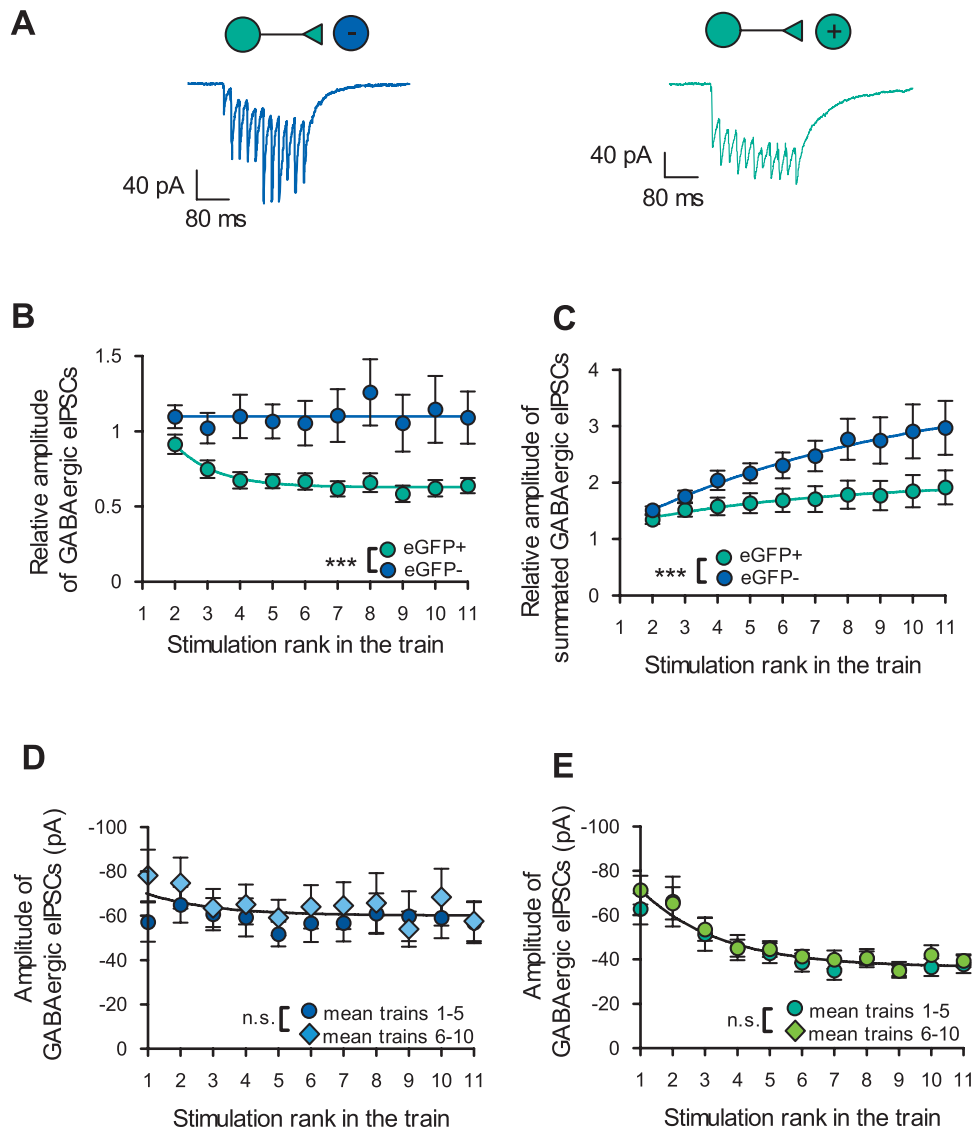
Nevertheless, the plasticity remained similar in the first 5 and the last 5 trains, whereas eIPSC2/eIPSC1 significantly decreased for connections onto eGFP<sup>-</sup> neurons but not onto eGFP<sup>+</sup> neurons ( $P_{\text{eGFP}^-} = 0.048$ ,  $P_{\text{eGFP}^+} = 0.098$ , Wilcoxon signed-rank test for paired data, Fig. S5, <http://links.lww.com/PAIN/B478>), suggesting that the facilitation observed in eGFP<sup>-</sup> neurons during paired-pulse stimulation at short intervals (Fig. 2E) is replaced by other types of plasticities during repeated trains of stimulation at 50 Hz.

Evolution of eIPSC amplitudes during 50 Hz trains was significantly different in eGFP<sup>-</sup> or eGFP<sup>+</sup> neurons for both normalized amplitudes ( $P = 1.88 \cdot 10^{-9}$ , Table S4, <http://links.lww.com/PAIN/B478>, Fig. 4B) and raw amplitudes ( $P = 3.73 \cdot 10^{-8}$ , Table S4 and Fig. S3C, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). In eGFP<sup>-</sup> neurons, amplitudes of normalized eIPSCs did not significantly change, indicating that no plasticity was expressed during the train ( $P_{\text{normalized}} = 0.909$ , Table S1.4, <http://links.lww.com/PAIN/B478>, Fig. 4B). By contrast, the amplitude of normalized eIPSCs recorded in eGFP<sup>+</sup> neurons significantly decreased during the train ( $P_{\text{normalized}} = 9.03 \cdot 10^{-6}$ , Table S4, <http://links.lww.com/PAIN/B478>, Fig. 4B), decreasing by 28% at the asymptote (see parameters of the curve fitting, Table S4, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). Similar data were obtained for raw eIPSC amplitudes (Fig. S3C and Table S4, <http://links.lww.com/PAIN/B478>).

These data indicated that on average, GABAergic connections onto eGFP<sup>-</sup> neurons displayed no plasticity during 50 Hz trains, whereas connections onto eGFP<sup>+</sup> neurons strongly depressed.

### 3.6. Comparison of plasticities at 5 Hz and 50 Hz

The evolution of normalized eIPSC amplitudes during 5 Hz and 50 Hz trains was significantly different for both eGFP<sup>-</sup> neurons ( $P =$



**Figure 4.** Short-term plasticity of GABAergic connections during trains at 50 Hz. (A) Representative average current trace recorded in an eGFP– neuron (left) and eGFP+ neuron (right). (B) Relative amplitudes of GABAergic eIPSCs recorded in eGFP– and eGFP+ neurons (amplitudes relative to eIPSCs of rank 1). (C) Same data as in (B) but with eIPSCs measured from the basal current level before the first eIPSC (summated eIPSC amplitudes). (D, E) Changes in eIPSC amplitudes during the trains remained similar in the first 5 and the last 5 trains for connections on both eGFP– (D) and eGFP+ (E) neurons. Results of nonlinear regressions used to compare conditions are given as  $P > 0.5$ : n.s. and  $P < 0.001$ : \*\*\*  $n = 27$  eGFP– and  $n = 19$  eGFP+ neurons. Details of regressions and the corresponding analysis are given in Supplementary Table 1 (available at <http://links.lww.com/PAIN/B478>). eGFP+, enhanced green fluorescent protein positive; eGFP–, enhanced green fluorescent protein negative; eIPSC, evoked inhibitory postsynaptic current.

$5.23 \cdot 10^{-3}$ , Table S5, <http://links.lww.com/PAIN/B478>, **Figs. 3B and 4B**) and eGFP+ neurons ( $P = 2.76 \cdot 10^{-10}$ , Table S5, <http://links.lww.com/PAIN/B478>, **Figs. 3B and 4B**), indicating that the characteristics of the effects depended on the frequency (see parameters of the curve fitting, Table S5, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). In eGFP+ neurons, the decrease of normalized eIPSCs during 5 Hz and 50 Hz differed in both the magnitude and the kinetic of the depression. The decrease of normalized amplitudes at the asymptote was of 20% with 5 Hz protocols, whereas it was of 28% with 50 Hz protocols. In these neurons, 90% of asymptotic values were reached at the 11th stimulation with 5 Hz protocols and before the fifth stimulation with 50 Hz protocols.

These data indicate that plasticities expressed by GABAergic connections depended on both the neurochemical identity of the postsynaptic target neuron and the frequency of electrical activity of the presynaptic GABAergic neuron.

### 3.7. Summation of evoked inhibitory postsynaptic currents during trains at 50 Hz

During 50 Hz trains, the eIPSCs had not fully returned to baseline at the onset of the following stimulation, a situation that resulted in their summation. We therefore reanalyzed our data measuring summated eIPSC amplitudes from the basal holding current of each train (**Figs. 4C**, S3E, <http://links.lww.com/PAIN/B478>; statistics Table S4, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). Evolution of summated eIPSC amplitudes during 50 Hz trains was significantly different in eGFP– and eGFP+ neurons for both normalized amplitudes ( $P = 4.90 \cdot 10^{-7}$ , **Fig. 4C**) and raw amplitudes ( $P = 4.12 \cdot 10^{-8}$ , Fig. S3E, <http://links.lww.com/PAIN/B478>).

Amplitudes of summated eIPSCs significantly increased during 50 Hz trains in eGFP– neurons ( $P_{\text{normalized}} = 1.15 \cdot 10^{-5}$ , **Fig. 4C**;



$P_{\text{raw}} = 3.98 \cdot 10^{-10}$ , Table S4 and Fig. S3E, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). At the asymptote, the increase in raw amplitude was of 123.33 pA and represented an increase by 2.29-fold of the normalized amplitudes. Importantly, only 86.5% of the asymptotic value was reached at the end of the train (ie, 11th eIPSC), suggesting that further summation was still possible with longer lasting trains. In eGFP+ neurons, no significant increase was detected for normalized summated eIPSCs ( $P_{\text{normalized}} = 6.76 \cdot 10^{-2}$ , Table S4, <http://links.lww.com/PAIN/B478>, **Fig. 4C**) but raw summated eIPSCs significantly increased during 50 Hz trains ( $P_{\text{raw}} = 2.67 \cdot 10^{-3}$ , Table S4 and Fig. S3E, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). In these neurons, the increase in raw summated amplitude was of 44.47 pA and 95% of the asymptotic value was reached before the sixth eIPSC, indicating that maximal summation is reached after few eIPSCs.

This difference between eGFP– and eGFP+ neurons in eIPSC summation during 50 Hz trains was not caused by differences in deactivation kinetics of isolated eIPSCs because these were similar in eGFP– and eGFP+ neurons (see above).

These data indicated that GABAergic connections onto eGFP– and eGFP+ neurons displayed different characteristics of short-term plasticities under high-frequency activity: connections onto eGFP+ neurons showed strong depression and limited summation, whereas connections onto eGFP– neurons showed no depression and large summation.

### 3.8. Distinct short-term plasticity in simultaneously recorded enhanced green fluorescent protein–negative and enhanced green fluorescent protein–positive neurons.

We next defined whether connections from a given presynaptic neuron displayed distinct short-term plasticities when the postsynaptic neuron was eGFP– or eGFP+. To this end, we performed simultaneous recordings of eGFP– and eGFP+ neurons and searched for a presynaptic neuron connecting the recorded ones. For each pair of neuron, we subtracted the normalized eIPSC amplitudes recorded on eGFP+ neurons from those recorded on eGFP– neurons (**Fig. 5**).

For both 5 Hz and 50 Hz trains, the relative eIPSC amplitude difference was significantly larger than zero ( $P_{5\text{Hz}} = 1.66 \cdot 10^{-6}$ ,  $n = 6$  pairs;  $P_{50\text{Hz}} = 3.61 \cdot 10^{-6}$ ,  $n = 4$  pairs, Table S6, <http://links.lww.com/PAIN/B478>), indicating that eIPSCs recorded in eGFP+ neurons depressed with respect to eIPSCs simultaneously recorded in eGFP– neurons.

These data indicated that synapses involving the same presynaptic neuron expressed postsynaptic target-specific plasticities.

### 3.9. Target-specific short-term plasticity involving GABA<sub>B</sub> receptors

We next assessed whether the STP of GABAergic connections onto LII neurons may involve GABA<sub>B</sub> receptors activated by synaptically released GABA (**Fig. 6**, S7, <http://links.lww.com/PAIN/B478>, statistics Table S7, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). The protocols of 10 trains of stimulations used in the previous experiments were applied twice, ie, before and during bath application of 10  $\mu\text{M}$  CGP55845, a GABA<sub>B</sub> receptors antagonist. First, trains at 5 Hz were repeated every 20 seconds, whereas trains at 50 Hz were repeated every 60 seconds.

When evolution of raw eIPSC amplitudes was considered, no significant effects of CGP55845 were detected during trains at 5 and 50 Hz in neither eGFP– nor eGFP+ neurons ( $P_{\text{eGFP–}, 5\text{Hz}} = 0.892$ ,  $n = 6$ ;  $P_{\text{eGFP–}, 50\text{Hz}} = 0.571$ ,  $n = 12$ ;  $P_{\text{eGFP+}, 5\text{Hz}} = 0.881$ ,

$n = 8$ ;  $P_{\text{eGFP+}, 50\text{Hz}} = 0.448$ ; Figs. S7B, E, H, K, <http://links.lww.com/PAIN/B478>), indicating that GABA<sub>B</sub> receptors were not tonically controlling these connections under these conditions.

Because GABA<sub>B</sub> receptors may be activated in a phasic manner by the GABA released during the train of activity, we also analyzed effects of CGP55845 on eIPSC amplitudes normalized to the first eIPSCs of the control trains (**Figs. 6**, S7 and Table S7, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). Normalized eIPSCs recorded in eGFP– neurons were not modified in the presence of CGP55845 during both trains at 5 Hz and at 50 Hz ( $P_{\text{eGFP–}, 5\text{Hz}} = 0.900$ ,  $n = 6$ ;  $P_{\text{eGFP–}, 50\text{Hz}} = 0.232$ ,  $n = 12$ , **Figs. 6A and B**). Interestingly, in the presence of CGP55845, amplitudes of normalized eIPSCs recorded in eGFP+ neurons during trains at 5 Hz were significantly increased by 38% with respect to control trains ( $P = P_{\text{eGFP+}, 5\text{Hz}} = 1.11 \cdot 10^{-10}$ ,  $n = 8$ , **Fig. 6C**). A weak inhibitory effect of CGP55845 was observed during trains at 50 Hz ( $P_{\text{eGFP+}, 50\text{Hz}} = 6.05 \cdot 10^{-3}$ ,  $n = 6$ , **Fig. 6D**).

Because trains at 5 Hz were repeated every 20 seconds and trains at 50 Hz every 60 seconds, the longer delay for 50 Hz trains may be involved in the lack of CGP55845 effect at this frequency.

Nevertheless, CGP55845 had no effect when trains at 50 Hz were repeated every 20 seconds ( $P = 0.330$ ;  $n = 7$ , **Fig. 6E**), indicating that the effect of CGP55845 was not depending on the delay between trains.

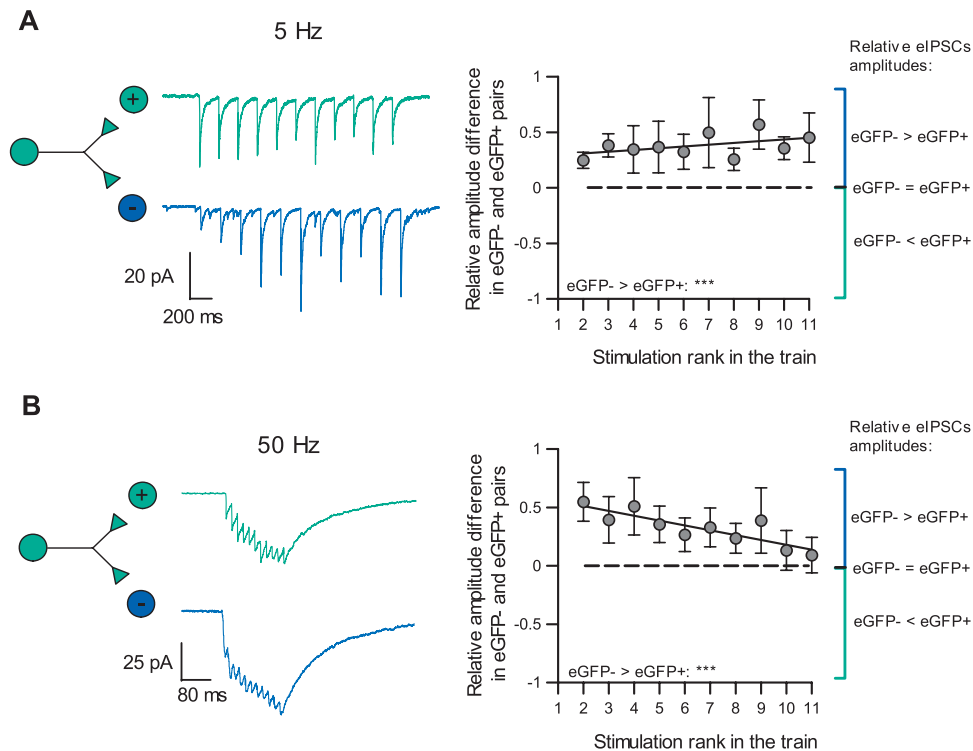
Importantly, in eGFP+ neurons, during trains at 50 Hz repeated every 20 seconds, control eIPSC amplitudes were larger than during protocols repeated every 60 seconds ( $P = 2.75 \cdot 10^{-9}$ ) and similar to amplitudes recorded in the presence of CGP55845 during trains at 5 Hz repeated every 20 seconds ( $P = 0.380$ ). This suggested that facilitating mechanisms engaged at 50 Hz might have overcome an inhibition by GABA<sub>B</sub> receptors (compare amplitudes **Figs. 6D and E**).

These results indicated that under our experimental conditions, GABA<sub>B</sub> receptors are involved in a phasic modulation of GABAergic connections between LII neurons. This involvement of GABA<sub>B</sub> receptors is target-specific, and it only occurs at synapses between 2 GABAergic neurons and at low stimulation frequency (ie, at 5 Hz).

### 3.10. Target-specific and frequency-dependent tonic inhibition involving adenosine A1 receptors

Because synaptic vesicles contain ATP which can be rapidly hydrolyzed into adenosine by extracellular ectonucleotidases,<sup>12</sup> we checked whether the STP of GABAergic connections onto LII neurons might involve the activation of adenosine A1 receptors (**Fig. 7**, S8, <http://links.lww.com/PAIN/B478>, statistics Table S8, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). Protocols of 10 trains of stimulations as described previously were applied twice: before and during bath application of 10  $\mu\text{M}$  DPCPX, an antagonist of A1 receptors.

In eGFP– neurons (**Figs. 7A–C**), DPCPX significantly increased raw eIPSC amplitudes during trains at 5 Hz repeated every 20 seconds ( $P_{\text{eGFP–}, 5\text{Hz}} = 6.28 \cdot 10^{-16}$ ,  $n = 9$ , **Fig. 7A**) and trains at 50 Hz repeated every 20 seconds ( $P_{\text{eGFP–}, 50\text{Hz}} = 2.40 \cdot 10^{-3}$ ,  $n = 9$ , **Fig. 7C**) but not during trains at 50 Hz repeated every 60 seconds ( $P_{\text{eGFP–}, 50\text{Hz}} = 0.119$ ,  $n = 7$ , **Fig. 7B**). In these neurons, no effect of DPCPX was detected on eIPSC amplitudes normalized to the first eIPSCs of the control trains (Fig. S8, <http://links.lww.com/PAIN/B478>), neither at 5 Hz every 20 seconds ( $P_{\text{eGFP–}, 5\text{Hz}} = 0.777$ ,  $n = 9$ , Fig. S8C, <http://links.lww.com/PAIN/B478>), nor at 50 Hz every 20 seconds ( $P_{\text{eGFP–}, 50\text{Hz}} = 0.050$ ,  $n = 9$ , Fig. S8I, <http://links.lww.com/PAIN/B478>), nor at 50 Hz every 60 seconds ( $P_{\text{eGFP–}, 50\text{Hz}} = 0.600$ ,  $n = 7$ , Fig. S8F, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). Effects on raw but not



**Figure 5.** Distinct short-term plasticities in simultaneously recorded eGFP<sup>-</sup> and eGFP<sup>+</sup> neurons. (A) Short-term plasticity during stimulation trains at 5 Hz. Left: representative average current trace simultaneously recorded in an eGFP<sup>-</sup> neuron (blue) and eGFP<sup>+</sup> neuron (green). Right: for each pair of eGFP<sup>-</sup> and eGFP<sup>+</sup> neuron and for all ranks during the train, the difference in relative eIPSC amplitude is calculated. This difference is significantly larger than zero, indicating that the relative increase in amplitude during the train at 5 Hz is larger in eGFP<sup>-</sup> than that in eGFP<sup>+</sup> neurons ( $P < 0.001$ ; \*\*\*,  $n = 6$  pairs). (B) Short-term plasticity during stimulation trains at 50 Hz. Left: representative average current trace simultaneously recorded in an eGFP<sup>-</sup> neuron (blue) and eGFP<sup>+</sup> neuron (green). Right: for each pair of eGFP<sup>-</sup> and eGFP<sup>+</sup> neuron and for all ranks during the train, the difference in relative eIPSC amplitude is calculated. This difference is significantly larger than zero, indicating that the relative increase in amplitude during the train at 50 Hz is larger in eGFP<sup>-</sup> than that in eGFP<sup>+</sup> neurons ( $P < 0.001$ ; \*\*\*,  $n = 4$  pairs). Linear regressions of the data were compared with a linear regression with a slope set at 0 which would correspond to no differences in eIPSC amplitudes in eGFP<sup>-</sup> and eGFP<sup>+</sup> neurons. Details of regressions and the corresponding analysis are given in Supplementary Table 1 (available at <http://links.lww.com/PAIN/B478>). eGFP<sup>+</sup>, enhanced green fluorescent protein positive; eGFP<sup>-</sup>, enhanced green fluorescent protein negative; eIPSC, evoked inhibitory postsynaptic current.

normalized amplitudes indicated that adenosine tonically controlled GABAergic connections onto eGFP<sup>-</sup> neurons. This tonic control was only engaged when trains were repeated every 20 seconds and not every 60 seconds, indicating that the tone of adenosine-controlling GABAergic connections onto eGFP<sup>-</sup> neurons was linked to the activity of these synapses.

In eGFP<sup>+</sup> neurons (Figs. 7D and E), DPCPX increased raw eIPSC amplitudes during both trains at 5 Hz repeated every 20 seconds ( $P_{\text{eGFP}^+, 5 \text{ Hz}} = 1.56 \cdot 10^{-2}$ ,  $n = 9$ , Fig. 7D) and trains at 50 Hz repeated every 60 seconds ( $P_{\text{eGFP}^+, 50 \text{ Hz}} = 3.70 \cdot 10^{-2}$ ,  $n = 7$ , Fig. 7E). At both frequencies, the effect of DPCPX on eGFP<sup>+</sup> neurons was statistically significant ( $P$ -value  $< 0.05$ ), but the hypothesis of a difference did not unambiguously correspond to the most parsimonious explanation of the data (only AIC but not AICc was lower, see Table S8, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). In these eGFP<sup>+</sup> neurons, no effect of DPCPX was detected on eIPSC amplitudes normalized to the first eIPSCs of the control trains (Fig. S8, <http://links.lww.com/PAIN/B478>) at 5 Hz every 20 seconds ( $P_{\text{eGFP}^+, 5 \text{ Hz}} = 0.191$ ,  $n = 9$ , Fig. S8L, <http://links.lww.com/PAIN/B478>), but a weak effect was detected at 50 Hz every 60 seconds ( $P_{\text{eGFP}^+, 50 \text{ Hz}} = 6.18 \cdot 10^{-3}$ ,  $n = 7$ , Fig. S8O, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). Effects on raw but not normalized amplitudes indicated that adenosine tonically controlled GABAergic connections onto eGFP<sup>+</sup> neurons. On these neurons, the effect of adenosine was kept when trains were repeated every 60 seconds.

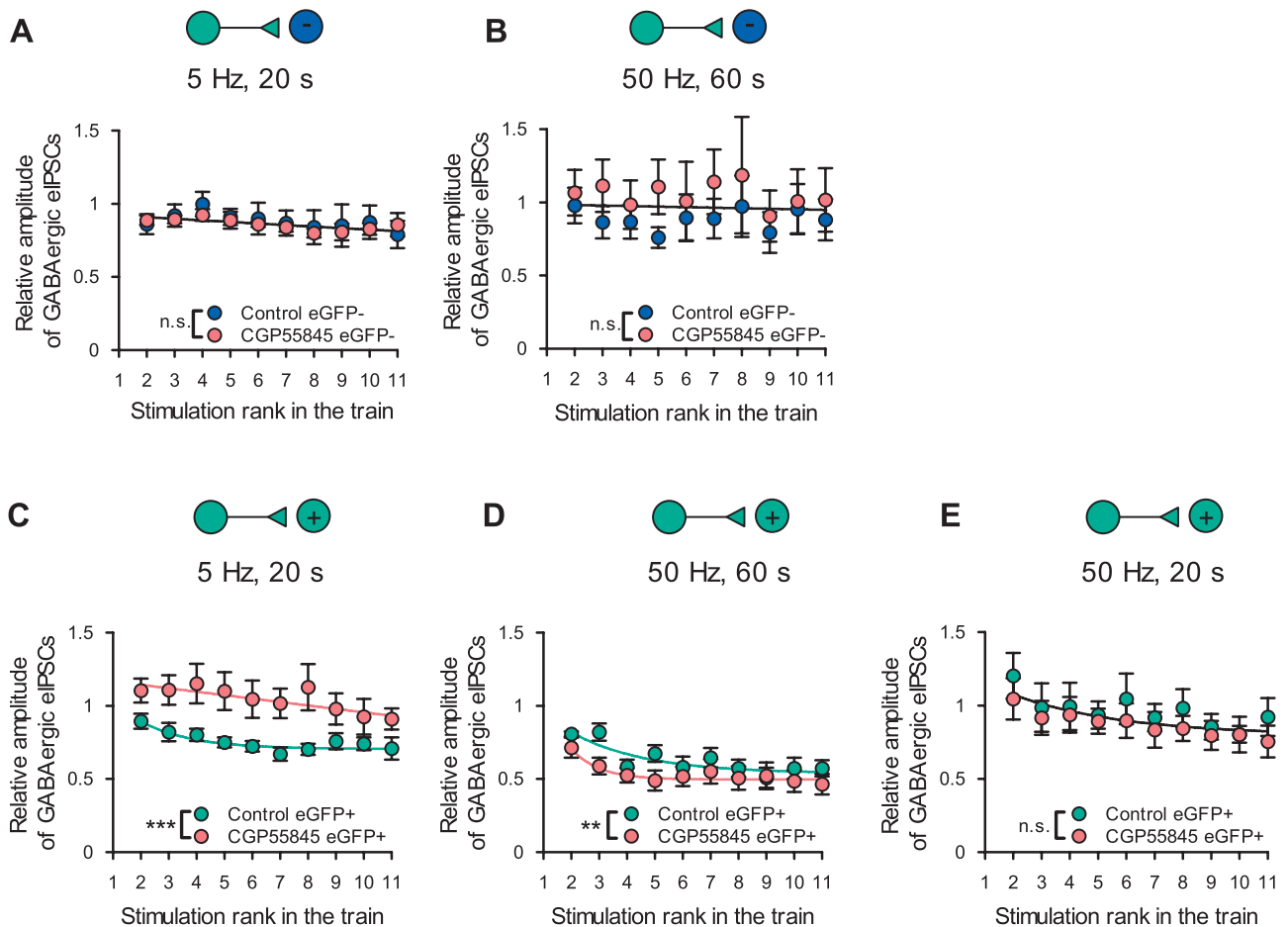
Interestingly, the tonic control by adenosine was significantly larger on connections onto eGFP<sup>-</sup> neurons than on connections onto eGFP<sup>+</sup> neurons ( $P = 2.73 \cdot 10^{-8}$ ; Fig. 7F). The average increase in amplitude during 5 Hz trains was of  $47.3 \pm 2.9$  pA in eGFP<sup>-</sup> neurons, whereas it was of  $15.8 \pm 1.5$  pA in eGFP<sup>+</sup> neurons.

These data indicated that A1 receptors could tonically inhibit GABAergic connections in LII.

This tonic inhibition was stronger on connections onto eGFP<sup>-</sup> neurons. In these neurons, this tonic control was only engaged when trains were repeated at short intervals.

#### 4. Discussion

Short-term plasticity is of major importance in information processing in sensory systems where the average number of spikes per unit of time encodes the intensity of adequate stimuli.<sup>1,2,7,51</sup> Using mice expressing eGFP under the control of the GAD65 promoter, we demonstrated that LII GABAergic connections onto putative inhibitory neurons (eGFP<sup>+</sup>) display different short-term plasticities than those onto putative excitatory neurons (eGFP<sup>-</sup>). Importantly, in the transgenic mice we used, ~80% of LII eGFP<sup>+</sup> neurons were shown to be GABA immunopositive and ~60% of GABA-immunopositive neurons express eGFP.<sup>10</sup> Therefore, eGFP<sup>+</sup> neurons mainly represent GABAergic neurons and eGFP<sup>-</sup> neurons excitatory neurons, although the



**Figure 6.** Effect of a GABA<sub>B</sub> receptor antagonist on GABAergic eIPSCs during trains of stimulations. (A-E) Average normalized amplitudes of GABAergic eIPSCs during trains of stimulations at 5 Hz and 50 Hz, before (blue and green) and during bath application of 10 μM CGP55845 (red), a GABA<sub>B</sub> receptors antagonist. For each neuron, trains of 11 stimulations were repeated 10 times in control condition and 10 times during bath application of 10 μM CGP55845. The type of neuron recorded (eGFP<sup>-</sup> or eGFP<sup>+</sup>), the frequency of stimulation (5 Hz or 50 Hz), and the interval between trains (20 seconds or 60 seconds) are given on the top of each panel. (A, B) CGP55845 had no effect on GABAergic connections onto eGFP<sup>-</sup> neurons, neither during trains at 5 Hz (A, n = 6 neurons) nor during trains at 50 Hz (B, n = 12 neurons). (C-E) In eGFP<sup>+</sup> neurons, CGP55845 significantly increased normalized eIPSC amplitudes during 5 Hz trains repeated every 20 seconds (C, n = 8 neurons) but neither during 50 Hz trains repeated every 60 seconds (D, n = 6 neurons) nor 50 Hz trains repeated every 20 seconds (E, n = 7 neurons). Results of nonlinear regressions used to compare conditions are given as  $P > 0.5$ : n.s.,  $0.05 < P < 0.01$ : \*, and  $P < 0.001$ : \*\*\*. Details of regressions and the corresponding analysis are given in Supplementary Table 1 (available at <http://links.lww.com/PAIN/B478>). eGFP<sup>+</sup>, enhanced green fluorescent protein positive; eGFP<sup>-</sup>, enhanced green fluorescent protein negative; eIPSC, evoked inhibitory postsynaptic current.

matching is not perfect. This may however partly explain the larger data dispersion observed in eGFP<sup>-</sup> neurons (eg, Fig. S4BD, <http://links.lww.com/PAIN/B478>).

Nevertheless, the strong difference in STP that we observed when comparing eGFP<sup>-</sup> and eGFP<sup>+</sup> neurons will probably have an impact on the excitation–inhibition balance within LII networks and affect the processing of nociceptive information within the dorsal horn.

#### 4.1. Action potential firing patterns

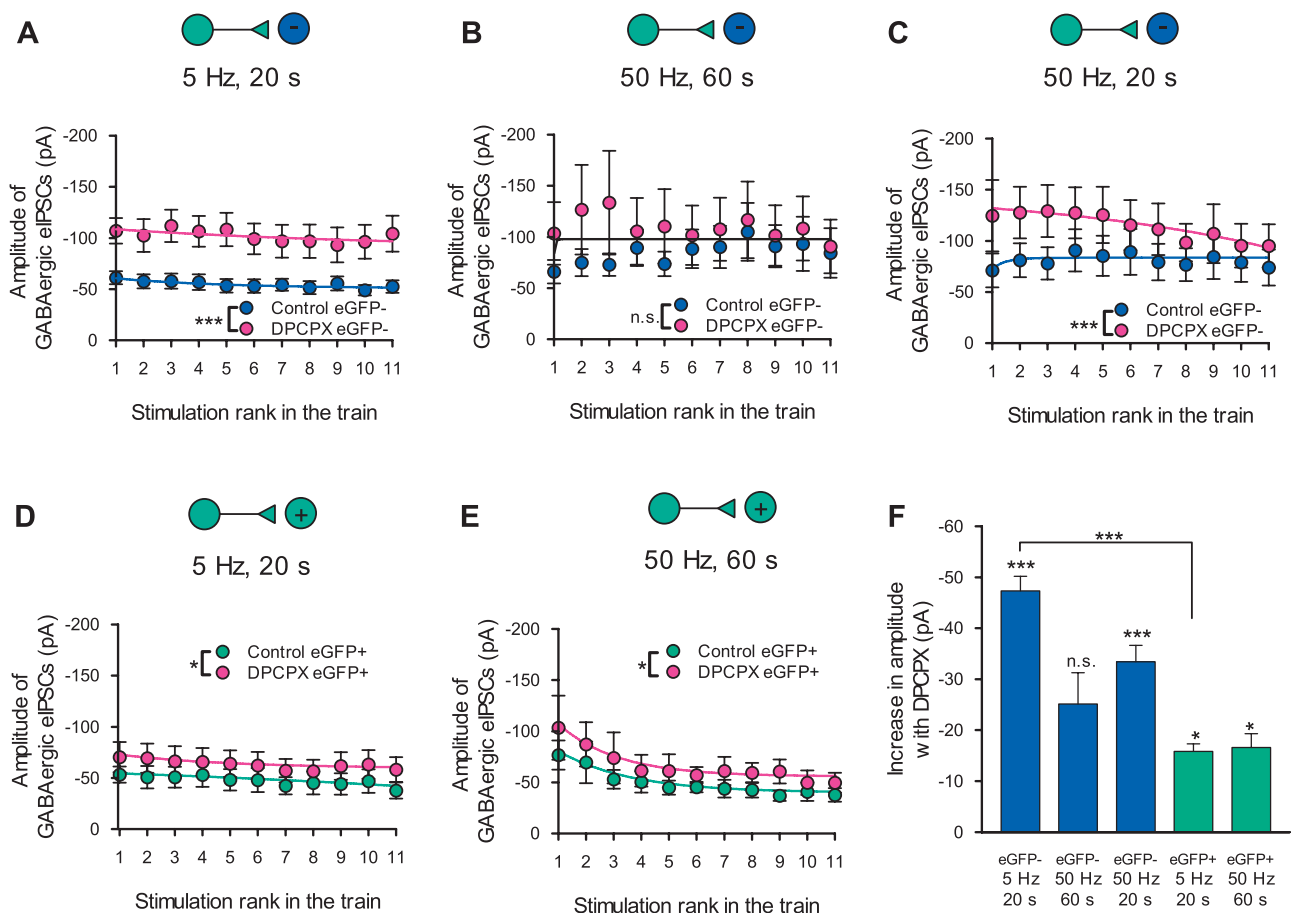
Most of eGFP<sup>+</sup> neurons we recorded from displayed a tonic action potential firing pattern.

Other groups have reported this firing type in a majority or in a large proportion of LII neurons identified as inhibitory by immunohistochemistry,<sup>52</sup> expression of GAD67,<sup>11</sup> GAD65,<sup>10,24</sup> other genetic markers,<sup>18</sup> or assumed from their morphology.<sup>16</sup> A very low proportion of tonic firing neurons has nevertheless been recorded in a single study in GAD67+ neurons.<sup>19</sup> We mostly recorded putative excitatory neurons displaying non-tonic firing, as did other groups.<sup>16,52</sup> Nevertheless, in our experiments, eGFP<sup>-</sup> neurons were mostly IB, whereas in the same transgenic line these neurons mostly displayed a delayed firing.<sup>10</sup>

Such difference may be linked to distinct intracellular composition as well as distinct initial holding potential as it has already been shown in LII.<sup>52</sup> Our data also indicate that both eGFP<sup>-</sup> and eGFP<sup>+</sup> neurons can fire at 50 Hz and GABAergic neurons reliably trigger eIPSCs during stimulations at this frequency.

#### 4.2. Inhibitory connections between lamina II interneurons

Local inhibitory connections between LII neurons are mostly GABAergic, glycinergic transmission occurring in only 1 of the 15 inhibitory contacts recorded by Lu and Perl<sup>33</sup> and possibly in 1 of the 3 inhibitory contacts recorded by Labrakakis et al.<sup>27</sup> We therefore focused on GABAergic connections because we aimed at examining the STP of inhibitory connections between LII neurons. Interestingly, spontaneously active inhibitory connections are dominated by GABAergic transmission in most LIIo neurons, whether these are dominated by glycinergic transmission in most neurons at the laminae II/III border.<sup>48</sup> Therefore, unlike GABAergic connections, glycinergic connections onto LII neurons most likely originate from neurons the cell bodies of which are localized in other laminae.



**Figure 7.** Effect of an A1 adenosine receptor antagonist on GABAergic eIPSCs during trains of stimulations. (A–E) Average raw amplitudes of GABAergic eIPSCs during trains at 5 Hz and 50 Hz before (blue and green) and during bath application of 10  $\mu$ M DPCPX (pink), an A1 receptor antagonist. For each neuron, trains of 11 stimulations were repeated 10 times in control condition and 10 times during bath application of DPCPX. The type of neuron recorded (eGFP<sup>−</sup> or eGFP<sup>+</sup>), the frequency of stimulation (5 Hz or 50 Hz), and the interval between trains (20 seconds or 60 seconds) are given on the top of each panel. (A–C) In eGFP<sup>−</sup> neurons, DPCPX significantly increased raw eIPSC amplitudes during 5 Hz trains repeated every 20 seconds (A,  $n = 9$  neurons) and 50 Hz trains repeated every 20 seconds (C,  $n = 9$  neurons) but not during 50 Hz trains repeated every 60 seconds (B,  $n = 7$  neurons). This indicated a tonic inhibition of GABAergic connections onto eGFP<sup>−</sup> neurons by adenosine depending on the delay between trains of stimulation. (D, E) In eGFP<sup>+</sup> neurons, DPCPX significantly increased raw eIPSC amplitudes during 5 Hz trains repeated every 20 seconds (D,  $n = 9$  neurons) and 50 Hz trains repeated every 60 seconds (E,  $n = 7$  neurons). This indicated a tonic inhibition of GABAergic connections onto eGFP<sup>+</sup> neurons. (F) Average increase in raw eIPSC amplitudes in the presence of DPCPX with respect to control conditions. For trains at 5 Hz, the increase in amplitude is larger in eGFP<sup>−</sup> neurons than that in eGFP<sup>+</sup> neurons. Evolution of eIPSC amplitudes during trains was compared with nonlinear regression. Details of regressions and the corresponding analysis are given in Supplementary Table 1 (available at <http://links.lww.com/PAIN/B478>). eGFP<sup>+</sup>, enhanced green fluorescent protein positive; eGFP<sup>−</sup>, enhanced green fluorescent protein negative; eIPSC, evoked inhibitory postsynaptic current.

### 4.3. Paired-pulse plasticity

During paired-pulse stimulation experiments at short ISIs, GABAergic connections onto eGFP<sup>−</sup> neurons preferentially facilitated, whereas, at long ISIs, GABAergic connections onto eGFP<sup>+</sup> neurons preferentially depressed. In primary cultures of rat laminae I–III, paired-pulse inhibition of GABAergic eIPSCs was preferentially observed (84%) but facilitation occasionally occurred (16%).<sup>20</sup> Inhibitory eIPSPs in laminae II–V of Syrian hamsters, with no distinction between GABAergic and glycinergic transmissions, preferentially displayed facilitation.<sup>53</sup> These facilitating connections may correspond to glycinergic eIPSPs because LII glycinergic synapses display strong paired-pulse facilitation for 50-millisecond ISIs.<sup>24</sup> Thus, in LII, inhibitory connections showing paired-pulse facilitation may preferentially involve GABAergic synapses onto excitatory neurons or glycinergic connections onto inhibitory neurons. In the dorsal horn, paired-pulse depression of glycinergic eIPSCs has previously been shown in rat lamina I, with a maximal depression at ISIs of 150 to 200 milliseconds and involving GABA<sub>B</sub> autoreceptors.<sup>8</sup>

### 4.4. Frequency-dependent short-term plasticity

Our results indicate that GABAergic connections onto eGFP<sup>+</sup> neurons strongly depress during trains of activity at both low (5 Hz) and high (50 Hz) frequency. In these neurons, trains at high frequency induce a larger depression reaching its maximum faster than during trains at low frequency. By contrast, GABAergic connections onto eGFP<sup>−</sup> neurons do not depress, allowing summated eIPSCs to reach larger amplitudes at high frequency.

We have reported previously that trains at 2.5 Hz induced a depression of eIPSCs in primary cultures of superficial dorsal horn neurons from rats.<sup>20</sup> During 10 Hz stimulations, either a depression or a facilitation of eIPSPs was recorded in laminae II–V of Syrian hamsters.<sup>53</sup>

With 20 Hz stimulations, eIPSCs onto GABAergic interneurons in LII of adult mice showed a facilitation during the first train and a depression during subsequent trains.<sup>27</sup>

Although in eGFP<sup>+</sup> neurons we observed a tendency of such a facilitation–depression switch, it was not statistically significant (Fig. S6, <http://links.lww.com/PAIN/B478>), suggesting that the facilitation

described by other studies may have involved a glycinergic component which has been shown to display a potentiation in LII neurons in response to 2 Hz stimulations.<sup>24</sup> Interestingly, we observed a facilitation–depression switch for the second eIPSCs during repeated trains at 50 Hz in eGFP– neurons (Fig. S5B, <http://links.lww.com/PAIN/B478>), suggesting that the facilitation observed in eGFP– neurons during paired-pulse stimulation at short intervals is replaced by other types of plasticities during repeated trains of stimulation at 50 Hz. Such combination of short-term facilitation and depression at different repetitions, frequencies, and time scales has been observed in other structures and may be relatively common.<sup>3</sup>

Interestingly, in recordings performed at room temperature, GABAergic eIPSCs recorded in eGFP+ neurons display slower decay kinetics than those recorded in eGFP– neurons.<sup>28</sup> Such slower kinetics would allow a better summation of overlapping eIPSCs. Nevertheless, in our conditions, eIPSC kinetics were similar in eGFP+ and eGFP– neurons. Moreover, at high frequency, summated eIPSCs in eGFP– neurons reached larger amplitudes than summated eIPSCs in eGFP+ neurons, ruling out an involvement of different decay kinetics to explain a higher degree of summation of eIPSCs in eGFP– neurons.

#### 4.5. Modulation by GABA<sub>B</sub> and A1 receptors

Our results indicate that GABAergic connections onto LII neurons can be under a tonic inhibitory control by A1 adenosine receptors. This inhibition is much stronger on connections onto eGFP– neurons than onto eGFP+ neurons. In eGFP– neurons, this inhibition only occurred when trains were delivered at short intervals. This suggests that the tone of adenosine inhibiting these connections is built-up by ongoing activity and decays when activity decreases. These data were consistent with our previous work showing that in cultured dorsal horn neurons, presynaptic A1 autoreceptors control a subset of GABAergic synapses in an activity-dependent manner.<sup>20</sup> Tonic inhibition by adenosine receptors is not restricted to inhibitory transmission, and glutamatergic synapses in LII are also under an inhibitory tone of adenosine, even under low electrical activity within the network.<sup>49</sup>

Although inhibition of GABAergic connections by A1 receptors was tonic, we showed that GABA<sub>B</sub> receptors can be engaged in a phasic depression of GABAergic eIPSCs during trains of activity. This depression involving GABA<sub>B</sub> receptors is target-specific, occurring only in connections onto eGFP+ neurons. Interestingly, although GABA<sub>B</sub> receptors–mediated inhibition was phasic (it developed during trains), it was only seen when trains were applied at both low frequency and short intervals (5 Hz, 20 seconds). This suggests that this inhibition is activity-dependent but that underlying inhibitory mechanisms might have been surmounted by facilitation occurring during trains at high frequency (compare amplitudes **Figs. 6D and E**).

These results were consistent with previous work showing that presynaptic GABA<sub>B</sub> receptors decrease inhibitory synaptic transmission in the superficial dorsal horn<sup>8,15,20</sup> and that a tone of GABA activating GABA<sub>B</sub> receptors can occur in the dorsal horn under various conditions.<sup>14,31,35,42</sup>

Interestingly, intrathecal administration of GABA<sub>B</sub> and A1 agonists has antinociceptive effects<sup>21,45,46</sup> which may involve the types of modulation of STP described in the present work.

#### 4.6. Impact of frequency and target-specific short-term plasticities of GABAergic connections onto lamina II neurons

GABAergic connections onto inhibitory or excitatory neurons display very distinct frequency-dependent STPs which can engage

target-specific G-protein–coupled receptors when bursts of activity occur at short intervals. Similar differential STPs involving synapses contacting excitatory and inhibitory neurons have been described in other structures of the central nervous system and have been shown to directly affect the dynamic properties of networks and their excitation–inhibition balance.<sup>4,5,25,32,36,40,41</sup> Therefore, these synapse-specific short-term plasticities and their modulation under various levels of activity are of crucial importance to understand information processing by a network receiving frequency-coded information from the periphery.

At low frequency, corresponding to the activity at low intensity of sensory stimulation under basal physiological conditions, the inhibitory control onto putative excitatory neurons remains constant, whereas it depresses onto putative inhibitory neurons. At high frequency, the inhibitory control is increased by summation onto excitatory neurons, whereas it remains constant onto inhibitory neurons. Because the latter fire action potentials in a tonic manner, they are expected to be able to follow higher frequencies of excitatory inputs. Therefore, in basal physiological conditions, both STP and firing properties of inhibitory interneurons of LII might concur to favor inhibitory controls of nociceptive information, particularly at high intensity of sensory stimulation. Hence, the short-term plasticities within this network as well as their modulation by A1 and GABA<sub>B</sub> receptors might represent interesting targets in pain-alleviating strategies.

#### Conflict of interest statement

The authors declare no competing financial interests.

#### Acknowledgements

The authors thank Catherine Moreau and Chantal Fitterer for excellent technical assistance and Jean-Luc Rodeau for his help in statistical analysis. This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, and the French National Research agency (ANR) contract ANR-17-EURE-0022. L. Cathenaut was supported by EURIDOL Graduate School of Pain, Neuropole Strasbourg, and Société Française d'Etude et de Traitement de la Douleur (SFETD).

#### Appendix A. Supplemental digital content

Supplemental digital content associated with this article can be found online at <http://links.lww.com/PAIN/B478>.

#### Article history:

Received 19 May 2021

Received in revised form 22 July 2021

Accepted 18 August 2021

Available online 30 August 2021

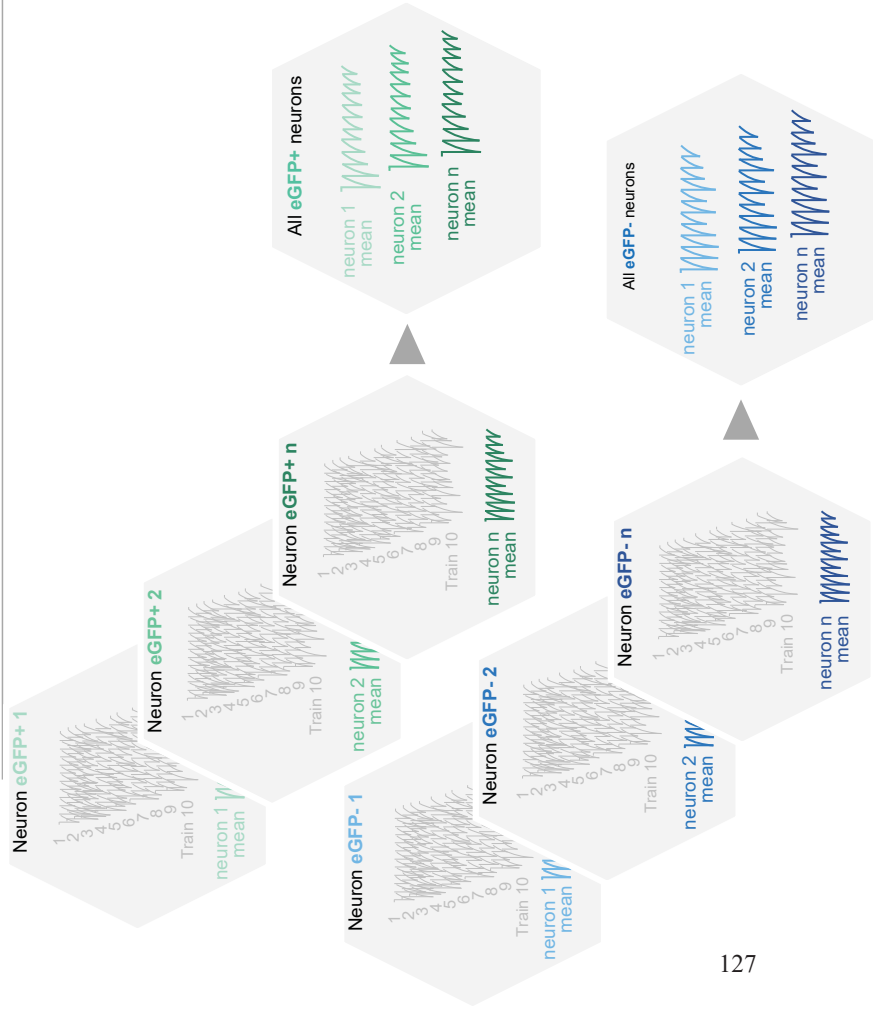
#### References

- [1] Adrian ED. The recovery process of excitable tissues: part I. *J Physiol* 1920;54:1–31.
- [2] Adrian ED, Zotterman Y. The impulses produced by sensory nerve endings: part 3. Impulses set up by touch and pressure. *J Physiol* 1926; 61:465–83.
- [3] Anwar H, Li X, Bucher D, Nadim F. Functional roles of short-term synaptic plasticity with an emphasis on inhibition. *Curr Opin Neurobiol* 2017;43: 71–8.
- [4] Bartley AF, Dobrunz LE. Short-term plasticity regulates the excitation/inhibition ratio and the temporal window for spike integration in CA1 pyramidal cells. *Eur J Neurosci* 2015;41:1402–15.
- [5] Buononanno DV. Decoding temporal information: a model based on short-term synaptic plasticity. *J Neurosci* 2000;20:1129–41.

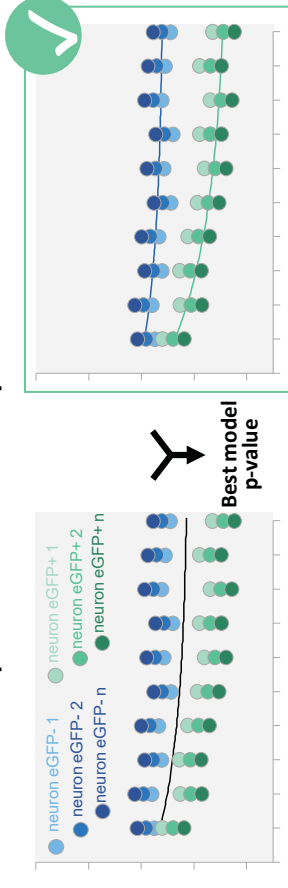
- [6] Buonomano DV. The biology of time across different scales. *Nat Chem Biol* 2007;3:594–7.
- [7] Campero M, Serra J, Ochoa JL. C-polymodal nociceptors activated by noxious low temperature in human skin. *J Physiol* 1996;497:565–72.
- [8] Chery N, De Koninck Y. GABA(B) receptors are the first target of released GABA at lamina I inhibitory synapses in the adult rat spinal cord. *J Neurophysiol* 2000;84:1006–11.
- [9] Cordero-Erausquin M, Coull JA, Boudreau D, Rolland M, De Koninck Y. Differential maturation of GABA action and anion reversal potential in spinal lamina I neurons: impact of chloride extrusion capacity. *J Neurosci* 2005;25:9613–23.
- [10] Cui L, Kim YR, Kim HY, Lee SC, Shin HS, Szabo G, Erdelyi F, Kim J, Kim SJ. Modulation of synaptic transmission from primary afferents to spinal substantia gelatinosa neurons by group III mGluRs in GAD65-EGFP transgenic mice. *J Neurophysiol* 2011;105:1102–11.
- [11] Daniele CA, MacDermott AB. Low-threshold primary afferent drive onto GABAergic interneurons in the superficial dorsal horn of the mouse. *J Neurosci* 2009;29:686–95.
- [12] Dunwiddie TV, Diao L, Proctor WR. Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J Neurosci* 1997;17:7673–82.
- [13] Froemke RC, Merzenich MM, Schreiner CE. A synaptic memory trace for cortical receptive field plasticity. *Nature* 2007;450:425–9.
- [14] Fukuhara K, Katafuchi T, Yoshimura M. Effects of baclofen on mechanical noxious and innocuous transmission in the spinal dorsal horn of the adult rat: in vivo patch-clamp analysis. *Eur J Neurosci* 2013;38:3398–407.
- [15] Grudt TJ, Henderson G. Glycine and GABA(A) receptor-mediated synaptic transmission in rat substantia gelatinosa: inhibition by mu-opioid and GABA(B) agonists. *J Physiol* 1998;507:473–83.
- [16] Grudt TJ, Perl ER. Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *J Physiol* 2002;540:189–207.
- [17] Guan Y. Spinal cord stimulation: neurophysiological and neurochemical mechanisms of action. *Curr Pain Headache Rep* 2012;16:217–25.
- [18] Hantman AW, van den Pol AN, Perl ER. Morphological and physiological features of a set of spinal substantia gelatinosa neurons defined by green fluorescent protein expression. *J Neurosci* 2004;24:836–42.
- [19] Heinke B, Ruscheweyh R, Forsthuber L, Wunderbaldinger G, Sandkuhler J. Physiological, neurochemical and morphological properties of a subgroup of GABAergic spinal lamina II neurons identified by expression of green fluorescent protein in mice. *J Physiol* 2004;560:249–66.
- [20] Hugel S, Schlichter R. Convergent control of synaptic GABA release from rat dorsal horn neurones by adenosine and GABA autoreceptors. *J Physiol* 2003;551:479–89.
- [21] Jacobson KA, Gao ZG. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:247–64.
- [22] Jensen MP, Brownstone RM. Mechanisms of spinal cord stimulation for the treatment of pain: still in the dark after 50 years. *Eur J Pain* 2019;23:652–9.
- [23] Kato G, Kawasaki Y, Ji RR, Strassman AM. Differential wiring of local excitatory and inhibitory synaptic inputs to islet cells in rat spinal lamina II demonstrated by laser scanning photostimulation. *J Physiol* 2007;580:815–33.
- [24] Kloc ML, Pradier B, Chirila AM, Kauer JA. NMDA receptor activation induces long-term potentiation of glycine synapses. *PLoS One* 2019;14:e0222066.
- [25] Klyachko VA, Stevens CF. Excitatory and feed-forward inhibitory hippocampal synapses work synergistically as an adaptive filter of natural spike trains. *PLoS Biol* 2006;4:e207.
- [26] Kuhlman SJ, Olivas ND, Tring E, Ikrar T, Xu X, Trachtenberg JT. A disinhibitory microcircuit initiates critical-period plasticity in the visual cortex. *Nature* 2013;501:543–6.
- [27] Labrakakis C, Lorenzo LE, Bories C, Ribeiro-da-Silva A, De Koninck Y. Inhibitory coupling between inhibitory interneurons in the spinal cord dorsal horn. *Mol Pain* 2009;5:24.
- [28] Labrakakis C, Rudolph U, De Koninck Y. The heterogeneity in GABA(A) receptor-mediated IPSC kinetics reflects heterogeneity of subunit composition among inhibitory and excitatory interneurons in spinal lamina II. *Front Cell Neurosci* 2014;8:424.
- [29] Letzkus JJ, Wolff SB, Meyer EM, Tovote P, Courtin J, Herry C, Luthi A. A disinhibitory microcircuit for associative fear learning in the auditory cortex. *Nature* 2011;480:331–5.
- [30] Light AR, Perl ER. Reexamination of the dorsal root projection to the spinal dorsal horn including observations on the differential termination of coarse and fine fibers. *J Comp Neurol* 1979;186:117–31.
- [31] Lin Q, Peng YB, Willis WD. Role of GABA receptor subtypes in inhibition of primate spinothalamic tract neurons: difference between spinal and periaqueductal gray inhibition. *J Neurophysiol* 1996;75:109–23.
- [32] Lovett-Barron M, Turi GF, Kaifosh P, Lee PH, Bolze F, Sun XH, Nicoud JF, Zemelman BV, Sternson SM, Losonczy A. Regulation of neuronal input transformations by tunable dendritic inhibition. *Nat Neurosci* 2012;15:423–30.S421–23.
- [33] Lu Y, Perl ER. A specific inhibitory pathway between substantia gelatinosa neurons receiving direct C-fiber input. *J Neurosci* 2003;23:8752–8.
- [34] Lu Y, Perl ER. Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II). *J Neurosci* 2005;25:3900–7.
- [35] Malan TP, Mata HP, Porreca F. Spinal GABA(A) and GABA(B) receptor pharmacology in a rat model of neuropathic pain. *Anesthesiology* 2002;96:1161–7.
- [36] Moreno A, Morris RGM, Canals S. Frequency-dependent gating of hippocampal-neocortical interactions. *Cereb Cortex* 2016;26:2105–14.
- [37] Motanis H, Seay MJ, Buonomano DV. Short-term synaptic plasticity as a mechanism for sensory timing. *Trends Neurosci* 2018;41:701–11.
- [38] Motulsky HJ, Christopoulos A. Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. San Diego: GraphPad Software Inc., 2003.
- [39] Polgar E, Durrieux C, Hughes DI, Todd AJ. A quantitative study of inhibitory interneurons in laminae I–III of the mouse spinal dorsal horn. *PLoS One* 2013;8:e78309.
- [40] Pouille F, Scanziani M. Routing of spike series by dynamic circuits in the hippocampus. *Nature* 2004;429:717–23.
- [41] Royer S, Zemelman BV, Losonczy A, Kim J, Chance F, Magee JC, Buzsáki G. Control of timing, rate and bursts of hippocampal place cells by dendritic and somatic inhibition. *Nat Neurosci* 2012;15:769–75.
- [42] Salio C, Merighi A, Bardoni R. GABA(B) receptors-mediated tonic inhibition of glutamate release from Abeta fibers in rat laminae III/IV of the spinal cord dorsal horn. *Mol Pain* 2017;13:1744806917710041.
- [43] Santos SF, Luz LL, Szucs P, Lima D, Derkach VA, Safronov BV. Transmission efficacy and plasticity in glutamatergic synapses formed by excitatory interneurons of the substantia gelatinosa in the rat spinal cord. *PLoS One* 2009;4:e8047.
- [44] Santos SF, Rebelo S, Derkach VA, Safronov BV. Excitatory interneurons dominate sensory processing in the spinal substantia gelatinosa of rat. *J Physiol* 2007;581:241–54.
- [45] Sawynok J, LaBella FS. On the involvement of GABA in the analgesia produced by baclofen, muscimol and morphine. *Neuropharmacology* 1982;21:397–403.
- [46] Schenone S, Brullo C, Musumeci F, Bruno O, Botta M. A1 receptors ligands: past, present and future trends. *Curr Top Med Chem* 2010;10:878–901.
- [47] Spiess AN, Neumeier N. An evaluation of R2 as an inadequate measure for nonlinear models in pharmacological and biochemical research: a Monte Carlo approach. *BMC Pharmacol* 2010;10:6.
- [48] Takazawa T, MacDermott AB. Synaptic pathways and inhibitory gates in the spinal cord dorsal horn. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1198:153–8.
- [49] Tian L, Ji G, Wang C, Bai X, Lu Y, Xiong L. Excitatory synaptic transmission in the spinal substantia gelatinosa is under an inhibitory tone of endogenous adenosine. *Neurosci Lett* 2010;477:28–32.
- [50] Todd AJ. Plasticity of inhibition in the spinal cord. *Handb Exp Pharmacol* 2015;227:171–90.
- [51] Torebjork HE, Hallin RG. Responses in human A and C fibres to repeated electrical intradermal stimulation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1974;37:653–64.
- [52] Yasaka T, Tiong SY, Hughes DI, Riddell JS, Todd AJ. 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* 2010;151:475–88.
- [53] Zhang W, Schneider SP. Short-term modulation at synapses between neurons in laminae II–V of the rodent spinal dorsal horn. *J Neurophysiol* 2011;105:2920–30.
- [54] Zheng J, Lu Y, Perl ER. Inhibitory neurones of the spinal substantia gelatinosa mediate interaction of signals from primary afferents. *J Physiol* 2010;588:2065–75.

## Data quantification and analysis

## Curve fitting and model comparison



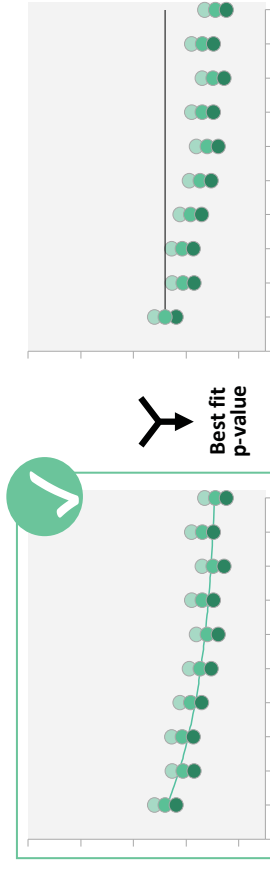
### Groups similar or statistically different?



Fit of pooled data with « Equation 3 »

Fit of each group with « Equation 3 »

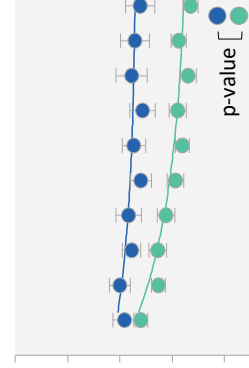
### Plasticity or no plasticity during the train?



Fit of group data with « Equation 3 »

Linear fit of group data with slope = 0

### Illustrations: Curve fits superimposed with average amplitudes

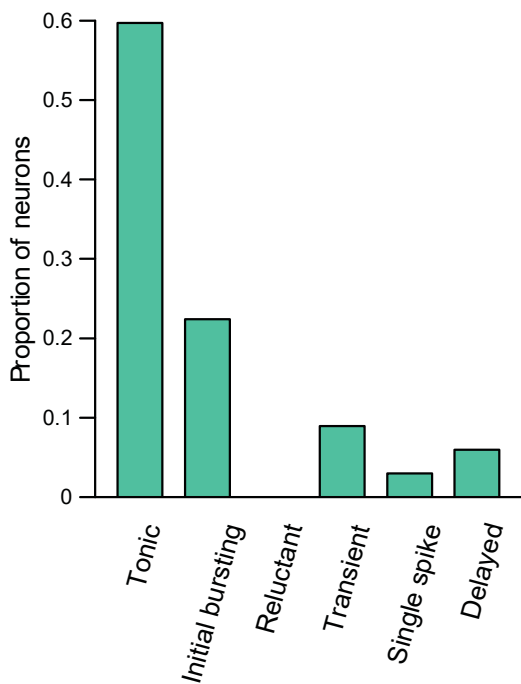


p-value of model comparisons are symbolized in the figures and given in the text. Other criteria of model/fit goodness (BIC, AIC, AICc) are given in the supplementary tables.

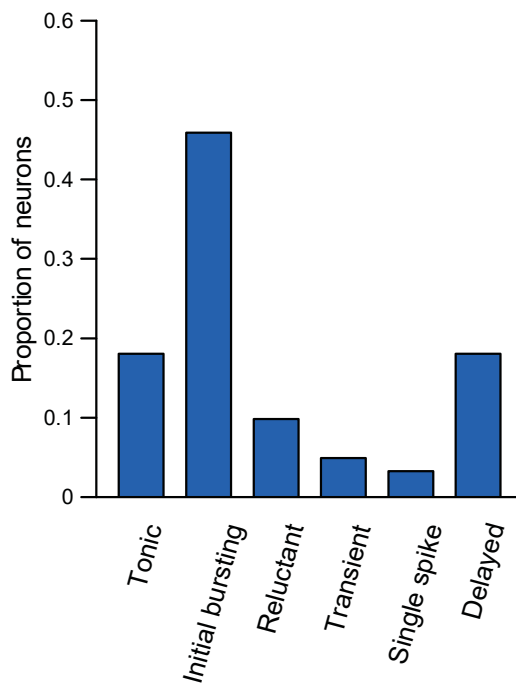
### Supplementary figure S1. Data quantification, analysis and statistics.

Stimulation protocols were applied ten times in each neuron and the within-cell average across trials was calculated by averaging eIPSCs amplitudes from these ten repetitions. These within-cell average across ten trials were used for statistical analysis. Non-linear regression analysis was used to analyze changes in eIPSCs amplitudes during stimulation train protocols. To compare two different conditions (e.g. eGFP- vs. eGFP+ or presence/absence of antagonists) data from each conditions were fitted with Equation 3, either individually (sum of two functions) or pooled (one single function). When the sum of two individual fits provided statistically significant improvements with respect to the fit of pooled data, the two conditions were considered as having distinct effects. To define whether STP was expressed during trains of stimulations, i.e. whether significant changes in amplitude occurred during the train, fits with Equation 3 were compared with linear fits with slope values forced to 0. When fits with Equation 3 provided statistically significant improvements with respect to the linear fit with slope value forced to 0, the connections were considered as displaying a significant STP during the corresponding protocol. Details of all models (number of neurons, degree of freedom, Residual sum of squares, AIC, AICc, BIC) as well as details of model comparison (F, P, differences in AIC, AICc and BIC) are given in Supplementary table 1. Individual data of all neurons were always used for curve fitting and average values were used for illustration.

Firing patterns of eGFP+ neurons



Firing patterns of eGFP- neurons

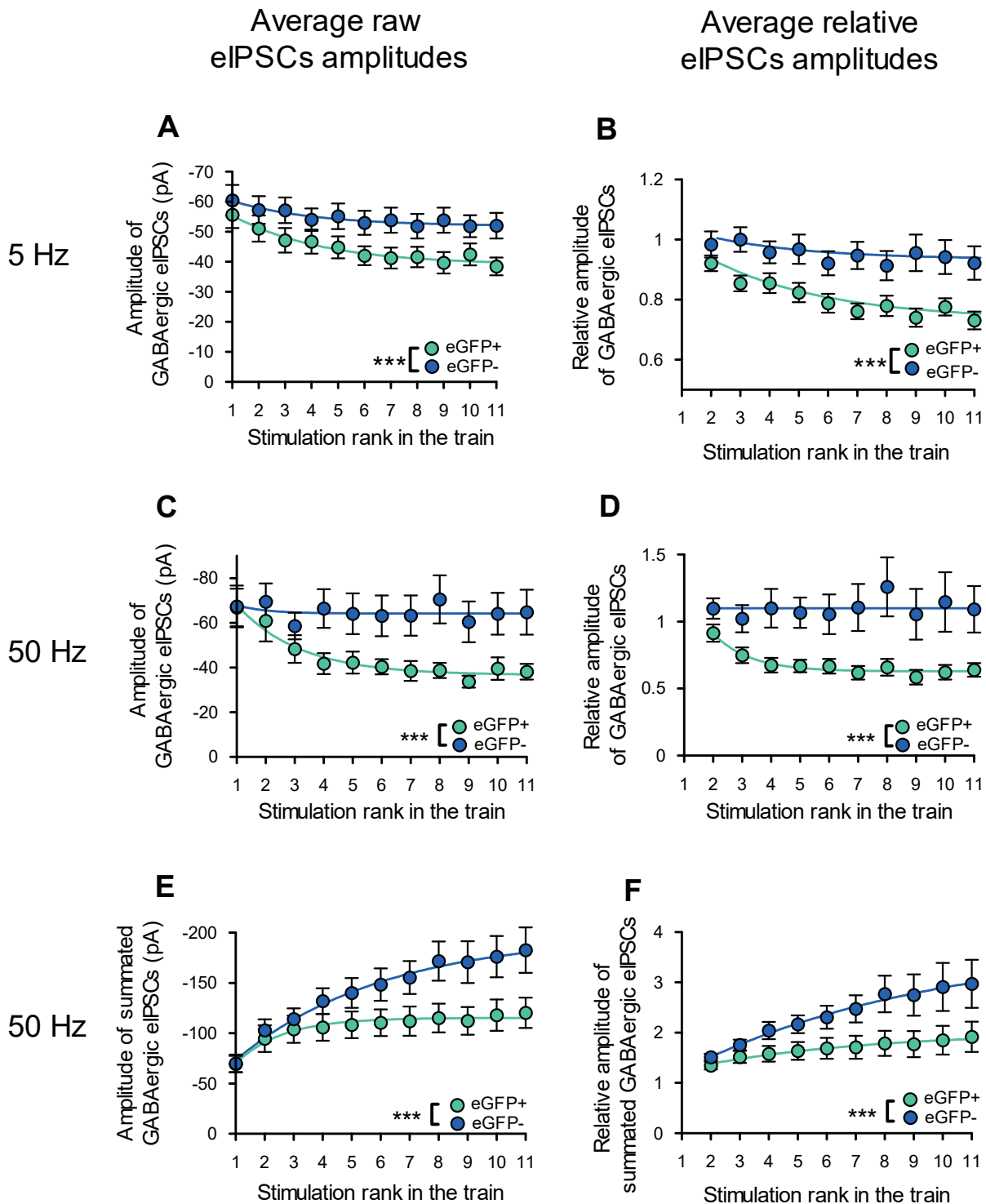


**Supplementary figure S2.**

Action-potential firing patterns in eGFP+ (left) and eGFP- (right) neurons.

A majority of eGFP+ neurons were of tonic-firing type (Tonic) whereas a majority of eGFP- neurons were of initial bursting type (n = 67 eGFP+ neurons and 61 eGFP- neurons).

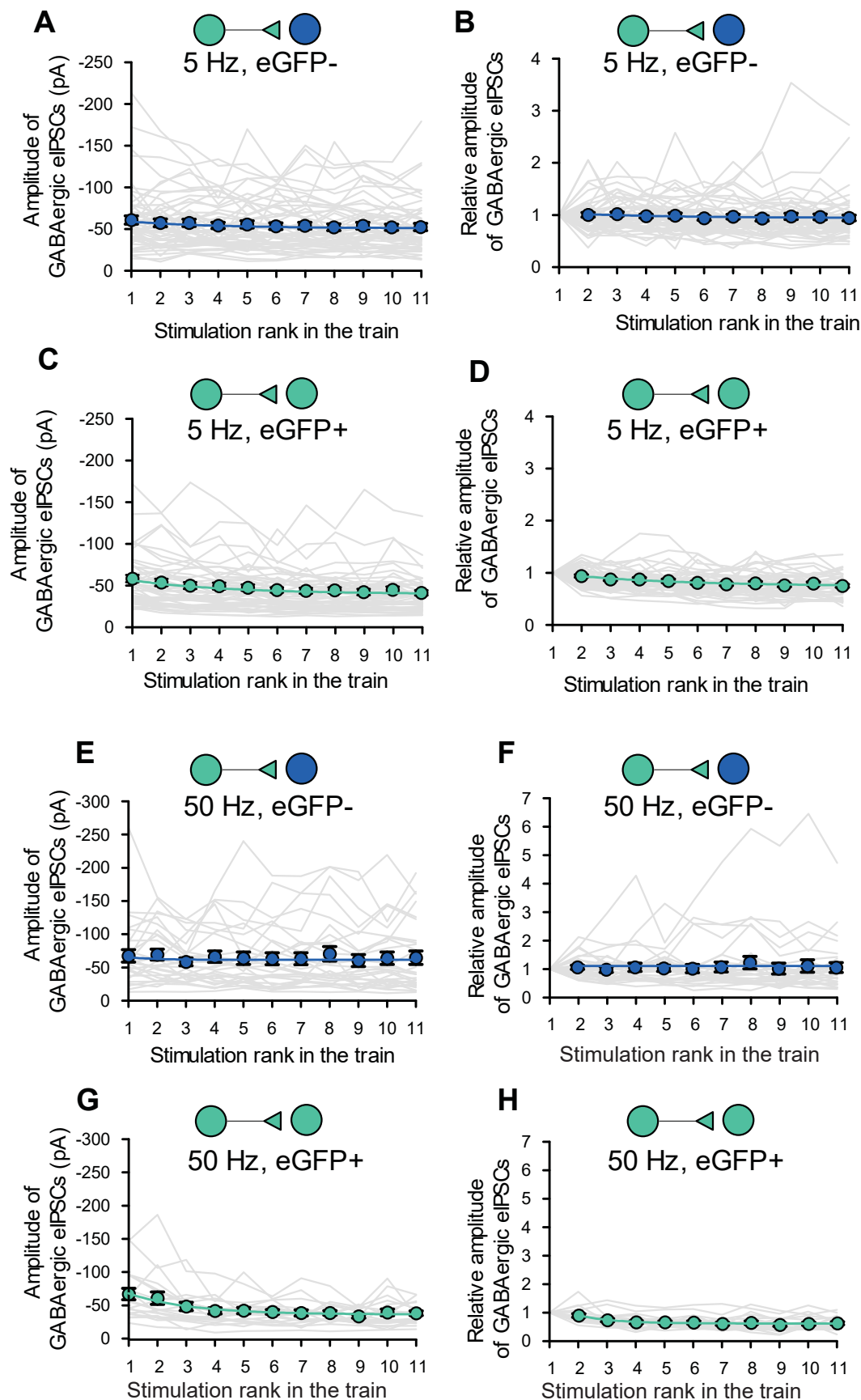




### Supplementary figure S3.

#### Short-term plasticity of GABAergic connections during trains at 5 Hz and 50 Hz.

A. Average raw eIPSCs amplitudes of GABAergic eIPSCs recorded in eGFP- neurons (blue) and eGFP+ neurons (green) during 5 Hz protocols. B. Relative amplitudes of GABAergic eIPSCs recorded in eGFP- and eGFP+ neurons (amplitudes normalized after eIPSCs of rank 1, same neurons as in A). C. Average raw eIPSCs amplitudes of GABAergic eIPSCs recorded in eGFP- neurons (blue) and eGFP+ neurons (green) during 50 Hz protocols. D. Relative amplitudes of GABAergic eIPSCs recorded in eGFP- and eGFP+ neurons (amplitudes normalized after eIPSCs of rank 1, same neurons as in C). E. F. Same data as in C-D, but with eIPSCs measured from the basal current level before the first eIPSC (summated eIPSCs amplitudes). Results of non-linear regressions used to compare conditions are given as  $P > 0.5$ : n.s. and  $P < 0.001$ : \*\*\*. Details of regressions and the corresponding analysis are given in Supplementary Table 1. For 5 Hz protocols:  $n = 54$  eGFP- and  $n = 49$  eGFP+ neurons. For 50 Hz protocols:  $n = 27$  eGFP- and  $n = 19$  eGFP+ neurons.



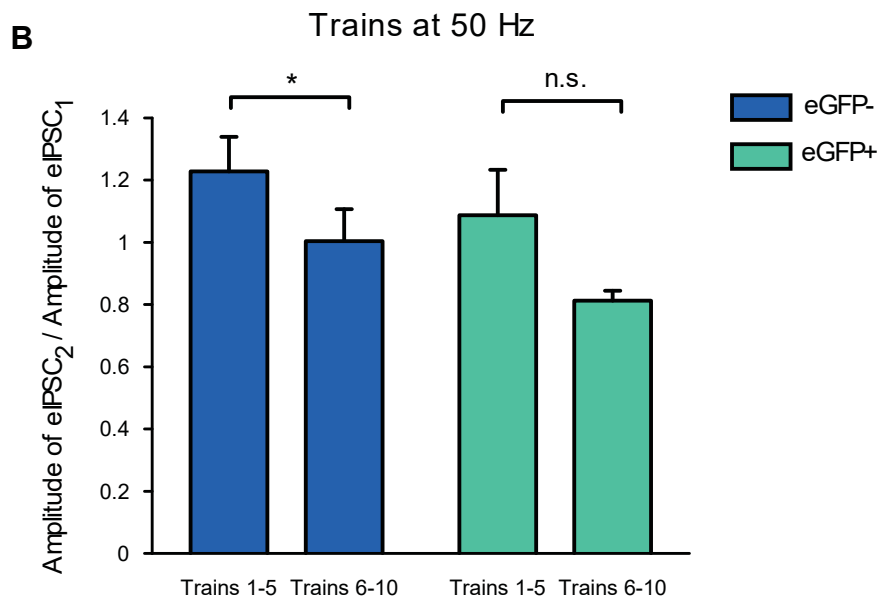
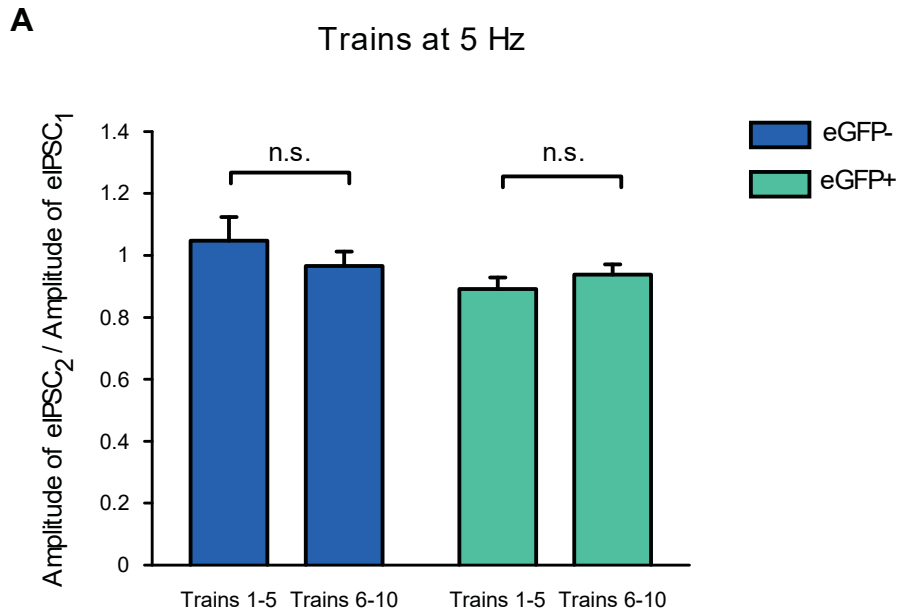
**Supplementary figure S4.**

**Short-term plasticity of GABAergic connections during trains at 5 Hz and 50 Hz: individual neurons.**

Left: Average raw eIPSCs amplitudes of GABAergic eIPSCs. Right: Relative amplitudes of GABAergic eIPSCs (amplitudes normalized after eIPSCs of rank 1, same neurons as left).

A-D: train of stimulations at 5 Hz. Same data as in Fig. 3.  $n = 54$  eGFP- and  $n = 49$  eGFP+ neurons. E-H: trains of stimulations at 50 Hz. Same data as in Fig. 4.  $n = 27$  eGFP- and  $n = 19$  eGFP+ neurons.

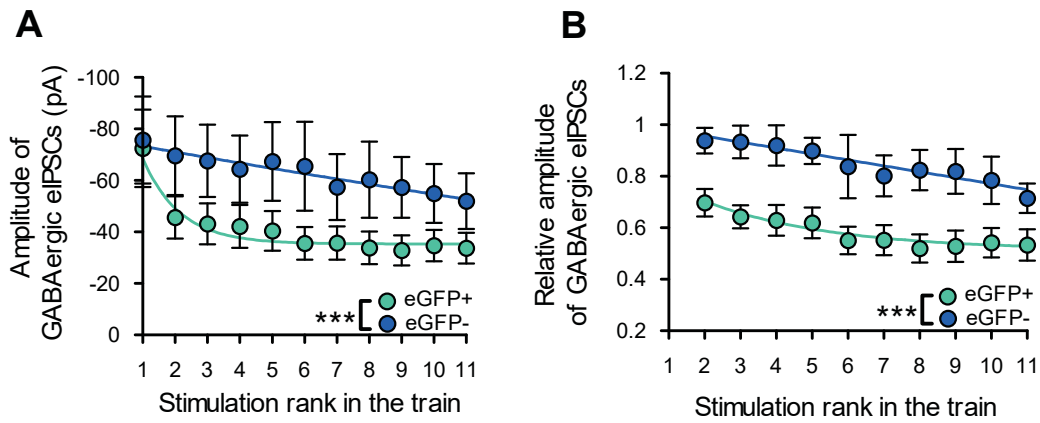
A, B, E, F: eIPSCs recorded in eGFP- neurons. C, D, G, H: eIPSCs recorded in eGFP+ neurons. Average amplitudes from individual neurons are in grey.



**Supplementary figure S5.**

**Relative amplitude of rank 2 eIPSCs in the first five and the last five trains.**

A. During 5 Hz trains, eIPSC2/eIPSC1 remained similar in the first five and the last five trains for connections on both eGFP- and eGFP+ neurons (PeGFP- = 0.678, PeGFP+ = 0.223, Wilcoxon Signed Rank Test for Paired Data). B. During 50 Hz trains, eIPSC2/eIPSC1 remained similar in the first five and the last five trains for connections on eGFP+ neurons (PeGFP+ = 0.098, Wilcoxon Signed Rank Test for Paired Data), but significantly decreased by 18% for eGFP- neurons (PeGFP- = 0.048, Wilcoxon Signed Rank Test for Paired Data). This suggests that the facilitation observed in eGFP- neurons during paired-pulse stimulation at short intervals (Fig. 2E) is replaced by other types of plasticities during repeated trains of stimulation at 50 Hz.

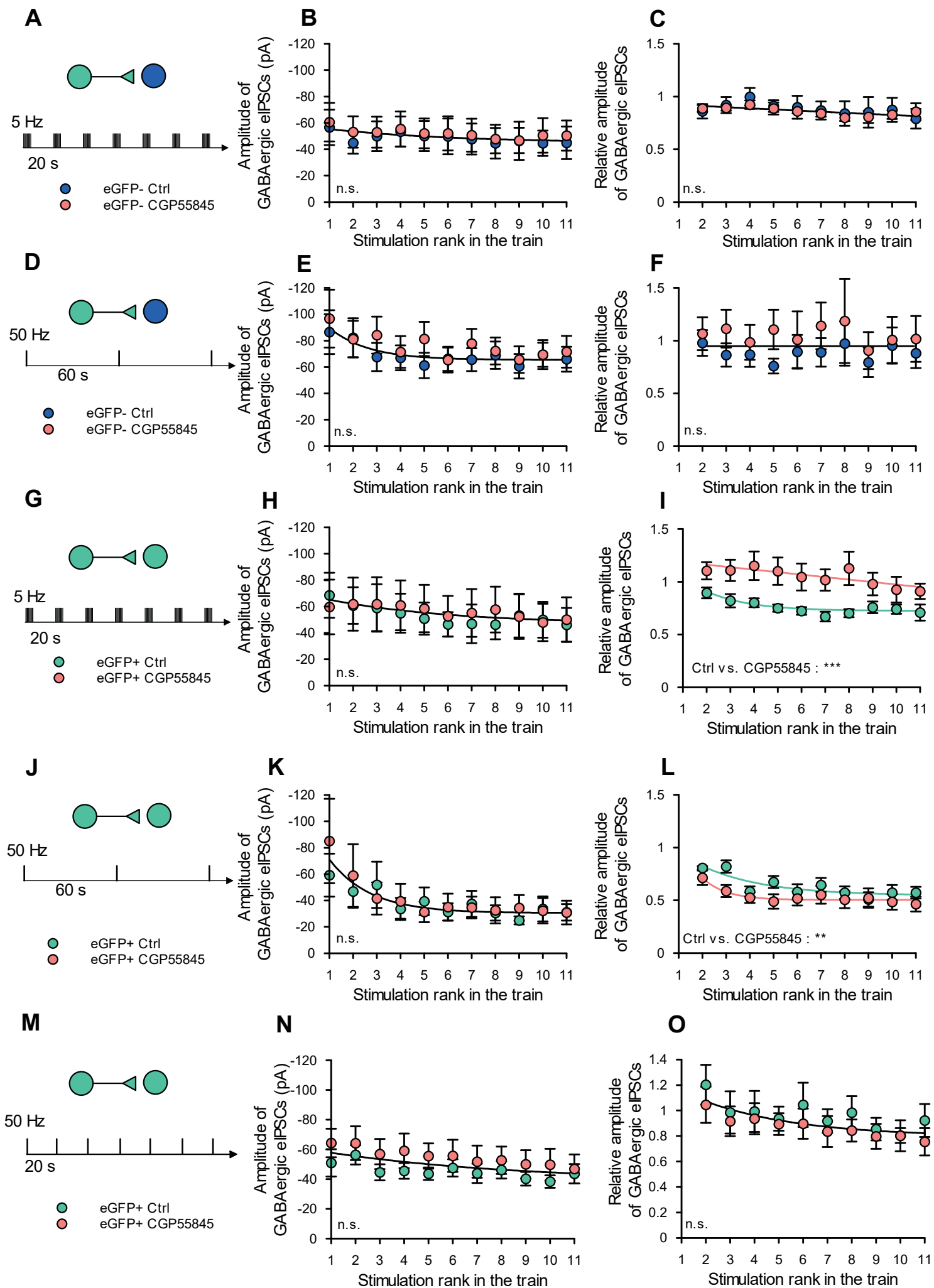


**Supplementary figure S6.**

**Short-term plasticity of GABAergic connections during trains of stimulations at 5 Hz with increased amplitudes of stimulation.**

For this experiment, stimulation amplitudes were set at 0.45 mA (versus 0.21 mA on average for all other experiments). A. Average raw eIPSCs amplitudes of GABAergic eIPSCs recorded in eGFP- neurons (blue) and eGFP+ neurons (green). B. Relative amplitudes of GABAergic eIPSCs recorded in eGFP- and eGFP+ neurons (amplitudes normalized after eIPSCs of rank 1, same neurons as in A). n = 11 eGFP- and n = 11 eGFP+ neurons.

Evolution of eIPSCs amplitudes during the trains were significantly different in eGFP- and eGFP+ neurons as it was observed with lower amplitudes of stimulation (Fig. 3). This indicated that changes in stimulation efficacy during trains of stimulations were unlikely to influence our results.



Supplementary figure S7.

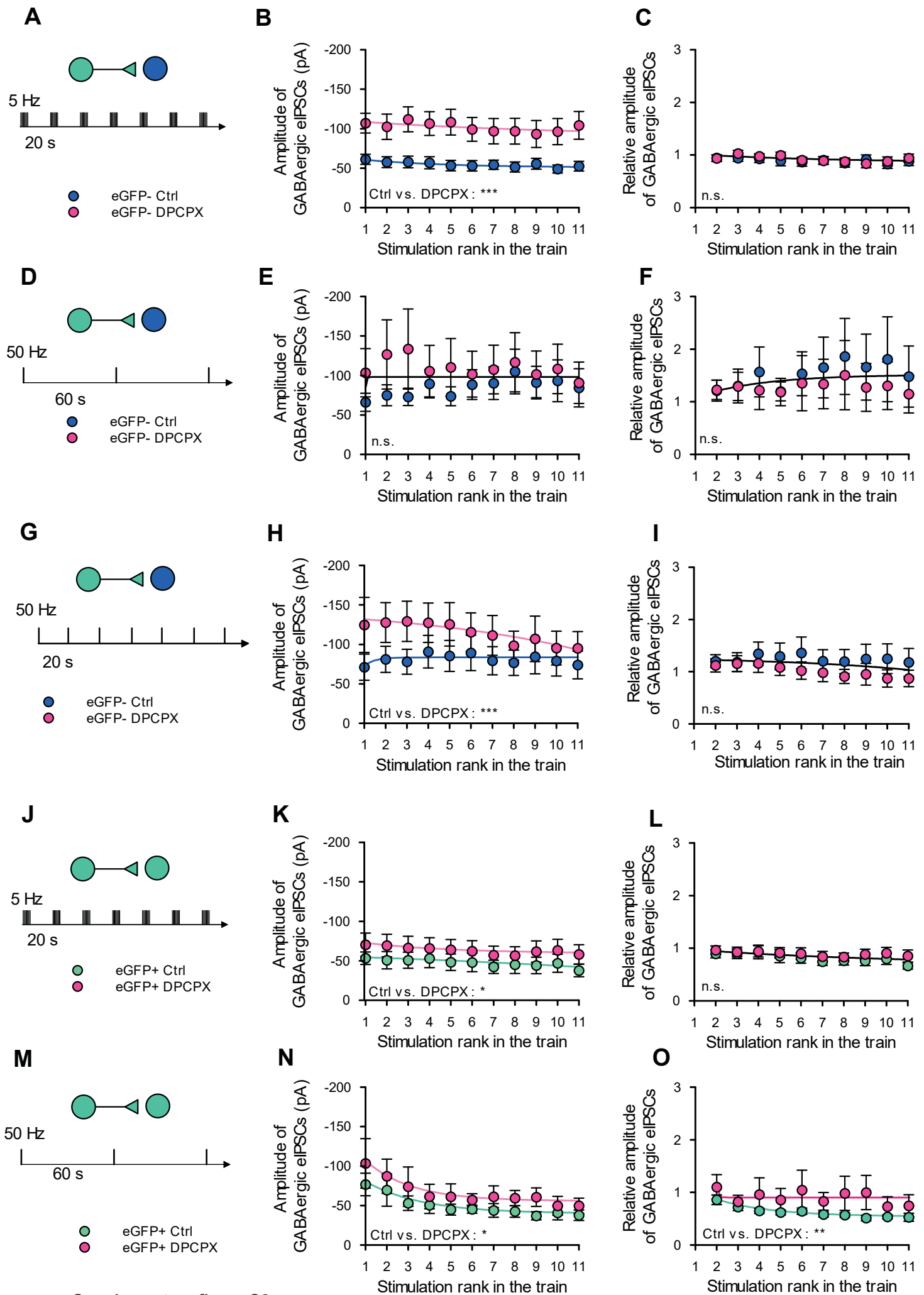
Effect of a GABAB receptor antagonist on GABAergic eIPSCs during 5 Hz and 50 Hz trains.

legend next page

### Supplementary figure S7.

#### Effect of a GABA<sub>B</sub> receptor antagonist on GABAergic eIPSCs during 5 Hz and 50 Hz trains.

Average amplitudes of GABAergic eIPSCs during trains at 5 Hz and 50 Hz before (blue and green) and during bath application of 10  $\mu$ M CGP55845 (orange), a GABA<sub>B</sub> receptors antagonist. For each neuron, trains of 11 stimulations were repeated 10 times in control condition and 10 times during bath application of CGP55845. A, D, G, J, M. Type of neuron (eGFP- or eGFP+), frequency of stimulation (5 Hz or 50 Hz) and interval between trains (20 s or 60 s) applied in B-C, E-F, H-I, K-L, N-O, respectively. B, E, H, K, N. Average raw eIPSCs amplitudes. C, F, I, L, O. Average relative eIPSCs amplitudes. A-F: CGP55845 had no effect on GABAergic connections onto eGFP- neurons, neither during trains at 5 Hz (A-C, n = 6 neurons) nor during trains at 50 Hz (D-F n = 12 neurons). G-O: in eGFP+ neurons CGP55845 did not changed raw eIPSCs amplitudes (H, K, N), but it significantly increased relative eIPSCs amplitude during 5 Hz trains repeated every 20 s (I, n = 8 neurons), indicating a phasic inhibition involving GABA<sub>B</sub> receptors during these trains. Evolution of eIPSCs amplitudes during trains were compared with non-linear regression. Details of regressions and the corresponding analysis are given in Supplementary Table 7. P > 0.5: n.s. and P < 0.001: \*\*\*.



Supplementary figure S8.

Effect of an A1 adenosine receptor antagonist on GABAergic eIPSCs during 5 Hz and 50 Hz trains.

legend next page

### Supplementary figure S8.

#### Effect of an A1 adenosine receptor antagonist on GABAergic eIPSCs during 5 Hz and 50 Hz trains.

legend next page

Average amplitudes of GABAergic eIPSCs during trains at 5 Hz and 50 Hz before (blue and green) and during bath application of 10  $\mu$ M DPCPX (pink), an A1 receptor antagonist. For each neuron, trains of 11 stimulations were repeated 10 times in control condition and 10 times during bath application of DPCPX. A, D, G, J, M. Type of neuron (eGFP- or eGFP+), frequency of stimulation (5 Hz or 50 Hz) and interval between trains (20 s or 60 s) applied in B-C, E-F, H-I, K-L, N-O, respectively. B, E, H, K, N. Average raw eIPSCs amplitudes. C, F, I, L, O. Average relative eIPSCs amplitudes. B, H. DPCPX significantly increased raw eIPSCs amplitudes recorded in eGFP- neurons during trains at 5 Hz repeated every 20 s (B, n = 9 neurons) and 50 Hz repeated every 20 s (H, n = 9 neurons) but had no effect on raw eIPSCs amplitudes recorded during trains at 50 Hz repeated every 60 s (E, n = 7 neurons). This indicated a tonic inhibition of GABAergic connections onto eGFP- neurons by adenosine depending on the delay between trains of stimulation. K, N, in eGFP+ neurons, DPCPX significantly increased raw eIPSCs amplitudes during 5 Hz trains repeated every 20 s (K) and 50 Hz trains repeated every 60 s (N). This indicated a tonic inhibition of GABAergic connections onto eGFP+ neurons. C, F, I, L, O Except during 50 Hz trains repeated every 60 s where a weak significant effect was recorded (O), no effect of DPCPX was detected in relative eIPSCs amplitudes, neither in eGFP- nor in eGFP+ neurons indicating that inhibition involving A1 receptors did not changed during the train. Evolution of eIPSCs amplitudes during trains were compared with non-linear regression. Details of regressions and the corresponding analysis are given in Supplementary Table 8.  $P > 0.5$ : n.s.,  $0.05 > P > 0.01$ : \*,  $P < 0.001$ : \*\*\*.



**Supplementary Table 1. Non linear regressions FIGURE 2**

Figure	Stimulation protocol										Model parameters determined by non linear curve fitting										Model comparison stats			
	Paired-Pulse ISI: 20, 50, 75, 100, 200, 300 ms	Type of data	eGFP condition	Drug condition	Model	N neurons	obs	k	A1 eGFP	A2 eGFP	A3 eGFP	A1 eGFP+	A2 eGFP+	A3 eGFP+	SS	df	AIC	AICc	BIC	F	p	dAICc		
2E	"equation 2" pooled data	PPR	- and +	Control	sum of two "Equation3"	63-	223	3	1.29	1.01	34.04	1.29	1.01	34.04	25.41	220	156.48	164.67	170.11					
	sum of two "Equation 2"					52+	223	6	1.53	1.07	28.46	1.06	0.95	68.52	24.04	217	150.12	164.65	173.97	4.1222	7.20E-03	0.02		

**Supplementary Table 2. Non linear regressions FIGURE 3**

Figure	Stimulation protocol										Model parameters determined by non linear curve fitting										Model comparison stats					
	Frequency	Protocol	Interval	Repetition	Type of data	eGFP condition	Drug condition	Model	N neurons	obs	k	A1 eGFP	A2 eGFP	A3 eGFP	A1 eGFP+	A2 eGFP+	A3 eGFP+	SS	df	AIC	AICc	BIC	F	p	dAICc	
S3A	5 Hz	20 s	1-10	Raw	sum of two exponential fits, same intercept	- and +	Control	sum of two "Equation3"	54-	1133	5	-58.06	7.80	6.46	-58.06	18.23	2.56	928309.68	1128	10828.04	10840.12	10858.24				-3.14
									49+	1133	6	-60.20	8.32	3.12	-55.42	16.42	3.38	927586.17	1127	10829.16	10843.26	10864.39	0.8791	3.49E-01		
S3A	5 Hz	20 s	1-10	Raw	"Equation3" pooled data	- and +	Control	sum of two "Equation3"	54-	1133	3	-57.93	12.17	3.29	-57.93	12.17	3.29	957197.83	1130	10858.76	10866.80	10878.89				23.54
									49+	1133	6	-60.20	8.32	3.12	-55.42	16.42	3.38	927586.17	1127	10829.16	10843.26	10864.39	11.9925	9.88E-08		
S3A	5 Hz	20 s	1-10	Raw	Linear fit slope=0	-	Control	Exponential (Equation3)	54-	594	1	-54.56	0.00					573961.45	593	5772.52	5776.54	5781.30				-4.28
									49+	594	3	-60.20	8.32	3.12				570329.12	591	5772.75	5780.82	5790.30	1.8820	1.53E-01		
S3A	5 Hz	20 s	1-10	Raw	Linear fit slope=0	+	Control	Exponential (Equation3)	49+	539	1	-44.60	0.00					369871.83	538	5053.93	5057.95	5062.51				10.65
									539	3		-55.42	16.42	3.38	357257.05	536	5039.23	5047.30	5056.39	9.4631	9.14E-05					
S3B, S3B	5 Hz	20 s	1-10	Norm	"Equation3" pooled data	- and +	Control	sum of two "Equation3"	54-	1030	3	0.96	-0.13	3.79	0.96	-0.13	3.79	93.83	1027	463.28	471.32	483.03				55.21
									49+	1030	6	0.99	-0.07	3.48	0.92	-0.19	3.99	87.89	1024	401.99	416.10	436.56	23.0422	1.94E-14		
S3B, S3B	5 Hz	20 s	1-10	Norm	Linear fit slope=0	-	Control	Exponential (Equation3)	54-	540	1	0.95	0.00					66.92	539	408.87	412.89	417.45				-6.451
									49+	540	3	0.99	-0.07	3.48				66.72	537	411.27	419.34	428.44	0.7974	4.51E-01		
S3B, S3B	5 Hz	20 s	1-10	Norm	Linear fit slope=0	+	Control	Exponential (Equation3)	49+	490	1	0.80	0.00					22.66	489	-111.61	-107.59	-103.22				21.52
									490	3		0.92	-0.19	3.99	21.33	487	-137.19	-129.11	-120.42	15.1532	4.13E-07					
3C	5 Hz	20 s	1-5	Raw	"Equation3" pooled data	-	Control	sum of two "Equation3"	50-	1100	3	-61.52	9.25	2.74	-61.52	9.25	2.74	1141933.80	1097	10769.35	10777.39	10789.36				-11.43
									6-10	1100	6	-63.28	10.39	1.65	-59.81	12.94	9.61	1141274.39	1094	10774.71	10788.82	10809.74	0.2107	8.89E-01		
3D	5 Hz	20 s	1-5	Raw	"Equation3" pooled data	+	Control	sum of two "Equation3"	43+	946	3	-55.61	15.11	3.31	-55.61	15.11	3.31	748490.65	943	9005.83	9013.87	9025.24				-8.49
									6-10	946	6	-54.05	16.14	3.78	-57.19	14.23	2.89	745656.50	940	9008.24	9022.36	9042.21	1.1909	3.12E-01		

**Supplementary Table 3. Supplementary Figure 6 Non linear regressions stimulation at 5Hz at increased stimulation amplitude**

Figure	Stimulation protocol										Model parameters determined by non linear curve fitting										Model comparison stats					
	Frequency	Protocol	Interval	Repetition	Type of data	eGFP condition	Drug condition	Model	N neurons	obs	k	A1 eGFP	A2 eGFP	A3 eGFP	A1 eGFP+	A2 eGFP+	A3 eGFP+	SS	df	AIC	AICc	BIC	F	p	dAICc	
S6A	5 Hz	20 s	1-10	Raw	"Equation3" pooled data	- and +	Control	sum of two "Equation3"	11-	242	3	-71.30	26.74	2.53	-71.30	26.74	2.53	351728.28	239	2456.93	2465.10	2470.89				10.78
									11+	242	6	-71.22	35.90	1.14	-73.38	160.72	73.12	319721.69	236	2439.84	2454.32	2464.27	7.8751	4.98E-05		
S6B	5 Hz	20 s	1-10	Norm	"Equation3" pooled data	- and +	Control	sum of two "Equation3"	11+	220	3	0.82	-0.29	8.59	0.82	-0.29	8.59	14.31	217	31.21	39.40	44.78				57.98
									11+	220	6	0.95	-114.51	4954.04	0.70	-0.19	3.58	10.40	214	-33.11	-18.58	-9.35	26.8655	8.70E-15		

Supplementary Table 4. Non linear regressions FIGURE 4

Stimulation protocol											Model parameters determined by non linear curve fitting											Model comparison stats						
Figure	Frequency	Protocol	Protocol interval	Type of repetition	eGFP condition	Drug condition	Model	N neurons	N obs	k	A1 eGFP	A2 eGFP	A3 eGFP	A1 eGFP+	A2 eGFP+	A3 eGFP+	SS	df	AIC	AICc	BIC	F	p	dAICc				
S3C	50 Hz	1-10	60 s	Raw	- and +	Control	"Equations3" pooled data	27-	517	3	-68.28	14.98	1.82	-68.28	14.98	1.82	855892.23	514	5307.11	5315.19	5324.10							
							sum of two "Equations3"	19+	517	6	-68.03	3.88	1.01	-68.49	31.86	2.18	795499.75	511	5275.28	5289.50	5305.02	12.9313	<b>3.73E-08</b>	<b>3.73E-08</b>	<b>25.69</b>			
							Linear fit slope=0	27-	308	1	-64.71	0.00	1.01	-68.03	3.88	1.01	682823.28	307	3250.86	3254.90	3258.32							
S3C	50 Hz	1-10	60 s	Raw	+	Control	Linear fit slope=0	19+	209	1	-44.45	0.00	2.18	-44.45	0.00	2.18	132402.80	208	1945.43	1949.49	1952.12							
							Exponential (Equation3)	209	3	-68.49	31.86		-68.49	31.86		1916.44	1924.64	1929.81	17.6121	<b>8.69E-08</b>	<b>8.69E-08</b>	<b>24.85</b>						
							"Equations3" pooled data	27-	470	3	1.02	-0.10	0.07	1.02	-0.10	0.07	233.23	467	1012.46	1020.55	1029.08							
4B, S3D	50 Hz	1-10	60 s	Norm	- and +	Control	sum of two "Equations3"	19+	470	6	1.10	0.10	8.17	0.91	-0.28	1.26	212.36	464	974.40	988.64	1003.47	15.2018	<b>1.88E-09</b>	<b>1.88E-09</b>	<b>31.91</b>			
							Linear fit slope=0	27-	280	1	1.10	0.00		201.79	279	706.89	710.93	714.16										
							Exponential (Equation3)	280	3	1.10	0.10	8.17			201.65	277	710.69	718.84	725.23	0.0956	9.09E-01	9.09E-01	-7.909					
4B, S3D	50 Hz	1-10	60 s	Norm	+	Control	Linear fit slope=0	19+	190	1	0.88			0.88			11.96	189	17.83	21.89	24.32							
							Exponential (Equation3)	190	3	-71.05	-44.47	1.60	-71.05	-44.47	1.60	622509.74	206	2272.94	2281.14	2286.31	6.0999	<b>2.67E-03</b>	<b>2.67E-03</b>	<b>3.89</b>				
							"Equations3" pooled data	27-	506	3	1.46	1.62	8.17	1.46	1.62	8.17	876.68	457	1585.15	1593.24	1601.59							
S3E	50 Hz	1-10	60 s	Raw	- and +	Control	sum of two "Equations3"	19+	506	6	-74.18	-86.24	3.95	-74.18	-86.24	3.95	2907009.78	503	5823.95	5832.03	5840.86							
							Linear fit slope=0	27-	297	1	-142.14	0.00		2405477.14	296	3519.71	3523.75	3527.10										
							Exponential (Equation3)	297	3	-74.27	-123.33	5.07	-74.27	-123.33	5.07	2076127.99	294	3479.98	3488.11	3494.75	23.3195	<b>3.98E-10</b>	<b>3.98E-10</b>	<b>35.64</b>				
S3E	50 Hz	1-10	60 s	Summ.	+	Control	Linear fit slope=0	19+	209	1	-106.84	0.00		-106.84	0.00		659375.99	208	2280.97	2285.03	2287.65							
							Exponential (Equation3)	209	3	-71.05	-44.47	1.60	-71.05	-44.47	1.60	622509.74	206	2272.94	2281.14	2286.31	6.0999	<b>2.67E-03</b>	<b>2.67E-03</b>	<b>3.89</b>				
							"Equations3" pooled data	27-	450	3	1.46	1.62	8.17	1.46	1.62	8.17	876.68	457	1585.15	1593.24	1601.59							
4C, S3F	50 Hz	1-10	60 s	Sum - and +	Control	Control	sum of two "Equations3"	19+	450	6	1.51	2.29	8.70	1.38	0.64	6.06	815.54	454	1558.62	1572.87	1587.38	11.0962	<b>4.90E-07</b>	<b>4.90E-07</b>	<b>20.37</b>			
							Linear fit slope=0	27-	270	1	2.36	0.00		731.22	269	1039.23	1043.27	1046.42										
							Exponential (Equation3)	270	3	1.51	2.29	8.70			671.52	267	1020.23	1028.38	1034.62	11.8691	<b>1.15E-05</b>	<b>1.15E-05</b>	<b>14.89</b>					
4C, S3F	50 Hz	1-10	60 s	1-10	Sum	+	Control	Linear fit slope=0	19+	180	1	1.68	0.00		148.47	189	480.16	484.23	486.54									
								Exponential (Equation3)	180	3	1.38	0.64	6.06	1.38	0.64	6.06	144.02	187	478.68	486.91	491.45	2.7350	6.76E-02	6.76E-02	-2.682			
								"Equations3" pooled data	22-	484	3	-69.41	9.97	2.04	-69.41	9.97	2.04	943143.46	481	5047.78	5055.86	5064.51						
4D	50 Hz	1-5	60 s	Raw	-	Control	sum of two "Equations3"	17+	484	6	-60.37	2.61	2.88	-79.15	17.68	1.65	935579.40	478	5049.88	5064.12	5079.16	1.2882	2.78E-01	2.78E-01	-8.25			
							Linear fit slope=0	17+	374	3	-71.91	34.62	2.42	-71.91	34.62	2.42	237187.61	371	3482.55	3490.65	3498.24							
							Exponential (Equation3)	374	6	-67.00	33.18	3.23	-77.60	37.33	1.80	235260.35	368	3485.49	3499.80	3512.96	1.0049	3.91E-01	3.91E-01	-9.15				

Supplementary Table 5. Non linear regression comparison 5 Hz with 50 Hz FIGURE 3 and 4

Stimulation protocol											Model parameters determined by non linear curve fitting											Model comparison stats				
Figure	Frequency	Protocol	Protocol interval	Type of repetition	eGFP condition	Drug condition	Model	N neurons	N obs	k	A1 5Hz	A2 5Hz	A3 5Hz	A1 50Hz	A2 50Hz	A3 50Hz	SS	df	AIC	AICc	BIC	F	p	dAICc		
3B, 4B	5 Hz	20s	60s	1-10	Norm	-	Control	"Equations3" pooled data	54@50Hz	820	3	1.02	-0.02	0.98	1.02	-0.02	0.98	272.71	817	1432.32	1440.37	1451.16				
								sum of two "Equations3"	27@50Hz	820	6	0.99	-0.07	3.48	1.10	0.00	0.06	268.48	814	1425.50	1439.63	1458.46	4.2777	<b>5.23E-03</b>	<b>5.23E-03</b>	<b>0.738</b>
3B, 4B	5 Hz	20s	60s	1-10	Norm	+	Control	"Equations3" pooled data	49@50Hz	680	3	0.91	-0.20	2.52	0.91	-0.20	2.52	34.09	877	-97.54	-89.48	-79.45				
								sum of two "Equations3"	19@50Hz	680	6	0.92	-0.19	3.99	0.91	-0.28	1.26	31.77	874	-139.40	-125.23	-107.75	16.3811	<b>2.76E-10</b>	<b>2.76E-10</b>	<b>35.75</b>

Supplementary Table 6. Linear regressions FIGURE 5

Stimulation protocol											Model comparison stats										
Figure	Frequency	Protocol	Protocol interval	Type of repetition	eGFP condition	Model	N	N obs	k	SS	df	AIC	AICc	BIC	F	p	dAICc				
5A	5 Hz	20 s	1-10	Relativ	-	y=0x+0	6pairs	10	0	1.99	10	14.25	16.75	14.56							
																		y=A1+A2 *x	8	-15.02	-5.02
5B	50 Hz	60 s	1-10	Relativ	-	y=0x+0	4pairs	10	0	1.25	10	9.59	12.09	9.89							
																		y=A1+A2 *x	8	-17.74	-7.74

Supplementary Table 7. Non linear regressions FIGURE 6 and supplementary figure S7

Figure	Stimulation protocol				Model parameters											Model comparison stats											
	Freq	protocol interval	Protocol	Type of data	eGFP condition	Drug condition	Model	N neurons	N obs	k	A1 control	A2 control	A3 control	A1	A2	A3	CGP55845	CGP55845	CGP55845	SS	df	AIC	AICC	BIC	F	p	dAICc
S7B	5 Hz	20 s	1-10	Raw	-	Control & "Equation3" pooled data CGP55845 sum of two "Equation3"	6	132	3	-55.81	10.62	5.56	-55.81	10.62	5.56	-55.81	10.62	5.56	96495.70	129	1253.07	1261.38	1264.60	0.2059	8.92E-01	-11.94	
																											132
6A, S7C	5 Hz	20 s	1-10	Norm	-	Control & "Equation3" pooled data CGP55845 sum of two "Equation3"	6	120	3	0.92	-1.32	120.00	0.92	-1.32	120.00	0.92	-1.32	120.00	3.63	117	-71.40	-63.05	-60.25	0.1962	8.99E-01	-12.03	
																											120
S7E	50 Hz	60 s	1-10	Raw	-	Control & "Equation3" pooled data CGP55845 sum of two "Equation3"	12	264	3	-91.97	24.14	1.64	-91.97	24.14	1.64	-91.97	24.14	1.64	427700.08	261	2708.22	2716.37	2722.52	0.6698	5.71E-01	-10.23	
																											264
6B, S7F	50 Hz	60 s	1-10	Norm	-	Control & "Equation3" pooled data CGP55845 sum of two "Equation3"	12	240	3	1.02	-0.06	0.04	1.02	-0.06	0.04	1.02	-0.06	0.04	98.52	237	475.41	483.58	489.33	1.4381	2.32E-01	-7.928	
																											240
S7H	5 Hz	20 s	1-10	Raw	+	Control & "Equation3" pooled data CGP55845 sum of two "Equation3"	8	176	3	-64.68	18.77	5.30	-64.68	18.77	5.30	-64.68	18.77	5.30	326569.82	173	1832.03	1840.26	1844.71	0.2219	8.81E-01	-11.74	
																											176
6C, S7I	5 Hz	20 s	1-10	Norm	+	Control & "Equation3" pooled data sum of two "Equation3"	8	160	3	1.00	-0.37	13.53	1.15	-85.77	3662.80	9.20	154	154	154	12.67	157	56.28	64.54	68.58	19.3142	1.11E-10	38.62
S7K	50 Hz	60 s	1-10	Raw	+	Control & "Equation3" pooled data CGP55845 sum of two "Equation3"	6	132	3	-71.90	40.46	1.73	-71.90	40.46	1.73	-71.90	40.46	1.73	115572.90	129	1276.88	1285.20	1288.41	0.8904	4.48E-01	-9.82	
																											132
6D, S7L	50 Hz	60 s	1-10	Norm	+	Control & "Equation3" pooled data sum of two "Equation3"	6	120	6	0.83	-0.28	2.67	0.72	-0.21	1.00	2.80	114	114	114	3.12	117	-89.37	-81.02	-78.22	4.3568	6.05E-03	0.373
S7N	50 Hz	20 s	1-10	Raw	+	Control & "Equation3" pooled data CGP55845 sum of two "Equation3"	7	154	3	-58.68	19.42	7.85	-58.68	19.42	7.85	-58.68	19.42	7.85	69256.72	151	1385.76	1394.03	1397.91	2.6059	5.40E-02	-4.57	
																											154
6E, S7O	50 Hz	20 s	1-10	Norm	+	Control & "Equation3" pooled data sum of two "Equation3"	7	140	3	1.08	-0.28	3.90	1.08	-0.28	3.90	1.08	-0.28	3.90	13.10	137	73.64	81.93	85.41	1.1538	3.30E-01	-8.982	
																											140
6CE, S7IO	50 Hz	20s Ctrl	1-10	Norm	+	Control "Equation3" pooled data sum of two "Equation3"	8	150	3	1.12	-2.12	80.00	1.15	-4.78	200.25	15.12	144	144	15.44	147	92.67	100.95	104.72	1.0335	3.80E-01	-9.32	
																											150
6DE, S7LO	50 Hz	20s Ctrl	1-10	Norm	+	Control "Equation3" pooled data sum of two "Equation3"	7	130	3	1.01	-0.28	2.45	0.83	-0.28	2.67	8.60	124	124	12.12	127	68.48	76.80	79.95	16.9489	2.75E-09	32.07	
																											130

Supplementary Table 8. Non linear regressions FIGURE 7 and supplementary figure S8

Figure	Stimulation protocol										Model parameters										Model comparison stats				
	Frequency	protocol interval	Protocol repetition	Type of data	eGFP condition	Drug condition	Model	N neurons	N obs	k	A1 control	A2 control	A3 control	A1 DPCPX	A2 DPCPX	A3 DPCPX	SS	df	AIC	AICc	BIC	F	p	dAICc	
<b>7A, S8B</b>	5 Hz	20 s	1-10	Raw	-	Control & DPCPX	"Equations3" pooled data sum of two "Equations3"	9	198	3	-84.54	14.12	7.73	-84.54	14.12	7.73	347778.43	195	2049.17	2057.38	2062.32	29,9472	6.28E-16	63.62	
											6	-60.78	9.91	4.15	-108.73	19.22	10.73	236918.36	192	1979.17	1993.76				2002.18
<b>S8C</b>	5 Hz	20 s	1-10	Norm	-	Control & DPCPX	"Equations3" pooled data sum of two "Equations3"	9	180	3	0.97	-0.13	6.15	0.97	-0.13	6.15	7.90	177	-43.96	-35.73	-31.19	0.3670	7.77E-01	-11.29	
											6	0.95	-0.09	3.82	0.99	-0.17	7.79	7.85	174	-39.10	-24.45				-16.75
<b>7B, S8E</b>	50 Hz	60 s	1-10	Raw	-	Control & DPCPX	"Equations3" pooled data sum of two "Equations3"	7	154	3	-84.67	-13.61	0.04	-84.67	-13.61	0.04	786345.89	151	1759.92	1768.18	1772.06	1.9826	1.19E-01	-6.43	
											6	-65.61	-28.94	3.47	-119.29	7673.78	3955.37	755965.17	148	1759.85	1774.62				1781.11
<b>S8F</b>	50 Hz	60 s	1-10	Norm	-	Control & DPCPX	"Equations3" pooled data sum of two "Equations3"	7	140	3	1.20	0.31	3.11	1.20	0.31	3.11	197.12	137	453.20	461.50	464.97	0.6257	6.00E-01	-10.6	
											6	1.19	0.56	3.90	1.23	0.06	0.06	194.39	134	457.26	472.10				477.85
<b>7C, S8H</b>	50 Hz	20 s	1-10	Raw	-	Control & DPCPX	"Equations3" pooled data sum of two "Equations3"	9	198	3	-104.53	-1.83	-3.93	-104.53	-1.83	-3.93	860620.94	195	2228.57	2236.78	2241.73	4.9736	2.40E-03	2.44	
											6	-71.04	-10.90	0.48	-130.34	-18.57	-8.89	798562.47	192	2219.76	2234.34				2242.77
<b>S8I</b>	50 Hz	20 s	1-10	Norm	-	Control & DPCPX	"Equations3" pooled data sum of two "Equations3"	9	180	3	1.22	-4.07	199.98	1.17	-3.72	100.57	61.59	174	331.77	346.42	354.12	2.6551	5.01E-02	-4.366	
											6	1.19	0.06	0.69	1.17	-3.72	100.57	61.59	174	331.77	346.42				354.12
<b>7D, S8K</b>	5 Hz	20 s	1-10	Raw	+	Control & DPCPX	"Equations3" pooled data sum of two "Equations3"	9	198	6	-62.16	17.69	8.91	-62.16	17.69	8.91	238830.83	195	1974.76	1982.97	1987.91	3.5443	1.56E-02	-1.71	
											6	-52.92	-17.40	-18.80	-71.29	13.45	4.14	226298.52	192	1970.09	1984.68				1993.10
<b>S8L</b>	5 Hz	20 s	1-10	Norm	+	Control & DPCPX	"Equations3" pooled data sum of two "Equations3"	9	180	3	0.94	-0.27	10.26	14.42	177	64.45	72.68	77.22	64.45	72.68	77.22	1.60	1.91E-01	-7.52	
											6	0.9199	-2.6885	108.479	0.96761	-0.1152	3.43286	14.03	65.55	80.20	87.90				
<b>7E, S8N</b>	50 Hz	60 s	1-10	Raw	+	Control & DPCPX	"Equations3" pooled data sum of two "Equations3"	7	154	3	-90.97	45.05	2.33	-90.97	45.05	2.33	199289.92	151	1548.53	1556.80	1560.68	2.9007	3.70E-02	-3.70	
											6	-77.94	39.98	2.62	-104.10	50.32	2.12	188222.67	148	1545.73	1560.50				1566.99
<b>S8O</b>	50 Hz	60 s	1-10	Norm	+	Control & DPCPX	"Equations3" pooled data sum of two "Equations3"	7	140	3	0.91	-0.30	5.65	0.91	-0.30	5.65	33.82	137	206.44	214.73	218.20	4.3077	6.18E-03	0.338	
											6	0.84	-0.32	2.63	1.10	-0.21	0.06	30.85	134	199.55	214.40				220.14
<b>7F</b>	5 Hz	20 s	1-10	Raw	- and +	DPCPX	"Equations3" pooled data sum of two "Equations3"	9-	198	3	-89.81	15.26	6.69	-89.81	15.26	6.69	419133.26	195	2086.12	2094.33	2099.27	13.9960	2.73E-08	26.78	
											6	-108.73	19.22	10.73	-71.29	13.45	4.14	343921.71	192	2052.96	2067.55				2075.98

### Supplementary tables 1-8. Data analysis, model comparison and statistics.

The tables correspond to the different figures illustrating the comparisons. The column **Figure** indicates the panel of the figure illustrating the conditions compared. In these figures, the averaged eIPSCs amplitudes in the two conditions are illustrated, but statistical analysis were performed using averaged eIPSCs amplitudes of each neurons. These values were calculated by averaging eIPSCs amplitudes of the same rank obtained from reiterations of the protocols. The reiterations used for the average are indicated in the column **Protocol repetition** (usually iterations 1-10). For protocols using trains of stimulations, the **frequency** of stimulations is given (5 Hz or 50 Hz) as well as the time between protocols (20 s or 60 s) in the column **Protocol interval**. The **Type of data** column indicates whether data were averaged raw eIPSCs amplitudes (Raw) or averaged normalized amplitudes (Norm). The **eGFP condition** column indicates whether the data compared were from eGFP- (-) or eGFP+ (+) neurons or both (+ and -). The **Drug condition** column indicates whether the data compared were recorded without (**Control**) or with CGP55845 or DPCPX, or both. The **Model** column indicates the two models compared. **N neurons** corresponds to the number of neurons (eGFP- (-) or eGFP+ (+)). **N obs** corresponds to the number of observations. In experiments with trains of stimulations, the number of observations per neuron and per condition was of 11 for raw data and 10 for normalized data. **k** corresponds to the number of parameters in the model. A1, A2 and A3 are the parameters calculated by non-linear regression (two A1, A2 and A3 are given when a sum of two regressions are used). **SS** is the residual sum of squares calculated with the model. **df** is the degree of freedom of the model. **AIC** is Akaike information criterion; **AICc** is the AIC corrected for small samples; **BIC** is the bayesian information criterion. **F** is the value of the F-distribution of the comparison between the two models. **p** is the corresponding p-value. **ΔAICc** is the decrease in AICc provided by the model indicated in that line with respect to the model in the line above. A positive value indicate that the model correspond to the most parsimonious explanation with respect to the model in the line above.



# ARTICLE 2

*Changes in short-term synaptic plasticities of GABAergic transmission with lamina II neurons in inflammatory conditions*

Manuscrit non-soumis





## Title

# Changes in short-term synaptic plasticities of GABAergic transmission with lamina II neurons in inflammatory conditions

## Abstract

The dorsal horn of the spinal cord processes nociceptive information from the periphery before forwarding it to the brain where it can eventually lead to the perception of pain. This processing involves GABAergic synapses with lamina II neurons displaying distinct frequency-dependent short-term plasticities depending on the inhibitory or excitatory nature of the postsynaptic interneuron contacted. The aim of this study was to examine whether the short-term plasticities at these connections were altered under conditions of peripheral inflammation (PI). In a model of PI induced by intraplantar injection of carrageenan in mice expressing eGFP under the control of the GAD65 promoter, we demonstrate that GABAergic connections with LII neurons and their plasticities are strongly modified with respect to basal physiological conditions. The changes in plasticity occurring under basal physiological conditions when the frequency is increased occur at low frequency under conditions of PI. This would correspond to a PI-induced shift in the frequency response of the short-term plasticity of these connections. This shift occurs at both low and high frequencies for connections with eGFP- neurons, and is restricted for high frequency for connections eGFP+ neurons. Owing to a slowing of GABAergic eIPSCs deactivation kinetics, connections with both type of neurons displayed an increased time-dependent summation under conditions of peripheral inflammation that was however larger with putative excitatory neurons. The inhibitory controls involving A1 and/or GABA<sub>B</sub> receptors activation by extracellular levels of endogenous agonists were strongly modified under PI: these were lost for connections with putative inhibitory neurons whereas a control involving GABA<sub>B</sub> receptors appeared for connections with putative excitatory neurons.

## Introduction

The dorsal horn (DH) of the spinal cord processes nociceptive information from the periphery before forwarding it to the brain where it can eventually lead to the perception of pain. In lamina II of the DH, networks of excitatory and inhibitory interneurons integrate messages conveyed by C and A $\delta$  primary afferent fibers. Messages from these sensory fibers apprise DH networks of the intensity of sensory stimuli under the form of a frequency-based code of action potential firing (Adrian, 1920; Adrian and Zotterman, 1926; Torebjork and Hallin, 1974; Campero et al., 1996). In other structures, the processing of this frequency-coded information involves frequency selective synapses (Buonomano, 2007), some of which have already been described in the DH (Chery and De Koninck, 2000; Hugel and Schlichter, 2003; Cordero-Erausquin et al., 2005; Labrakakis et al., 2009; Zhang and Schneider, 2011; Ferrini et al., 2020; Cathenaut et al., 2021). In lamina II of the DH, target-specific frequency-selective GABAergic synapses have recently been described (Cathenaut et al., 2021). These synapses display

distinct short-term plasticities (STP) depending on the excitatory or inhibitory nature of the postsynaptic neuron, allowing to tune the balance between inhibition and disinhibition while processing frequency coded-information from primary afferents.

Under conditions of peripheral inflammation, both sensory fibers and spinal nociceptive system undergo a series of changes are termed peripheral and central sensitization (Woolf, 1983; Woolf and Costigan, 1999). Peripheral sensitization include an increased excitability of primary afferent nociceptive fibers (Stanfa et al., 1992; Neumann et al., 1996). Central sensitization include, in the DH, a reduced inhibition (Muller et al., 2003; Harvey et al., 2004; Reinold et al., 2005; Zhang et al., 2008; Zhang et al., 2010) and/or mechanisms of disinhibition where inhibitory controls with inhibitory neurons are potentiated (Chirila et al., 2014; Kloc et al., 2019). Interestingly, in parallel, antinociceptive mechanisms can also be engaged under conditions of inflammation at inhibitory synapses (Poisbeau et al., 2005; Schlichter et al., 2006).

The objective of the present study was to examine the impact of peripheral inflammation (PI) induced by carrageenan on the frequency-selective GABAergic connections recently described in the lamina II of the DH (Cathenaut et al., 2021), using mice expressing enhanced green fluorescent protein (eGFP) under the control of the GAD65 promoter (Cui et al., 2011).

To this end, we applied 10 trains of 11 stimulations with a presynaptic GABAergic neuron connected with eGFP- and eGFP+ neurons and examined the impact these protocols during and across trains. Our data indicate that plasticities at these connections were strongly modified under conditions of PI.

In GABAergic connections with eGFP- neurons, the initial amplitude of electrically evoked inhibitory postsynaptic currents (eIPSCs) were increased in a frequency-dependent manner after the first stimulations, and this increase was larger under conditions of PI. These connections were subjected to a large time-dependent summation that was further increased under PI. Under basal physiological conditions, connections with eGFP- neurons were subjected to an inhibitory control involving A1 receptors (Cathenaut et al., 2021) that was also observed under conditions of PI, but only at low frequency of stimulation. In addition, under conditions of PI, a tonic inhibition of connections with eGFP- neurons involving GABA<sub>B</sub> autoreceptors was observed at low frequency of stimulation.

By contrast, for all tested conditions, the connections with eGFP+ neurons showed a strong depression. Under conditions of PI, initial amplitudes were only strongly increased when trains of stimulations at high frequency were applied. The modulations inhibiting these connections through activation of GABA<sub>B</sub> and A1 receptors by endogenous agonists were lost under conditions of PI.

## **Methods**

### **Animals**

For all experiments, we used heterozygous C57BL/6 BAC transgenic mice eGFP under the control of the GAD65 promoter obtained from Ferenc Erdelyi and Gabor Szabo (Institute of Experimental Medicine, Budapest) (Cui et al., 2011). In these mice, ~80% of LII eGFP+ neurons

are GABA-immunopositive and ~60% of GABA-immunopositive neurons are eGFP+ (Cui et al., 2011). These mice were interbred at the local animal facility, The Chronobiotron (agreement number: A67-2018-38). The animals were housed at room temperature (22-25°C) with a 12 h light/dark cycle with free access to food and water. All procedures used were in accordance with laws for laboratory animal welfare and approved by the local ethical committee of the University of Strasbourg (CREMEAS; agreement number: APAFIS#8138-2016121008385362 v3).

### **Model of peripheral inflammation: carrageenan-induced paw inflammation**

A bilateral injection (10 µl) of λ-carrageenan (3% in NaCl (0.9%), Sigma) was performed in the plantar surface of the hind paws 24h prior to the slicing procedure. Carrageenan injections were performed under light isoflurane anesthesia (3%).

### **Slicing procedure**

Adult transgenic mice (5-9 weeks) were anaesthetized with urethane (1.9 g.kg<sup>-1</sup>). Under deep anesthesia, intracardiac perfusion was performed with oxygenated ice-cold (~4°C) sucrose artificial cerebrospinal fluid (sACSF) bubbled with carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) containing (in mM): 248 sucrose, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 11 glucose, 2 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgSO<sub>4</sub>, 1.25 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 kynurenic acid. The lumbar part (L3-L5) of the spinal cord was removed by laminectomy and 400 µm thick transverse slices were cut with a vibrating microtome (Leica, VT1200S). Slices were kept until recording at room temperature (~25°C) in oxygenated ACSF containing in mM: 126 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 glucose.

### **Patch-clamp recordings**

After recovery (~1 h), slices were transferred to the recording chamber, maintained at 32 ± 1°C and continuously perfused by oxygenated ACSF at 3-4 ml/min. In order to isolate GABAergic IPSCs, glycinergic and glutamatergic ionotropic transmissions were blocked by adding in ACSF 1 µM strychnine and 10 µM 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) respectively. Whole-cell patch recordings were made from inhibitory (eGFP+) and putative excitatory (eGFP-) LII neurons. Recording and extracellular stimulation electrodes (4-7 MΩ) were pulled from borosilicate glass capillaries (1.2 mm inner diameter, 1.69 mm outer diameter, Warner Instruments, Harvard Apparatus) using a P1000 electrode puller (Sutter Instruments). Recording electrodes were filled with, in mM: 140 KCl, 2 MgCl, 10 HEPES, 2 MgATP; pH 7.3. Junction potentials were not corrected. Whole-cell patch clamp recordings (in current-clamp and voltage-clamp recording modes) were made using a Multiclamp 700A amplifier (Molecular Devices). Signals were low-pass filtered at 5 kHz, sampled at 20 kHz, digitized using a BNC-2110 data acquisition card (National Instruments) and acquired with the Strathclyde electrophysiology software (WinWCP, John Dempster, University of Strathclyde, Glasgow, UK).

### **Experimental design**

Our recordings started in the current-clamp mode. Holding current was adjusted in order to maintain the recorded neuron at a membrane potential of -60 mV. In this mode, firing patterns were determined in response to 1 s-long depolarizing current injections through the recording electrode (20-80 pA in 20 pA steps). After this initial phase, neurons were recorded in the voltage-clamp mode at a holding potential of -60 mV. Monosynaptic IPSCs were evoked by local extracellular electrical stimulation. This stimulation was performed by applying current steps (0.25 ms; 0.10-0.40 mA) via a patch-pipette filled with ACSF. This stimulation electrode was placed at a distance of 20-150  $\mu\text{m}$  from the cell body of the recorded neuron. For each recorded neuron, the lowest amplitude of stimulation evoking inhibitory postsynaptic currents was determined. This amplitude was increased by 0.05 mA to evoke inhibitory postsynaptic currents (eIPSCs) at every stimulation. Synaptic contacts were identified as monosynaptic unitary connections when the following criteria were satisfied: (1) all-or-none appearance of eIPSCs, (2) absence of increase in eIPSC amplitude when minimal stimulation amplitude was increased by 0.05 mA, (3) disappearance of eIPSCs when stimulation polarity was inverted, and (4) constant latency of the eIPSCs.

Trains applied at 5 Hz were repeated every 20 s whereas trains applied at 50 Hz were applied every 60 s.

#### **Data quantification and analysis**

Action-potential firing patterns were analyzed offline using Clampfit 10 (Molecular Devices, USA). Neurons firing multiple spikes during the whole duration of the depolarizing current step and displaying a constant interval between each spike were classified as Tonic-firing type (Tonic); neurons with a burst of spikes at the beginning of depolarizing current step and showing a decrease in inter-spike interval duration during the step as well as a progressive reduction of spike amplitudes were classified as Initial bursting type (IB); neurons fulfilling neither of these criteria were classified as "Other type" of firing pattern.

eIPSCs were also analyzed offline using Clampfit 10. Synaptic inhibitory transmission was quantified by measuring the amplitude of individual eIPSCs. To take into account baseline changes due to eIPSCs summation, the amplitude immediately before stimulation was subtracted from the peak amplitude of each eIPSC. Unless otherwise stated, stimulation protocols were applied ten times in each neuron and the within-cell average across trials was calculated by averaging eIPSCs amplitudes from these ten repetitions. Amplitudes of eIPSCs of the same rank in the train were averaged. These within-cell average across ten trials were used for statistical analysis.

Averaging amplitudes of raw eIPSCs gives greater weight to connections in which eIPSCs display larger amplitudes. Therefore, in addition to analyzing raw eIPSCs amplitudes, we calculated normalized eIPSCs amplitudes. These were calculated by normalizing for each neuron the averaged eIPSCs amplitudes to the averaged amplitude of the first eIPSCs in the train. This allowed to analyze relative changes in amplitude during trains regardless of the initial raw amplitude values of eIPSCs. Both raw and normalized eIPSCs amplitudes were used for statistical analysis (see supplementary tables).

The weighted decay time constant ( $\tau_w$ ) was calculated as described in Labrakakis et al. (2014) from biexponential fits using equation 1.

$$\text{Equation 1. } \tau_w = (\tau_f \cdot A_f + \tau_s \cdot A_s) / (A_f + A_s)$$

where  $\tau_f$  and  $\tau_s$  are the fast and slow decay time constants, respectively and  $A_f$  and  $A_s$  the corresponding amplitudes used as weighting factors.

For experiments with GABA<sub>B</sub> and A1 antagonists, trains of stimulations were repeated before, during and after perfusion of the antagonists. Ten trains were applied in control conditions and the antagonist was subsequently applied for 10 minutes. The effect of antagonists was measured after at least 3 minutes of perfusion. For each neuron, amplitudes of eIPSCs of the same rank in the two conditions (i.e. control vs. antagonist) were averaged. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM.

### Statistics

Statistical analysis were performed using averaged eIPSCs amplitudes (i.e. within-cell average across trials) of each neurons. These were calculated for each neuron by averaging amplitudes of eIPSCs of the same rank (11 ranks for trains of 11 stimulations). The number of neurons is given as the n-value in the result section, the number of PI mice used is given in brackets after the number of neurons.

Student's *t*-test were used to compare eIPSCs decay time constants after having tested data normality (Kolmogorov-Smirnov test,  $p > 0.05$ ).

Non-linear regression analysis (Motulsky and Christopoulos, 2003) was used to analyze changes in eIPSCs amplitudes during stimulation train protocols. Individual data of all neurons were always used for curve fitting and average values were used for illustration. This analysis was performed using averaged eIPSCs amplitudes of each neurons see (Cathenaut et al., 2021). Amplitudes of eIPSCs as a function of their respective rank in the train were fitted using the equation 2.

$$\text{Equation 2. } Y = A_1 + A_2 \cdot (1 - \text{EXP}(-X/A_3))$$

where  $A_1$  corresponded to  $Y$  value of the 1<sup>st</sup> eIPSCs of the train,  $A_2$  corresponded to the change in amplitude for the curve asymptote,  $A_3$  corresponded to the constant of the exponential function.

$A_1$  and  $A_2$  are in pA for fits of raw eIPSCs amplitudes and are dimensionless for fits of normalized eIPSCs amplitudes.  $A_3$  unit is the rank of stimulation in the train.

To define whether STP was expressed during trains of stimulations, i.e. whether significant changes in amplitude occurred during the train, fits with Equation 2 were compared with linear fits with slope values forced to 0. When fits with Equation 2 provided statistically significant improvements with respect to the linear fit with slope value forced to 0, the connections were considered as displaying a significant STP during the corresponding protocol (Motulsky and Christopoulos, 2003).

To compare two different conditions (e.g. eGFP<sup>-</sup> vs. eGFP<sup>+</sup>, or 5 Hz vs. 50 Hz, or control conditions vs. conditions of PI, or presence/absence of antagonists) data from each conditions were fitted with Equation 2, either individually (sum of two functions) or pooled (one single

function). When the sum of two individual fits provided statistically significant improvements with respect to the fit of pooled data, the two conditions were considered as having distinct effects (Motulsky and Christopoulos, 2003). Fits of pooled data are illustrated (in black) when the two conditions were not different whereas individual fits are illustrated (in color) when the two conditions were significantly different. For illustration purpose, these fits are illustrated together with the averages of “cross-trial averages”. For illustration purpose, the effects of antagonists are illustrated as the amplitude difference measured before and in presence of antagonists.

In the result section, p-value of model comparisons are given as well as the corresponding number of neurons (n). The significance level used for all analysis was set at 0.05. The goodness-of-fit was also compared by calculating for both conditions Bayesian Information Criterion (BIC), Akaike Information Criterion (AIC), and the corresponding sample-size bias-corrected values (AICc) (Spiess and Neumeyer, 2010). A model was considered as better if model comparison p-value was < 0.05 and if the model provided a reduction in AIC. When the sample size was too small to use the AIC (ie. When the ratio between the number of observations and the number of parameters was < 30), the AICc value was considered. For all our data, the p-value and change in AIC (or AICc when AIC was not applicable) were consistent. Details of all models (A1, A2, A3, degree of freedom, Residual sum of squares, AIC, AICc, BIC) as well as details of model comparison (F, P, differences in AIC, AICc and BIC) are given in Supplementary tables 1-12.

### **Drug application / Pharmacology**

All pharmacological agents were bath-applied. 1  $\mu$ M strychnine and 10  $\mu$ M CNQX were present in all our electrophysiological experiments to isolate GABAergic eIPSCs. CGP55845 ((2S)-3-[[[(1S)-1-(3,4-Dichlorophenyl)ethyl]amino-2hydroxypropyl](phenylmethyl)phosphinic acid hydrochloride; 10  $\mu$ M, Tocris) and DPCPX (8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine solid; 10  $\mu$ M, Sigma) were used to block GABA<sub>B</sub> receptors and Adenosine A1 receptors, respectively. In a subset of experiments, eEPSCs were recorded in presence of strychnine (1  $\mu$ M) and bicuculline (10  $\mu$ M, sigma). CNQX and CGP55845 were dissolved in DMSO, DPCPX was dissolved in ethanol and strychnine in water; all were prepared as x10000 concentrated stock solutions. All substances were diluted to their final concentration in ACSF at the beginning of each experiment. Effects of CGP55845 or DPCPX are illustrated as the amplitude difference before and in presence of the antagonist, but analysis were performed on raw data as indicated above.

### **Results**

To investigate the impact of PI on the short-term plasticity of GABAergic transmission with lamina II neurons, we used slices prepared from GAD65-eGFP transgenic mice 24h after induction of a peripheral inflammation (PI). We recorded GABAergic connections with 74 eGFP- neurons from 33 mice and 64 eGFP+ neurons from 34 mice, corresponding respectively to putative excitatory and putative inhibitory neurons. The short-term plasticities displayed

under inflammatory condition by these connections are described and compared with previous data describing these plasticities under basal physiological conditions (Cathena et al., 2021).

### **1. Firing properties of eGFP- and eGFP+ neurons under peripheral inflammation condition**

Under PI condition, most of eGFP- neurons displayed an IB firing pattern (36 %, 26/72), and a lower proportion of Tonic (15 %, 11/72) and other firing patterns (49 %, 35/72). Most of eGFP+ neurons displayed a Tonic firing pattern (53 %, 35/66), and a lower proportion of IB (14 %, 9/66) and other firing patterns (33 %, 22/66). The proportions of IB, Tonic and other firing patterns in eGFP- and eGFP+ neurons were significantly different (Fisher's exact test,  $P = 5.67 \cdot 10^{-6}$ , Fig. 1).

In a previous work on control animals, we reported a similar difference in the proportion of action potential firing mode in eGFP- and eGFP+ neurons (Cathena et al., 2021), and the proportions of the different firing modes were similar in control and PI conditions for both eGFP- neurons (Fisher's exact test,  $P = 0.34$ ) and eGFP+ neurons (Fisher's exact test,  $P = 0.09$ , Fig. 1). These data revealed no changes in proportions of action potential firing patterns under PI conditions with respect to basal physiological conditions.

### **2. Effect of PI on amplitudes and deactivation kinetics of GABAergic eIPSCs**

Previous works indicated that PI increased the deactivation kinetics but did not change the amplitude of miniature GABAergic synaptic currents recorded in rat lamina II neurons (Poisbeau et al 2005). We therefore examined whether deactivation kinetics and amplitudes of GABAergic eIPSCs were modified in our conditions. This was assessed by analyzing the first eIPSCs from trains at 5 Hz (see below). Under PI conditions, the average amplitude of the first GABAergic eIPSC (Fig. 2, 3) was not significantly different when recorded in eGFP- neurons ( $-69.7 \pm 5.0$  pA;  $n = 74$ ) or in eGFP+ neurons ( $-61.4 \pm 4.1$  pA;  $n = 64$ ); (unpaired Student's  $t$ -test,  $t = -1.262$ ,  $df = 136$ ,  $P = 0.21$ ). These values were not different from eIPSCs amplitudes recorded under basal physiological conditions (unpaired Student's  $t$ -test,  $t = 1.261$ ,  $df = 126$ ,  $P = 0.21$  for eGFP- neurons and  $t = 0.963$ ,  $df = 111$ ,  $P = 0.34$  for eGFP+ neurons). Under PI conditions, the weighted decay time constant ( $\tau_w$ ) measured for the first GABAergic eIPSCs of trains at 5 Hz (Fig. 2, 3) was not significantly different when recorded in eGFP- neurons ( $49.0 \pm 3.0$  ms;  $n = 68$ ) or in eGFP+ neurons ( $56.7 \pm 5.3$  ms,  $n = 62$ ); unpaired Student's  $t$ -test,  $t = -1.288$ ,  $df = 128$ ,  $P = 0.200$ .

Interestingly, with respect to basal physiological conditions, the  $\tau_w$  of GABAergic eIPSCs recorded under PI was increased by 49.3 % in eGFP- neurons and by 82.2 % in eGFP+ neurons (unpaired Student's  $t$ -test,  $t = -3.255$ ,  $df = 95$ ,  $P = 1.57 \cdot 10^{-3}$ ;  $t = -2.504$ ,  $df = 78$ ,  $P = 1.44 \cdot 10^{-2}$ , respectively, Fig. 2, 3). These data indicate that under PI, in both eGFP- and eGFP+ neurons, the first GABAergic eIPSCs evoked during trains at 5 Hz every 20 s was strongly prolonged, whereas their amplitude appeared unaffected.

### 3. Short-term plasticities of GABAergic connections during trains at 5 Hz and 50 Hz

We examined the characteristics of GABAergic connections with LII neurons during their repeated activation at low (5 Hz) and high (50 Hz) frequencies under conditions of PI. These trains consisted in 11 stimulations repeated 10 times. For these experiments, GABAergic eIPSCs evoked at 5 Hz were recorded in 74 eGFP- neurons (33 mice) and 64 eGFP+ neurons (34 mice), and eIPSCs evoked at 50 Hz were recorded in 30 eGFP- neurons (21 mice) and 26 eGFP+ neurons (20 mice).

For protocols at both 5 Hz and 50 Hz and connections on both eGFP- and eGFP+ neurons, evolution of eIPSCs amplitudes remained similar in the first five and the last five trains, indicating that no train-to-train plasticity was detected under these experimental conditions (eGFP- at 5 Hz:  $P = 0.78$ ; eGFP+ at 5 Hz:  $P = 0.98$ ; eGFP- at 50 Hz:  $P = 0.22$ ; eGFP+ at 50 Hz:  $P = 0.54$ ; Table S1, Fig. S1), allowing to average the traces of the 10 trains for each neurons.

#### 3.1. Inhibitory connections with eGFP- neurons

Under condition of PI, amplitudes of eIPSCs started at an initial value of  $-69.7 \pm 5.0$  pA and significantly decreased during trains at 5 Hz ( $P = 4.15 \cdot 10^{-2}$ , Fig. 2C, Table S2), reaching 69% of the initial amplitude at 11<sup>th</sup> stimulation, indicating that a short-term plasticity was expressed during the train at this frequency. Interestingly, the average amplitude of eIPSCs during trains at 50 Hz started at a larger initial value of  $-78.6 \pm 7.2$  pA and decreased significantly in the course of the subsequent stimulations, reaching 73% of the initial amplitude at the 11<sup>th</sup> stimulation ( $P = 1.03 \cdot 10^{-3}$ , Fig. 2C, Table S2). The increase in amplitude occurring during repeated trains at 50 Hz took place at the onset of the first train at 50 Hz since no differences were detected when the first five and the last five trains were compared ( $P = 0.22$ , Table S1, Fig. 2C, Fig. S1). The evolution of eIPSCs amplitudes during 5 Hz and 50 Hz trains under conditions of PI was significantly different ( $P = 3.72 \cdot 10^{-2}$ , Table S5, Fig. 2C), but reached a similar value by the end of the train.

Interestingly, amplitudes of eIPSCs recorded during trains at 5 Hz under basal physiological conditions and under conditions of PI differed significantly ( $P = 0.010$ , Table S4, Fig. 2C), the former remaining unchanged during the train (Cathenaut et al., 2021), the latter starting at a larger amplitude followed by a significant decrease in the amplitude of subsequent eIPSCs. As a consequence, under basal physiological conditions, the short-term plasticity at 50 Hz was similar to that observed under condition of PI at 5 Hz ( $P = 0.51$ , Table S6, Fig. 2C). This suggests that the changes in plasticity occurring when the frequency is increased may be already engaged at low frequency under conditions of PI. This would correspond to a PI-induced shift in the frequency response of the short-term plasticity at GABAergic connections with eGFP- neurons.

During 50 Hz trains, the eIPSCs had not fully returned to baseline at the onset of the following eIPSC, particularly since deactivation kinetics were increased under PI (see above). Since this situation resulted in eIPSCs summation, we reanalyzed our data measuring summated eIPSCs amplitudes from the basal holding current of each train (Fig. 2D; Table S10). Increase in amplitude by summation during 50 Hz trains was significantly faster under PI conditions with



respect to basal physiological conditions (difference in exponential time constant:  $P = 3.55 \cdot 10^{-2}$ , Fig. 2D, Table S10 for comparison of rate of amplitude increase), a doubling in amplitude occurring respectively at the 4<sup>th</sup> and the 6<sup>th</sup> stimulations.

These data indicated that conditions of PI increased the amplitudes of GABAergic eIPSCs recorded on eGFP- neurons during trains of activity in a frequency-dependent manner. The amplitudes depressed during the trains, reaching a similar value at their term irrespective of the frequency. Nevertheless, at 50 Hz, the inhibitory control was increased throughout the train owing to a time-dependent summation taking place faster under conditions of peripheral inflammation.

### 3.2. Inhibitory connections with eGFP+ neurons

Under condition of PI, initial amplitudes of eIPSCs were of  $-61.4 \pm 4.0$  pA and significantly decreased during trains at 5 Hz ( $P = 1.28 \cdot 10^{-9}$ , Fig. 3C, Table S3), reaching 69% of the initial amplitude at the 11<sup>th</sup> stimulation, indicating that a short-term plasticity was expressed during the train at this frequency of stimulation. Interestingly, as for GABAergic connections with eGFP- neurons, the average amplitude of eIPSCs during trains at 50 Hz started at a larger initial amplitude values of  $-83.2 \pm 9.2$  pA and decreased strongly during of the subsequent stimulations, reaching 55% of the initial amplitude at the 11<sup>th</sup> stimulation ( $P = 2.23 \cdot 10^{-9}$ , Fig. 3C, Table S3). The higher amplitudes of eIPSCs were observed and maximal already for the first stimulation within the 50 Hz trains. No differences were detected when comparing the first five and the last five trains ( $P = 0.54$ , Table S1, Fig. 3C, Fig. S1).

The evolution of eIPSCs amplitudes during 5 Hz and 50 Hz trains under conditions of PI was significantly different ( $P = 2.11 \cdot 10^{-5}$ , Table S5, Fig. 3C), but reached similar amplitude values by the end of the train.

Interestingly, the amplitudes and short-term plasticities of eIPSCs were similar during 5 Hz trains under both basal physiological conditions and PI and during 50 Hz trains under physiological conditions (5 Hz ctrl vs. PI:  $P = 0.33$ , Table S4, 50 Hz ctrl vs. 5 Hz PI:  $P = 0.12$ ; Table S6, Fig. 3C). However, these amplitude values and short-term plasticities were significantly different from those observed during trains at 50 Hz under PI conditions (50 Hz PI vs. 50 Hz ctrl:  $P = 1.63 \cdot 10^{-3}$ , Table S4; 50 Hz PI vs. 5 Hz ctrl:  $P = 3.61 \cdot 10^{-7}$ ; Table S7, Fig. 3C).

These data indicated that unlike the situation observed under basal physiological conditions, the short-term plasticity expressed under PI conditions by GABAergic connections with eGFP+ neurons strongly depended on the frequency of stimulation. As for GABAergic connections with eGFP- neurons, this suggested that PI conditions changed the frequency response of the short-term plasticity at GABAergic connections with eGFP+ neurons.

We next reanalyzed our data by measuring the amplitudes of summated eIPSCs from the basal holding current before each train (Fig. 3D; Table S10). Increase in amplitude by summation during 50 Hz trains was significantly larger under PI conditions with respect to basal physiological conditions ( $P = 3.01 \cdot 10^{-4}$ , Fig. 3D), the amplitudes reaching respectively 147 pA and 116 pA at the asymptote (see fitting parameters Table Sx).

These data indicated that conditions of PI increased the amplitudes of GABAergic eIPSCs only during trains at 50 Hz. The amplitudes depressed during the trains, reaching a similar value at the end of the train of electrical stimulations, irrespective of the frequency. Nevertheless, at 50Hz, the inhibitory control was increased throughout the train owing to a time-dependent summation that was larger under conditions of peripheral inflammation.

### **3.3. Comparison of plasticities under conditions of peripheral inflammation in eGFP- and eGFP+ neurons**

Under conditions of PI, the evolution of normalized eIPSCs amplitudes was significantly different in eGFP- and eGFP+ neurons during both trains at 5 Hz and 50 Hz ( $P_{5\text{Hz}} = 2.48 \cdot 10^{-13}$ ,  $P_{50\text{Hz}} = 6.64 \cdot 10^{-8}$ , Table S9, Fig. 2C, 2D) indicating that characteristics of the short-term plasticities depended on the type of postsynaptic neuron contacted. During both trains at 5 Hz and 50 Hz, the decrease in eIPSCs amplitudes was faster and stronger for connections with eGFP+ neurons with respect to connections with eGFP- neurons (see parameters of the curve fitting, Table S9). Although amplitude of individual eIPSCs decreased during trains at both 5 and 50 Hz, these were increased by summation during trains at 50 Hz. This increase by summation was significantly larger for connections with eGFP- neurons with respect to connections with eGFP+ neurons ( $P = 1.08 \cdot 10^{-6}$ , Fig. 2D, 3D, Table S10), the former reaching 195 pA and the latter 147 pA at the asymptote.

These data indicated that under conditions of PI, GABAergic connections with eGFP- and eGFP+ neurons displayed different characteristics of short-term plasticity during high frequency activity: connections with eGFP+ neurons showed strong depression and limited summation whereas connections with eGFP- neurons showed limited depression and large summation.

## **4. Activity-dependent modulations of GABAergic connections by GABA<sub>B</sub> and A1 receptors under conditions of peripheral inflammation**

Under basal physiological conditions, GABAergic connections with eGFP+ neurons are modulated by GABA<sub>B</sub> receptors in a phasic manner and both connections with eGFP- and eGFP+ neurons are inhibited by an activity-dependent tone of adenosine acting on A1 receptors (Cathenaut et al., 2021). We therefore examined whether these receptors were engaged in the control of these connections under conditions of PI.

To this end, the protocols of 10 trains of stimulations used in the previous experiments were applied twice, i.e. before and during bath application of 10 μM CGP55845, a GABA<sub>B</sub> receptors antagonist, or before and during application of 10 μM DPCPX, an antagonist of A1 receptors.

### **4.1. Modulations of GABAergic connections with eGFP- neurons**

Under conditions of PI, in eGFP- neurons, both CGP55845 and DPCPX significantly increased the amplitudes of GABAergic eIPSCs during trains at 5 Hz ( $P_{\text{CGP55845}} = 5.82 \cdot 10^{-9}$ ,  $n = 10$  in 7 mice, Fig. 2E;  $P_{\text{DPCPX}} = 4.90 \cdot 10^{-2}$ ,  $n = 11$  in 8 mice, Fig. 2F; Table S11). The average increase in amplitude during the trains was of  $-21.2 \pm 0.8$  pA for CGP55845, and of  $-18.8 \pm 1.3$  pA for

DPCPX. Interestingly, neither CGP55845 nor DPCPX changed the amplitude of GABAergic eIPSCs during trains at 50 Hz ( $P_{\text{CGP55845}} = 6.94 \cdot 10^{-2}$ ,  $n = 11$  in 5 mice, Fig. 2E;  $P_{\text{DPCPX}} = 4.10 \cdot 10^{-2}$ ,  $n = 12$  in 7 mice, Fig. 2F; Table S11), suggesting that inhibitory mechanisms engaged by endogenous activation of GABA<sub>B</sub> or A1 receptors may have been counterbalanced by the facilitation taking place during trains at high frequency.

Interestingly, under basal physiological conditions, CGP55845 had no effect on amplitudes of eIPSCs recorded from eGFP<sup>-</sup> neurons, whereas DPCPX had a significant effect on eIPSCs evoked at 5 Hz (Cathena et al., 2021).

These data indicate that under basal physiological conditions, connections with eGFP<sup>-</sup> neurons are subjected to a tonic inhibitory control involving extracellular concentration of adenosine. Under conditions of PI at low frequency of activity, this inhibitory control involving extracellular adenosine occurs along with an inhibition involving GABA<sub>B</sub> receptors, but these controls appear surmounted by the strong facilitation occurring during stimulations at high frequencies.

#### 4.2. Modulation of GABAergic connections with eGFP<sup>+</sup> neurons

Under basal physiological conditions, GABAergic connections with eGFP<sup>+</sup> neurons were subjected to a tonic control involving A1 receptors during both trains at 5 Hz and 50 Hz ((Cathena et al., 2021), Fig. S2). Under conditions of PI, in eGFP<sup>+</sup> neurons, neither CGP55845 nor DPCPX significantly changed the amplitudes of GABAergic eIPSCs during both trains at 5 Hz and 50 Hz ( $P_{\text{CGP55845,5Hz}} = 1.15 \cdot 10^{-1}$ ,  $n = 10$  in 7 mice,  $P_{\text{CGP55845,50Hz}} = 1.21 \cdot 10^{-1}$ ,  $n = 12$  in 8 mice, Fig. 3E;  $P_{\text{DPCPX,5Hz}} = 4.50 \cdot 10^{-1}$ ,  $n = 11$  in 7 mice;  $P_{\text{DPCPX,50Hz}} = 9.35 \cdot 10^{-1}$ ,  $n = 10$  in 7 mice; Fig. 3F; Table Sx). In addition to the tonic control involving A1 receptors, during stimulations at 5 Hz, connections with eGFP<sup>+</sup> neurons were subjected to a phasic inhibition involving GABA<sub>B</sub> receptors visible when eIPSC amplitudes were normalized to the first eIPSCs of the control trains ((Cathena et al., 2021), Fig. S2). This phasic inhibition was not observed under conditions of PI ( $P = 1.22 \cdot 10^{-1}$ ,  $n = 10$  in 7 mice; Fig. S2; Table S12).

These data indicated that the endogenous inhibitory controls of GABAergic connections with eGFP<sup>+</sup> neurons involving GABA<sub>B</sub> and A1 receptors were either lost or masked under conditions of PI.

## Discussion

In a model of PI in mice expressing eGFP under the control of the GAD65 promoter, we demonstrate that GABAergic connections with LII neurons and their plasticities are strongly modified with respect to basal physiological conditions. The changes in plasticity occurring under basal physiological conditions when the frequency is increased may be already engaged at low frequency under conditions of PI. This would correspond to a PI-induced shift in the frequency response of the short-term plasticity of these connections.

Importantly, in the transgenic mice we used, ~80% of LII eGFP<sup>+</sup> neurons were shown to be GABA-immunopositive and ~60% of GABA-immunopositive neurons express eGFP (Cui et al., 2011). Therefore, eGFP<sup>+</sup> neurons mainly represent GABAergic neurons, and eGFP<sup>-</sup> neurons

excitatory neurons, although the matching is not perfect. The shift in frequency that we observed under PI occurs at both low and high frequencies for connections with putative excitatory neurons, and is restricted to high frequency for connections with putative inhibitory neurons (eGFP+). Connections with both type of neurons displayed an increase in time-dependent summation of eIPSCs under conditions of PI that was larger with putative excitatory neurons. The inhibitions mediated by endogenous activation of A1 and/or GABA<sub>B</sub> receptor were strongly modified under PI: these were observed during low frequency of activity in connections with putative excitatory neurons whereas they were not detected for connections with putative inhibitory neurons.

### **Action potential firing patterns**

Under both basal physiological conditions and PI, most eGFP- neurons displayed an IB type of action potential firing profile, whereas most of eGFP+ neurons had a Tonic action potential firing pattern. The proportion of Tonic, IB and other profiles were similar in eGFP- and eGFP+ neurons under conditions of PI. In eGFP-expressing neurons recorded from GAD67-eGFP mice LII, the relative proportions of AP firing patterns remained also similar in models of peripheral neuropathy with respect to sham animals, although some changes in AP frequency and amplitude were noted (Schoffnegger et al., 2006; Zhang et al., 2018).

A similar increased excitability, but with no information on the firing patterns, was reported in rat lamina II neurons in a model of arthritic pain, and in wide dynamic range neurons of the DH of a model of CFA-induced PI (Bird et al., 2006; Aby et al., 2018). Interestingly, in aging rats considered as undergoing inflammatory conditions, no significant changes in AP profiles were reported although some tendencies were noted (Mayhew et al., 2019). Our results are therefore in agreement with the literature in suggesting that action potential firing patterns were not significantly modified in LII neurons under conditions of PI. Importantly, the firing properties of neurons from deep DH laminae can be rapidly switched by applications of agonists of G-protein coupled receptors (Derjean et al., 2003). Our previous work indicated that the build-up of extracellular GABA or adenosine tones depended on the frequency of activity (Cathenaut et al., 2021). Since we determined firing patterns before applying trains of stimulations, we may have missed changes in firing patterns controlled by activity-dependent tones of extracellular GABA or adenosine.

### **Changes in synaptic inhibition under conditions of PI.**

Our results indicated that when trains of stimulations were repeated, initial eIPSCs amplitudes of the trains were increased in a frequency-dependent manner and/or under conditions of PI. The effect of frequency on initial amplitudes observed under PI took place at the onset of the first trains at 50 Hz. Interestingly in connections with eGFP+ neurons, this increase in initial amplitudes was restricted to high frequency conditions under PI. A similar increase in GABAergic contribution to synaptic inhibition was observed lamina Ili of mice in a model of CFA-induced PI (Takazawa et al., 2017).

Time-dependent summation of postsynaptic currents is a form of short-term plasticity which depends on various parameters such as the degree of saturation of postsynaptic receptors by the synaptically released neurotransmitter (Xu-Friedman and Regehr, 2004). The required conditions for a summation to occur will depend on both the frequency of stimulation and the deactivation kinetics of the synaptic currents. Our results indicated that deactivation of GABAergic eIPSCs was slower under conditions of PI. A similar increase in duration of IPSCs has been reported in rat lamina II neurons under conditions of PI. This phenomenon had an antihyperalgesic effect involving the local synthesis of  $3\alpha,5\alpha$ -reduced neurosteroids (Poisbeau et al., 2005; Schlichter et al., 2006).

As a consequence of these slower deactivation kinetics, we observed an increased time-dependent summation at high frequency of stimulation under conditions of PI for both connections with eGFP- and eGFP+ neurons. This time-dependent summation was larger and still not reaching a plateau at the end of the train in eGFP- neurons whereas it reached a plateau after a few stimulations in connections with eGFP+ neurons, suggesting that these connections might involve distinct degrees of postsynaptic receptors saturation.

### **Frequency-dependent control of short-term plasticity by endogenous activation of GABA<sub>B</sub> and A1 receptors**

Under basal physiological conditions, GABAergic connections with putative excitatory neurons were subjected to an activity-dependent inhibition by A1 receptors at low frequency of activity or when trains at high frequency were repeated every 20 s (Cathenaut et al., 2021). Under conditions of PI, this inhibition was still engaged for low frequency of activity, but was complemented at these low frequencies by activation of GABA<sub>B</sub> receptors that were not engaged under basal physiological conditions. This is in line with previous studies suggesting that the tone of GABA may be increased in the DH under inflammatory conditions in the rat (Castro-Lopes et al., 1992). Nevertheless, extracellular concentrations of GABA acting on GABA<sub>B</sub> receptors have been shown to tonically inhibit glutamatergic excitatory postsynaptic currents in the superficial and deep laminae of the DH under basal physiological conditions (Fukuhara et al., 2013; Salio et al., 2017), indicating that tonic inhibition involving GABA<sub>B</sub> receptors can be engaged even under basal physiological conditions.

Under basal physiological conditions, GABAergic connections with putative inhibitory neurons were inhibited by tonically activated A1 receptors (Cathenaut et al., 2021). This inhibition was lost or masked under conditions of PI. Adenosine acting on A1 receptors has an antinociceptive and/or an antihyperalgesic action in both neuropathic and inflammatory pain models (Zylka, 2011; Sawynok, 2016). Interestingly, excitatory synaptic transmission in lamina II is under a tonic inhibition involving adenosine receptors (Tian et al., 2010). Under CFA-induced PI, adenosine potentiates the glycinergic synaptic transmission with lamina II neurons by a postsynaptic mechanism (Bai et al., 2017). As for inhibitory controls involving GABA<sub>B</sub> receptors, these data suggest that tonic modulation involving adenosine receptors can be synapse specific.

## Conclusion

Under conditions of PI, GABAergic connections with LII neurons and their plasticities are shifted towards increased frequency response. In connections with putative inhibitory neurons, this shift is only engaged at frequencies corresponding to the activity at high intensity of sensory stimulation whereas it occurred for both low and high frequencies for connections with putative excitatory neurons. Such difference in frequency response of both connections might amplify the transmission of nociceptive information during stimulations at high intensity with respect to stimulations at low intensities.

Nevertheless, the time-dependent summation of GABAergic synaptic currents is increased owing to their prolonged duration under conditions of PI, and this increase was larger in connections with putative excitatory neurons whereas it reaches a plateau in connections with putative inhibitory neurons. Slowing down of GABAergic synaptic current deactivation in lamina II has been shown to have an overall antinociceptive effect (Poisbeau et al., 2005; Schlichter et al., 2006). This difference in time-dependent summation might therefore partly counterbalance the frequency response amplification taking place under conditions of PI.

## Acknowledgements

We thank Catherine Moreau and Chantal Fitterer for excellent technical assistance. This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, and the French National Research agency (ANR) contract ANR-17-EURE-0022. LC was supported by EURIDOL Graduate School of Pain, Neuropole Strasbourg, and Société Française d'Etude et de Traitement de la Douleur (SFETD).

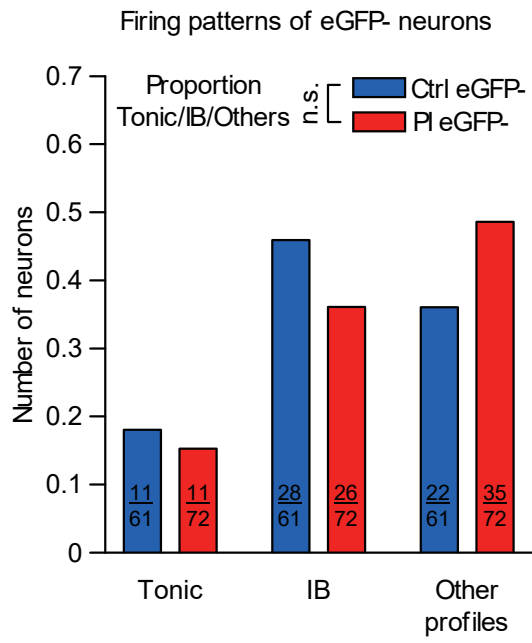
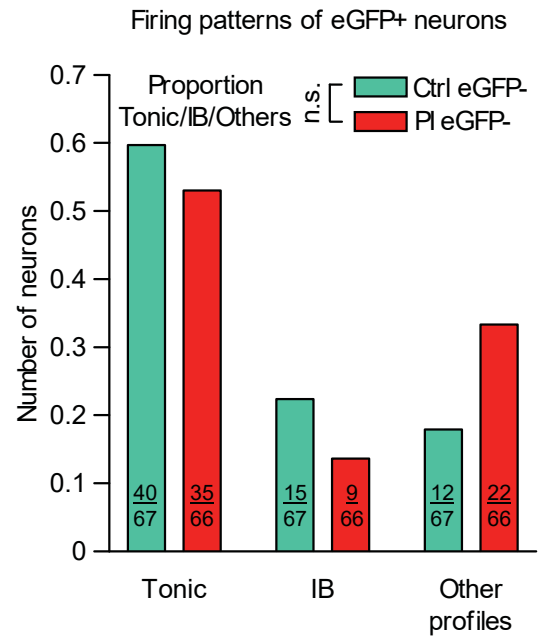
## References

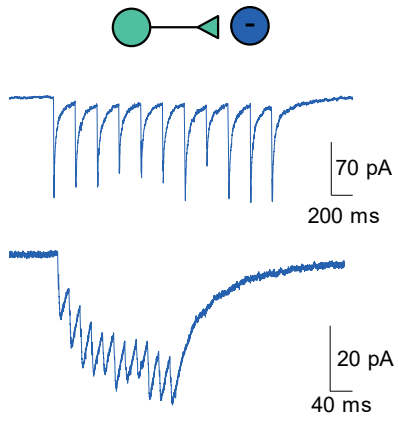
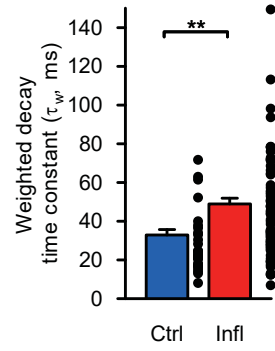
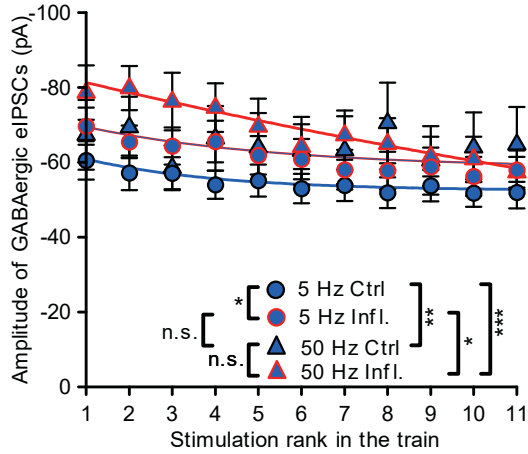
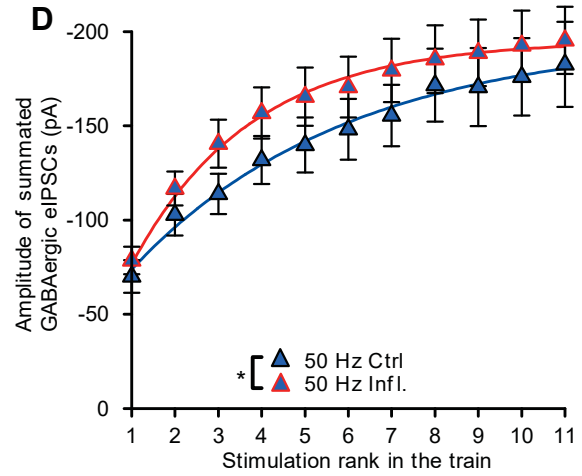
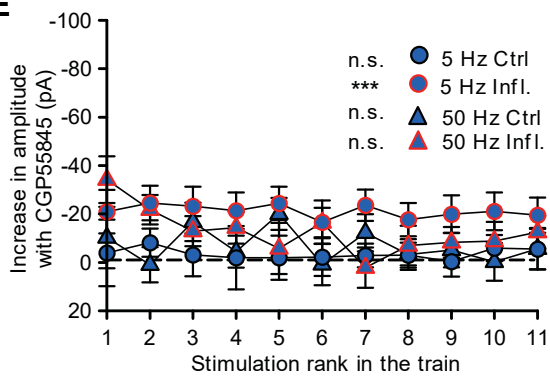
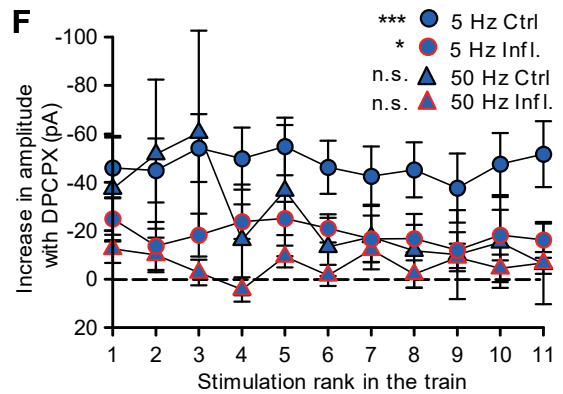
- Aby F, Whitestone S, Landry M, Ulmann L, Fossat P (2018) Inflammatory-induced spinal dorsal horn neurons hyperexcitability is mediated by P2X4 receptors. *Pain Rep* 3:e660.
- Adrian ED (1920) The recovery process of excitable tissues: Part I. *J Physiol* 54:1-31.
- Adrian ED, Zotterman Y (1926) The impulses produced by sensory nerve endings: Part 3. Impulses set up by Touch and Pressure. *J Physiol* 61:465-483.
- Bai HH, Liu JP, Yang L, Zhao JY, Suo ZW, Yang X, Hu XD (2017) Adenosine A1 receptor potentiated glycinergic transmission in spinal cord dorsal horn of rats after peripheral inflammation. *Neuropharmacology* 126:158-167.
- Bird GC, Han JS, Fu Y, Adwanikar H, Willis WD, Neugebauer V (2006) Pain-related synaptic plasticity in spinal dorsal horn neurons: role of CGRP. *Mol Pain* 2:31.
- Buonomano DV (2007) The biology of time across different scales. *Nat Chem Biol* 3:594-597.
- Campero M, Serra J, Ochoa JL (1996) C-polymodal nociceptors activated by noxious low temperature in human skin. *J Physiol* 497 ( Pt 2):565-572.
- Castro-Lopes JM, Tavares I, Tolle TR, Coito A, Coimbra A (1992) Increase in GABAergic Cells and GABA Levels in the Spinal Cord in Unilateral Inflammation of the Hindlimb in the Rat. *Eur J Neurosci* 4:296-301.
- Cathenaut L, Leonardon B, Kuster R, Inquimbert P, Schlichter R, Hugel S (2021) Inhibitory interneurons with differential plasticities at their connections tune excitatory/inhibitory balance in the spinal nociceptive system. *Pain*.
- Chery N, De Koninck Y (2000) GABA(B) receptors are the first target of released GABA at lamina I inhibitory synapses in the adult rat spinal cord. *J Neurophysiol* 84:1006-1011.

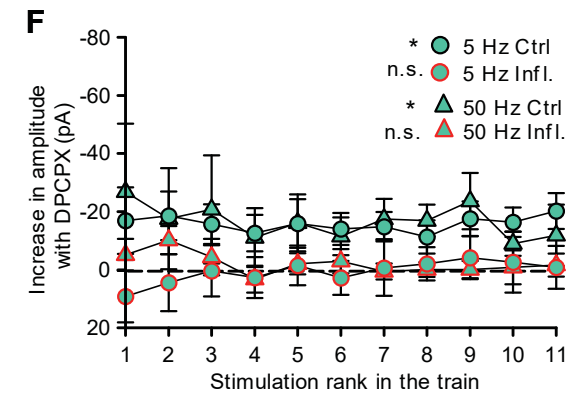
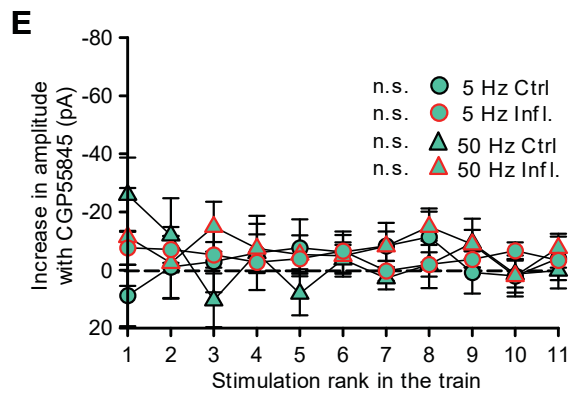
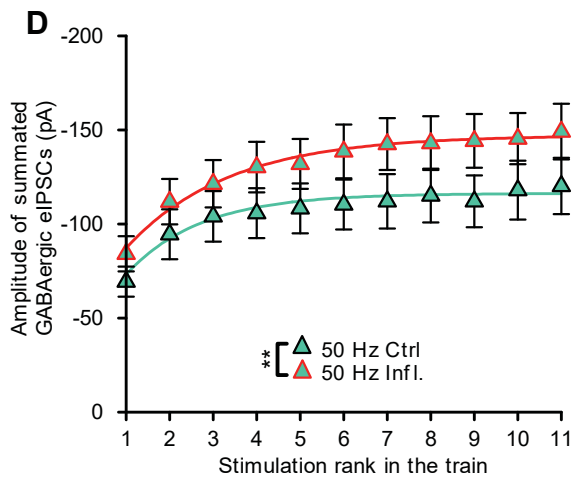
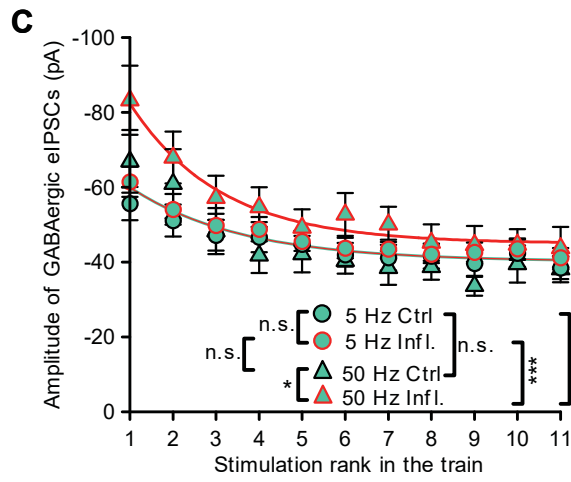
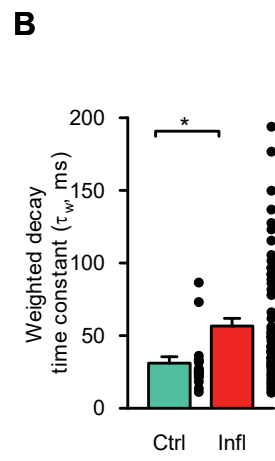
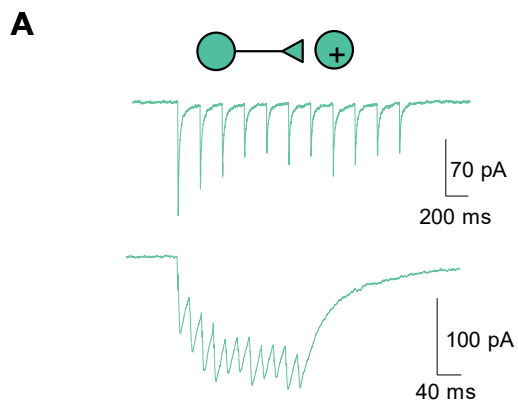
- Chirila AM, Brown TE, Bishop RA, Bellono NW, Pucci FG, Kauer JA (2014) Long-term potentiation of glycinergic synapses triggered by interleukin 1beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:8263-8268.
- Cordero-Erausquin M, Coull JA, Boudreau D, Rolland M, De Koninck Y (2005) Differential maturation of GABA action and anion reversal potential in spinal lamina I neurons: impact of chloride extrusion capacity. *J Neurosci* 25:9613-9623.
- Cui L, Kim YR, Kim HY, Lee SC, Shin HS, Szabo G, Erdelyi F, Kim J, Kim SJ (2011) Modulation of synaptic transmission from primary afferents to spinal substantia gelatinosa neurons by group III mGluRs in GAD65-EGFP transgenic mice. *J Neurophysiol* 105:1102-1111.
- 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.
- Ferrini F, Perez-Sanchez J, Ferland S, Lorenzo LE, Godin AG, Plasencia-Fernandez I, Cottet M, Castonguay A, Wang F, Salio C, Doyon N, Merighi A, De Koninck Y (2020) Differential chloride homeostasis in the spinal dorsal horn locally shapes synaptic metaplasticity and modality-specific sensitization. *Nat Commun* 11:3935.
- Fukuhara K, Katafuchi T, Yoshimura M (2013) Effects of baclofen on mechanical noxious and innocuous transmission in the spinal dorsal horn of the adult rat: in vivo patch-clamp analysis. *Eur J Neurosci* 38:3398-3407.
- 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.
- Hugel S, Schlichter R (2003) Convergent control of synaptic GABA release from rat dorsal horn neurones by adenosine and GABA autoreceptors. *The Journal of physiology* 551:479-489.
- Kloc ML, Pradier B, Chirila AM, Kauer JA (2019) NMDA receptor activation induces long-term potentiation of glycine synapses. *PLoS One* 14:e0222066.
- Labrakakis C, Rudolph U, De Koninck Y (2014) The heterogeneity in GABAA receptor-mediated IPSC kinetics reflects heterogeneity of subunit composition among inhibitory and excitatory interneurons in spinal lamina II. *Front Cell Neurosci* 8:424.
- Labrakakis C, Lorenzo LE, Bories C, Ribeiro-da-Silva A, De Koninck Y (2009) Inhibitory coupling between inhibitory interneurons in the spinal cord dorsal horn. *Mol Pain* 5:24.
- Mayhew JA, Callister RJ, Walker FR, Smith DW, Graham BA (2019) Aging alters signaling properties in the mouse spinal dorsal horn. *Mol Pain* 15:1744806919839860.
- Motulsky HJ, Christopoulos A (2003) *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression*. San Diego: GraphPad Software Inc.
- Muller F, Heinke B, Sandkuhler J (2003) Reduction of glycine receptor-mediated miniature inhibitory postsynaptic currents in rat spinal lamina I neurons after peripheral inflammation. *Neuroscience* 122:799-805.
- Neumann S, Doubell TP, Leslie T, Woolf CJ (1996) Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurons. *Nature* 384:360-364.
- 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.
- Reinold H, Ahmadi S, Depner UB, Layh B, Heindl C, Hamza M, Pahl A, Brune K, Narumiya S, Muller U, Zeilhofer HU (2005) Spinal inflammatory hyperalgesia is mediated by prostaglandin E receptors of the EP2 subtype. *J Clin Invest* 115:673-679.
- Salio C, Merighi A, Bardoni R (2017) GABAB receptors-mediated tonic inhibition of glutamate release from Abeta fibers in rat laminae III/IV of the spinal cord dorsal horn. *Mol Pain* 13:1744806917710041.
- Sawynok J (2016) Adenosine receptor targets for pain. *Neuroscience* 338:1-18.

- Schlichter R, Keller AF, De Roo M, Breton JD, Inquimbert P, Poisbeau P (2006) Fast nongenomic effects of steroids on synaptic transmission and role of endogenous neurosteroids in spinal pain pathways. *J Mol Neurosci* 28:33-51.
- Schoffnegger D, Heinke B, Sommer C, Sandkuhler J (2006) Physiological properties of spinal lamina II GABAergic neurons in mice following peripheral nerve injury. *The Journal of physiology* 577:869-878.
- Spiess AN, Neumeyer N (2010) An evaluation of R2 as an inadequate measure for nonlinear models in pharmacological and biochemical research: a Monte Carlo approach. *BMC Pharmacol* 10:6.
- Stanfa LC, Sullivan AF, Dickenson AH (1992) Alterations in neuronal excitability and the potency of spinal mu, delta and kappa opioids after carrageenan-induced inflammation. *Pain* 50:345-354.
- Takazawa T, Choudhury P, Tong CK, Conway CM, Scherrer G, Flood PD, Mukai J, MacDermott AB (2017) Inhibition Mediated by Glycinergic and GABAergic Receptors on Excitatory Neurons in Mouse Superficial Dorsal Horn Is Location-Specific but Modified by Inflammation. *J Neurosci* 37:2336-2348.
- Tian L, Ji G, Wang C, Bai X, Lu Y, Xiong L (2010) Excitatory synaptic transmission in the spinal substantia gelatinosa is under an inhibitory tone of endogenous adenosine. *Neurosci Lett* 477:28-32.
- Torebjork HE, Hallin RG (1974) Responses in human A and C fibres to repeated electrical intradermal stimulation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 37:653-664.
- Woolf CJ (1983) Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature* 306:686-688.
- Woolf CJ, Costigan M (1999) Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7723-7730.
- Xu-Friedman MA, Regehr WG (2004) Structural contributions to short-term synaptic plasticity. *Physiol Rev* 84:69-85.
- Zhang H, Nei H, Dougherty PM (2010) A p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism of disinhibition in spinal synaptic transmission induced by tumor necrosis factor-alpha. *J Neurosci* 30:12844-12855.
- Zhang H, Li Y, Yang Q, Liu XG, Dougherty PM (2018) Morphological and Physiological Plasticity of Spinal Lamina II GABA Neurons Is Induced by Sciatic Nerve Chronic Constriction Injury in Mice. *Front Cell Neurosci* 12:143.
- Zhang W, Schneider SP (2011) Short-term modulation at synapses between neurons in laminae II-V of the rodent spinal dorsal horn. *J Neurophysiol* 105:2920-2930.
- Zhang W, Liu LY, Xu TL (2008) Reduced potassium-chloride co-transporter expression in spinal cord dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity in rats. *Neuroscience* 152:502-510.
- Zylka MJ (2011) Pain-relieving prospects for adenosine receptors and ectonucleotidases. *Trends Mol Med* 17:188-196.



**A****B**

**A****B****C****D****E****F**



**Figure 1. Action-potential firing patterns in eGFP- and eGFP+ neurons.**

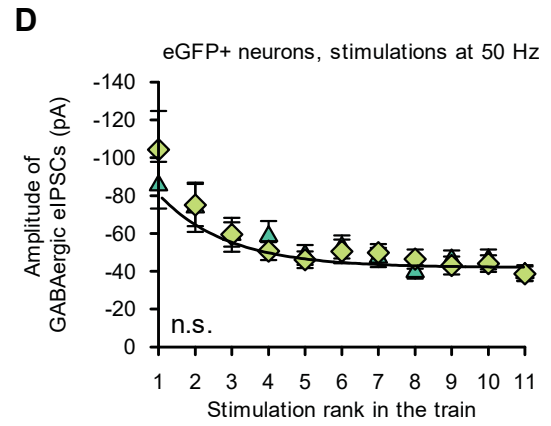
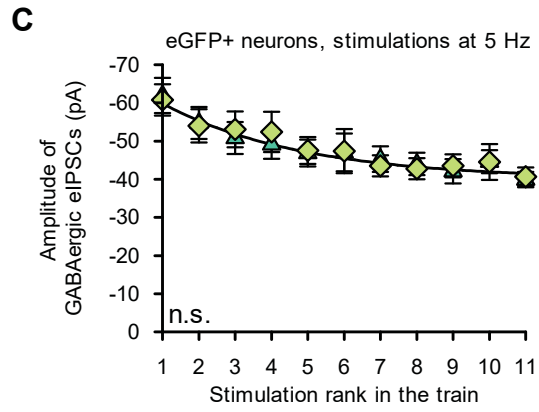
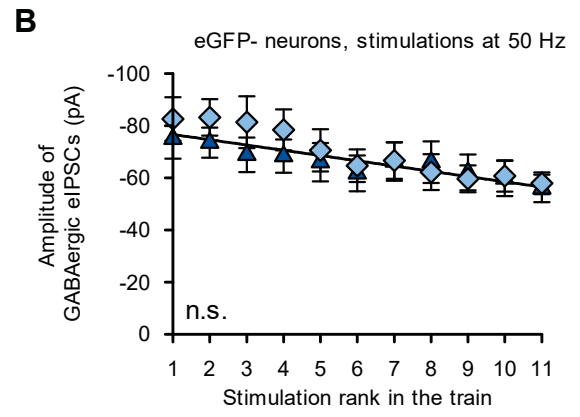
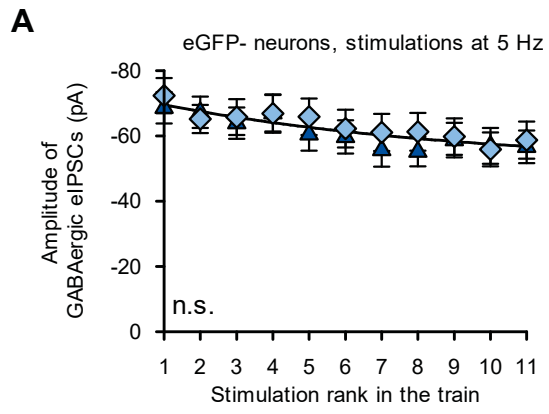
**A.** Firing of eGFP- neurons in basal physiological conditions (Ctrl) and under conditions of peripheral inflammation (PI). A majority of eGFP- neurons were of initial bursting type (IB) and the proportions of Tonic/IB/Other profiles were similar in both conditions (Fisher's exact test,  $P = 0.34$ ). **B.** Firing of eGFP+ neurons in basal physiological conditions (Ctrl) and under conditions of peripheral inflammation (PI). A majority of eGFP+ neurons were of the Tonic type (Tonic) and the proportions of Tonic/IB/Other profiles were similar in both conditions (Fisher's exact test,  $P = 0.09$ ). Proportions of firing patterns were significantly different in eGFP- and eGFP+ neurons for both conditions of PI (Fisher's exact test,  $P = 5.67 \cdot 10^{-6}$ ) and basal physiological conditions (see Cathenaut et al. 2021).

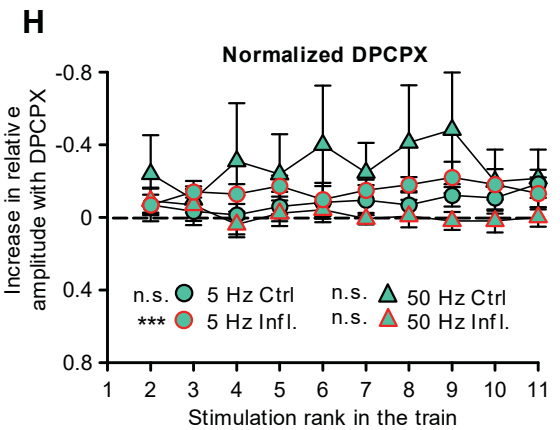
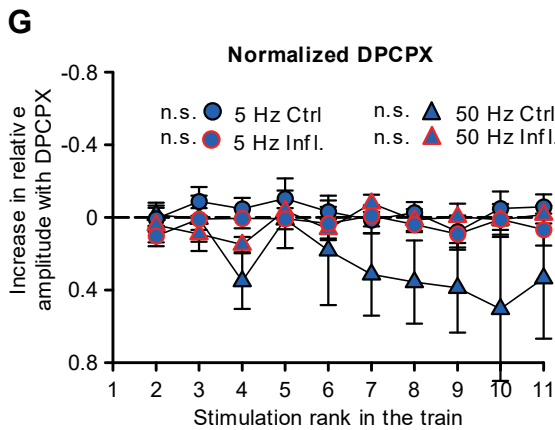
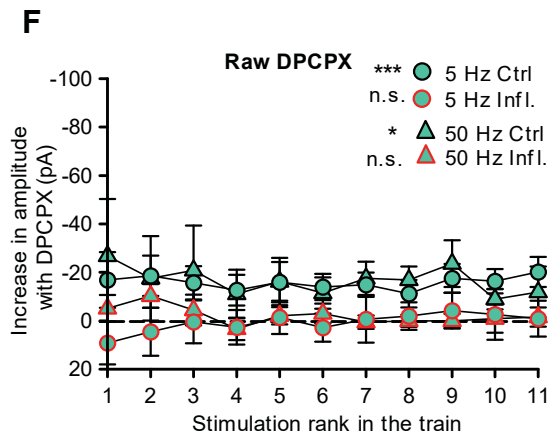
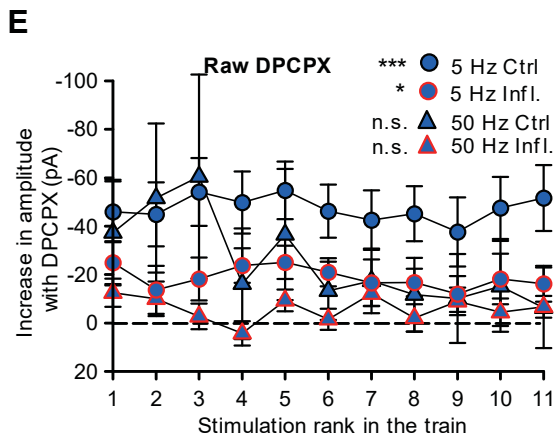
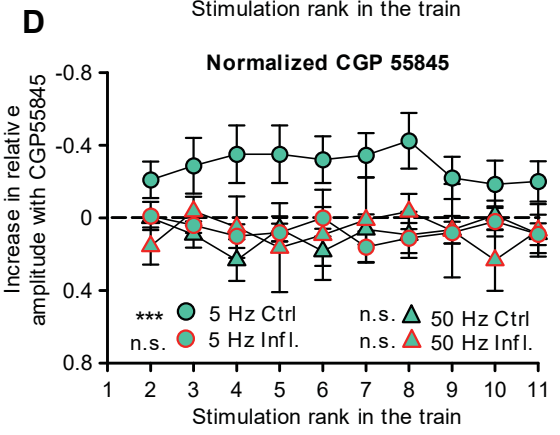
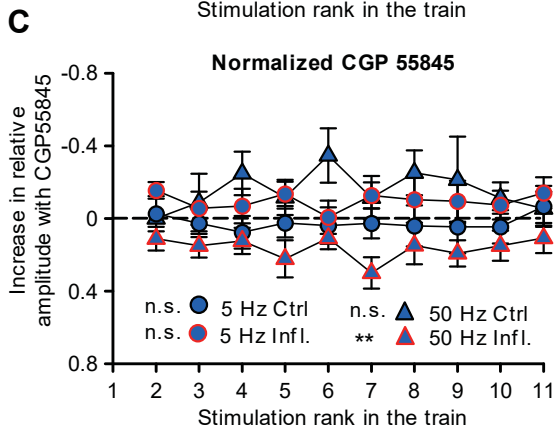
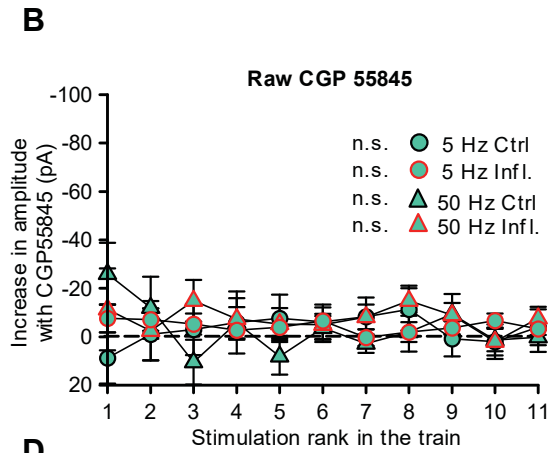
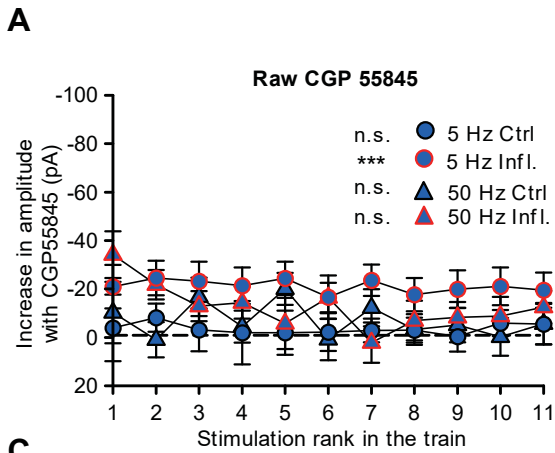
**Figure 2. Short-term plasticity of GABAergic connections onto eGFP- neurons.**

**A.** Representative average current trace recorded in an eGFP- neuron during a train at 5 Hz (top) and a train at 50 Hz (bottom). **B.** The weighted decay time-constant of GABAergic eIPSCs is significantly larger under conditions of PI with respect to basal physiological conditions (unpaired Student's *t*-test,  $t = -3.255$ ,  $df = 95$ ,  $P = 1.57 \cdot 10^{-3}$ ,  $n_{ctrl} = 29$ ,  $n_{PI} = 68$ ). **C.** Amplitudes of GABAergic eIPSCs recorded in eGFP- neurons during trains of 11 stimulations at 5 Hz or 50 Hz under basal physiological conditions or under conditions of PI. **D.** Same data as in C for stimulations at 50 Hz, but with eIPSCs measured from the basal current level before the first eIPSC (summated eIPSCs amplitudes). **E. F.** Increase in eIPSCs amplitudes induced by 10  $\mu$ M CGP55845, a GABA<sub>B</sub> receptor antagonist (**E**), or induced by 10  $\mu$ M DPCPX an antagonist of A1 receptors (**F**) during trains at 5 Hz and 50 Hz under basal physiological conditions (Ctrl) and under conditions of peripheral inflammation (PI). For each neuron, trains of 11 stimulations were repeated 10 times in control condition and 10 times during bath application of CGP55845 or DPCPX. The values given are the increase in amplitude in presence of the antagonist. Results of non-linear regressions used to compare conditions are given as  $P \geq 0.5$ : n.s.,  $0.05 < P \leq 0.01$ : \*,  $0.01 < P \leq 0.001$ : \*\*,  $P < 0.001$ : \*\*\*. Details of regressions and the corresponding analysis are given in Supplementary Tables.

**Figure 3. Short-term plasticity of GABAergic connections onto eGFP+ neurons.**

**A.** Representative average current trace recorded in an eGFP+ neuron during a train at 5 Hz (top) and a train at 50 Hz (bottom). **B.** The weighted decay time-constant of GABAergic eIPSCs is significantly larger under conditions of PI with respect to basal physiological conditions (unpaired Student's *t*-test,  $t = -2.504$ ,  $df = 78$ ,  $P = 1.44 \cdot 10^{-2}$ ,  $n_{ctrl} = 18$ ,  $n_{PI} = 62$ ). **C.** Amplitudes of GABAergic eIPSCs recorded in eGFP+ neurons during trains of 11 stimulations at 5 Hz or 50 Hz under basal physiological conditions or under conditions of PI. **D.** Same data as in C for stimulations at 50 Hz, but with eIPSCs measured from the basal current level before the first eIPSC (summated eIPSCs amplitudes). **E. F.** Increase in eIPSCs amplitudes induced by 10  $\mu$ M CGP55845, a GABA<sub>B</sub> receptor antagonist (**E**), or induced by 10  $\mu$ M DPCPX an antagonist of A1 receptors (**F**) during trains at 5 Hz and 50 Hz under basal physiological conditions (Ctrl) and under conditions of peripheral inflammation (PI). For each neuron, trains of 11 stimulations were repeated 10 times in control condition and 10 times during bath application of CGP55845 or DPCPX. The values given are the increase in amplitude in presence of the antagonist. Results of non-linear regressions used to compare conditions are given as  $P \geq 0.5$ : n.s.,  $0.05 < P \leq 0.01$ : \*,  $0.01 < P \leq 0.001$ : \*\*,  $P < 0.001$ : \*\*\*. Details of regressions and the corresponding analysis are given in Supplementary Tables.





### Supplementary figure S1.

#### Comparison of trains 1 to 5 and 6 to 10 under conditions of PI.

Changes in eIPSCs amplitudes during the trains remained similar in the first five and the last five trains of stimulation at both 5 Hz (A, C) and 50 Hz (B, D) recorded in both eGFP- (A, B) and eGFP+ (C, D) neurons. Results of non-linear regressions used to compare conditions are given as  $P > 0.5$ : n.s.;  $n_{5\text{Hz}} = 74$  eGFP- and 64 eGFP+ neurons, and  $n_{50\text{Hz}} = 30$  eGFP- and 26 eGFP+ neurons. Details of regressions and the corresponding analysis are given in Supplementary Table 1.

### Supplementary figure S2.

#### Effects of antagonists of GABA<sub>B</sub> and A1 receptors on raw and normalized amplitudes of eIPSCs under basal physiological conditions and under conditions of PI.

Increase in eIPSCs amplitudes induced by 10  $\mu\text{M}$  CGP55845, a GABA<sub>B</sub> receptor antagonist (A-D), or induced by 10  $\mu\text{M}$  DPCPX an antagonist of A1 receptors (E-H) during trains at 5 Hz and 50 Hz under basal physiological conditions (Ctrl) and under conditions of peripheral inflammation (PI). For each neuron, trains of 11 stimulations were repeated 10 times in control condition and 10 times during bath application of CGP55845 or DPCPX. The values given are the corresponding difference in amplitude. These were either calculated on raw eIPSCs amplitudes (in pA) or on relative eIPSCs amplitudes (amplitudes normalized after eIPSCs of rank 1). A, C, E, G: connections onto eGFP- neurons. B, D, F, H: connections onto eGFP+ neurons. Details of regressions and the corresponding analysis are given in Supplementary Table 11 for eGFP- neurons and Supplementary Table 12 for eGFP+ neurons. Results of non-linear regressions used to compare conditions are given as  $P \geq 0.5$ : n.s.,  $0.05 < P \leq 0.01$ : \*,  $0.01 < P \leq 0.001$ : \*\*,  $P < 0.001$ : \*\*\*.

### Supplementary tables 1-12.

#### Data analysis, model comparison and statistics.

The tables correspond to the different figures illustrating the comparisons. The column **Figure** indicates the panel of the figure illustrating the conditions compared. In these figures, the averaged eIPSCs amplitudes in the two conditions are illustrated, but statistical analysis were performed using averaged eIPSCs amplitudes of each neurons. These values were calculated by averaging eIPSCs amplitudes of the same rank obtained from reiterations of the protocols. The reiterations used for the average are indicated in the column **Protocol repetition** (usually iterations 1-10). For protocols using trains of stimulations, the **frequency** of stimulations is given (5 Hz or 50 Hz). The **Type of data** column indicates whether data were averaged raw eIPSCs amplitudes (Raw, in pA) or averaged normalized amplitudes (Norm, dimensionless value). The **eGFP condition** column indicates whether the data compared were from eGFP- (-) or eGFP+ (+) neurons or both (+ and -). The **Drug condition** column indicates whether the data compared were recorded without (**Control**) or with CGP55845 or DPCPX, or both. The **Model** column indicates the two models compared. **N neurons** corresponds to the number of neurons (eGFP- (-) or eGFP+ (+)). **N obs** corresponds to the number of observations. Since experiments corresponded to trains of stimulations with multiple measures per neuron, the number of observations per neuron and per condition was of 11 for raw data and 10 for normalized data. **k** corresponds to the number of parameters in the model. A1, A2 and A3 are the parameters calculated by non-linear regression (two values of A1, A2 and A3 are given when a sum of two regressions are used; in a few analysis, less parameters were used). **SS** is

the residual sum of squares calculated with the model. **df** is the degree of freedom of the model. **AIC** is Akaike information criterion; **AICc** is the AIC corrected for small samples; **BIC** is the bayesian information criterion. **F** is the value of the F-distribution of the comparison between the two models. **p** is the corresponding p-value. **dAIC** or **dAICc** is the decrease in AIC or AICc provided by the model indicated in that line with respect to the model in the line above. When the value Nobs/k > 40, dAIC was used, otherwise the small sample size requested to use dAICc rather than dAIC. A positive value indicate that the model correspond to the most parsimonious explanation with respect to the model in the line above.



*italic*: already published in Cathenaut et al. 2021  
regular: this study

Supplementary table 1. Comparison of trains 1-5 and 6-10. Figure S1.

Stimulation protocol										Model parameters determined by non linear curve fitting										Model comparison stats					
Figure	Frequency	Control or Inflammatory	Protocol	Type of data	eGFP condition	Drug condition	Model	N neuro ns	N (mice)	obs	k	A1 eGFP	A2 eGFP	A3 eGFP	A1 eGFP+	A2 eGFP+	A3 eGFP+	SS	df	AIC	AICc	BIC	F	p	dAIC
S1	5 Hz	PI	1-5 6-10	Raw	+	Control	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	64(34)	1384	3	3	-60.48	19.95	3.87	-60.02	20.71	4.71	1309418.10	1381	13427.32	13427.32	13440.22	0.070	9.76E-01	-5.8
S1	5 Hz	PI	1-5 6-10	Raw	-	Control	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	74(33)	1626	3	6	-69.50	18.71	8.63	-69.40	39.05	26.83	3321688.18	1623	17015.93	17023.96	17037.51	0.361	7.81E-01	-4.9
S1	50 Hz	PI	1-5 6-10	Raw	+	Control	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	26(20)	570	3	3	-81.41	38.97	1.88	-87.19	43.99	1.59	464861.71	567	5446.79	5454.86	5464.17	0.714	5.44E-01	-3.8
S1	50 Hz	PI	1-5 6-10	Raw	-	Control	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	30(21)	636	3	6	-77.47	6659.23	3296.88	-75.73	90.31	28.05	844913.90	633	6386.87	6394.93	6404.69	1.468	2.22E-01	-1.6

Supplementary table 2. Short-term plasticity during trains in eGFP- neurons. Figure 2C.

Stimulation protocol										Model parameters determined by non linear curve fitting										Model comparison stats				
Figure	Frequency	Control or Inflammatory	Protocol	Type of data	eGFP condition	Drug condition	Model	N neuro ns	N obs	k	A1 eGFP	A2 eGFP	A3 eGFP	A1 eGFP+	A2 eGFP+	A3 eGFP+	SS	df	AIC	AICc	BIC	F	p	dAIC
2C	5 Hz	PI	1-10	Raw	-	Control	Linear fit slope=0 Exponential (Equation2)	74(33)	814	1	3	-61.51	15.31	6.03	-69.18	3.195	1581082.90	813	8477.36	8481.38	8486.77	3.195	4.15E-02	2.4
2C	50 Hz	PI	1-10	Raw	-	Control	Linear fit slope=0 Exponential (Equation2)	30(21)	330	1	3	-68.65	77.60	29.07	-60.52	7.023	408455.51	329	3290.44	3294.48	3298.04	7.023	1.03E-03	9.9

Supplementary table 3. Plasticity during trains in eGFP+ neurons. Figure 3C.

Stimulation protocol										Model parameters determined by non linear curve fitting										Model comparison stats				
Figure	Frequency	Control or Inflammatory	Protocol	Type of data	eGFP condition	Drug condition	Model	N neuro ns	N obs	k	A1 eGFP	A2 eGFP	A3 eGFP	A1 eGFP+	A2 eGFP+	A3 eGFP+	SS	df	AIC	AICc	BIC	F	p	dAIC
3C	5 Hz	PI	1-10	Raw	+	Control	Linear fit slope=0 Exponential (Equation2)	64(34)	704	1	3	-46.96	19.39	2.45	-61.15	21.086	424279.79	703	6508.43	6512.45	6517.54	21.086	1.28E-09	37.1
3C	50 Hz	PI	1-10	Raw	+	Control	Linear fit slope=0 Exponential (Equation2)	26(20)	286	1	3	-53.95	37.58	2.10	-82.56	21.391	230043.83	285	2785.23	2789.27	2792.54	21.391	2.33E-09	36.3

Supplementary table 4. Comparison control vs. inflammatory conditions.

Stimulation protocol											Model parameters determined by non linear curve fitting											Model comparison stats			
Figure	Frequency	Control or Inflammatory	Protocol	Type of data	Drug condition	Model	N neuro ns	N obs	k	A1 eGFP-	A2 eGFP-	A3 eGFP-	A1 eGFP+	A2 eGFP+	A3 eGFP+	SS	df	AIC	AICc	BIC	F	p	dAIC		
2C	5 Hz	Ctrl vs PI	1-10	Raw	-	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	54ctrl 1408	1408	3	-65.34	12.00	4.84	-69.18	15.31	6.03	2156427.16	1405	14330.06	14338.08	14351.06	3.796	<b>1.00E-02</b>	5.4		
							74(33)PI 1408	6	-60.20	8.32	3.12					2139052.90	1402	14324.67	14338.75	14361.42					
3C	5 Hz	Ctrl vs PI	1-10	Raw	+	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	49ctrl 1243	1243	3	-58.65	17.99	2.76	-81.15	19.39	2.45	759574.25	1240	11509.61	11517.64	11530.11	1.151	3.28E-01	-2.5		
							64(34)PI 1243	6	-55.42	16.42	3.38					757460.73	1237	11512.15	11526.24	11548.03					
2C	50 Hz	Ctrl vs PI	1-10	Raw	-	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	27ctrl 638	638	3	-74.04	20.35	10.16	-80.52	77.60	29.07	1083428.38	635	6563.56	6571.63	6581.40	1.837	1.39E-01	-0.5		
							30(21)PI 638	6	-68.03	3.88	1.01					1074062.87	632	6564.03	6578.20	6595.23					
3C	50 Hz	Ctrl vs PI	1-10	Raw	+	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	19ctrl 495	495	3	-76.60	35.16	2.13	-82.56	37.58	2.10	367599.82	492	4684.79	4692.88	4701.61	5.152	<b>1.63E-03</b>	9.4		
							26(20)PI 495	6	-68.49	31.86	2.18					356337.83	489	4675.39	4689.62	4704.82					
2C	5 Hz	Ctrl vs PI	1-10	Norm	-	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	54ctrl 1230	1230	3	1.08	-0.18	6.10	0.97	-0.23	7.18	181.14	1227	1142.51	1150.54	1162.97	72.406	<b>4.14E-43</b>	194.9		
							74(33)PI 1230	6	1.24	-0.12	4.42					153.84	1224	947.57	961.66	983.37					
3C	5 Hz	Ctrl vs PI	1-10	Norm	+	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	49ctrl 1130	1130	3	0.97	-0.19	3.61	0.89	-0.18	3.47	92.79	1127	390.18	398.22	410.30	34.393	<b>2.87E-21</b>	93.2		
							64(34)PI 1130	6	1.06	-0.20	3.92					84.99	1124	296.94	311.04	332.15					
2C	50 Hz	Ctrl vs PI	1-10	Norm	-	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	27ctrl 580	580	3	1.28	-0.13	2.17	1.08	-0.34	5.86	444.65	577	1489.84	1507.91	1517.29	20.999	<b>6.40E-13</b>	54.4		
							30(21)PI 580	6	1.44	0.12	23.59					400.67	574	1445.44	1459.63	1475.98					
3C	50 Hz	Ctrl vs PI	1-10	Norm	+	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	19ctrl 450	450	3	1.04	-0.31	0.97	0.94	-0.20	0.00	124.68	447	707.48	715.57	723.92	0.926	4.28E-01	-3.2		
							26(20)PI 450	6	1.19	-0.46	0.98					123.91	444	710.67	724.93	739.44					

Supplementary table 5. Comparison of plasticities at 5 Hz vs. 50 Hz.

Stimulation protocol											Model parameters determined by non linear curve fitting											Model comparison stats			
Figure	Frequency	Control or Inflammatory	Protocol	Type of data	Drug condition	Model	N neuro ns	N obs	k	A1 eGFP-	A2 eGFP-	A3 eGFP-	A1 eGFP+	A2 eGFP+	A3 eGFP+	SS	df	AIC	AICc	BIC	F	p	dAIC		
2C	5 vs 50	Ctrl	1-10	Raw	-	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	5Hz:54 902	902	3	-62.96	6.49	2.12	-68.03	3.88	1.01	1274212.39	899	9110.17	9118.22	9129.39	5.114	<b>1.64E-03</b>	9.3		
							50Hz:27 902	6	-60.20	8.32	3.12					1252759.86	896	9100.86	9114.98	9134.49					
3C	5 vs 50	Ctrl	1-10	Raw	+	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	5Hz:49 748	748	3	-59.10	20.47	2.71	-88.49	31.86	2.18	473966.73	745	6956.45	6964.50	6974.92	1.915	1.26E-01	-0.2		
							50Hz:19 748	6	-55.42	16.42	3.38					470326.06	742	6956.68	6970.83	6989.00					
2C	5 vs 50	PI	1-10	Raw	-	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	3Hz:74(33) 1144	1144	3	-72.42	22.94	9.14	-80.52	77.60	29.07	1975003.08	1141	11781.67	11789.71	11801.84	2.834	<b>3.72E-02</b>	2.5		
							0Hz:30(2) 1144	6	-69.18	15.31	6.03					1960355.90	1138	11779.16	11793.25	11814.45					
3C	5 vs 50	PI	1-10	Raw	+	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	3Hz:84(34) 990	990	3	-67.30	24.62	2.30	-82.56	37.58	2.10	659586.85	987	9254.15	9262.19	9273.74	8.214	<b>2.11E-05</b>	18.5		
							0Hz:26(2) 990	6	-61.15	19.39	2.45					643472.50	984	9235.66	9249.77	9269.94					
2C	5 vs 50	Ctrl	1-10	Norm	-	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	5Hz:54 770	770	3	1.33	-0.06	1.65	1.44	0.12	23.59	494.10	767	1851.55	1859.60	1870.14	7.769	<b>4.09E-05</b>	17.1		
							50Hz:27 770	6	1.24	-0.12	4.42					479.47	764	1834.41	1848.56	1866.94					
3C	5 vs 50	Ctrl	1-10	Norm	+	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	5Hz:49 680	680	3	1.10	-0.26	1.79	1.19	-0.46	0.98	97.08	677	614.06	622.12	632.15	8.889	<b>8.78E-06</b>	20.4		
							50Hz:19 680	6	1.06	-0.20	3.92					93.38	674	593.68	607.84	625.33					
2C	5 vs 50	PI	1-10	Norm	-	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	3Hz:74(33) 1040	1040	3	1.01	-0.27	6.88	1.08	-0.34	5.86	75.69	1037	234.31	242.35	254.10	3.013	<b>2.92E-02</b>	3.1		
							0Hz:30(2) 1040	6	0.97	-0.23	7.18					75.04	1034	231.26	245.37	265.89					
3C	5 vs 50	PI	1-10	Norm	+	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	3Hz:84(34) 900	900	3	0.89	-0.19	3.16	0.94	-0.20	0.00	115.53	897	714.49	722.53	733.70	0.037	9.91E-01	-5.9		
							0Hz:26(2) 900	6	0.89	-0.18	3.47					115.51	894	720.38	734.50	753.99					

Supplementary table 6. Comparison of plasticities at 5 Hz under conditions of PI vs. 50 Hz under control conditions.

Stimulation protocol										Model parameters determined by non linear curve fitting										Model comparison stats					
Figure	Frequency	Control or Inflammatory	Protocol	Type of data	eGFP condition	Drug Condition	Model	N neuro ns	N obs	k	A1 eGFP	A2 eGFP	A3 eGFP	A1 eGFP+	A2 eGFP+	A3 eGFP+	SS	df	AIC	AICc	BIC	F	p	dAIC	
2C	5 Hz PI 50 Hz Ctrl	-	1-10	Raw	-	Control	"Equation2" pooled data	5Hz:74(33)	1122	3	-68.74	10.96	4.57				2255779.88	1119	11726.19	11734.22	11746.28				
							sum of two "Equation2"	0Hz:30(2)	1122	6	-69.18	15.31	6.03	-68.03	3.88	1.01	2251154.52	1116	11729.88	11743.98	11765.04	0.764	5.14E-01	-3.7	
3C	5 Hz PI 50 Hz Ctrl	+	1-10	Raw	+	Control	"Equation2" pooled data	5Hz:64(34)	913	3	-62.84	22.23	2.34				516601.00	910	8385.84	8393.88	8405.11				
							sum of two "Equation2"	50Hz:19	913	6	-61.15	19.39	2.45	-68.49	31.86	2.18	513272.69	907	8385.94	8400.06	8419.66	1.960	1.18E-01	-0.1	
2C	5 Hz PI 50 Hz Ctrl	-	1-10	Norm	-	Control	"Equation2" pooled data	5Hz:74(33)	1020	3	1.11	-0.13	5.02				468.32	1017	2108.67	2116.71	2128.38				
							sum of two "Equation2"	0Hz:30(2)	1020	6	0.97	-0.23	7.18	1.44	0.12	23.59	397.47	1014	1947.35	1961.46	1981.85	60.250	7.58E-36	161.3	
3C	5 Hz PI 50 Hz Ctrl	+	1-10	Norm	+	Control	"Equation2" pooled data	5Hz:64(34)	830	3	0.95	-0.23	2.19				56.60	827	134.48	142.53	153.37				
							sum of two "Equation2"	50Hz:19	830	6	0.89	-0.18	3.47	1.19	-0.46	0.98	55.22	824	120.10	134.24	153.15	6.828	1.51E-04	14.4	

Supplementary table 7. Comparison of plasticities at 5 Hz under control conditions vs. 50 Hz under conditions of PI

Stimulation protocol										Model parameters determined by non linear curve fitting										Model comparison stats					
Figure	Frequency	Control or Inflammatory	Protocol	Type of data	eGFP condition	Drug Condition	Model	N neuro ns	N obs	k	A1 eGFP	A2 eGFP	A3 eGFP	A1 eGFP+	A2 eGFP+	A3 eGFP+	SS	df	AIC	AICc	BIC	F	p	dAIC	
2C	5 Hz Ctrl 50 Hz PI	-	1-10	Raw	-	Control	"Equation2" pooled data	5Hz:54	924	3	-67.25	18.14	8.00				1009117.98	921	9084.39	9102.43	9113.70				
							sum of two "Equation2"	0Hz:30(2)	924	6	-60.20	8.32	3.12	-80.52	77.60	29.07	961961.24	918	9056.17	9070.29	9089.97	15.001	1.54E-09	38.2	
3C	5 Hz Ctrl 50 Hz PI	+	1-10	Raw	+	Control	"Equation2" pooled data	5Hz:49	825	3	-64.71	23.48	2.61				625021.47	822	7819.13	7827.18	7837.99				
							sum of two "Equation2"	0Hz:26(2)	825	6	-55.42	16.42	3.38	-82.56	37.58	2.10	600525.87	819	7792.15	7806.28	7825.15	11.136	3.61E-07	27.0	
2C	5 Hz Ctrl 50 Hz PI	-	1-10	Norm	-	Control	"Equation2" pooled data	5Hz:54	790	3	1.18	-0.20	5.12				170.07	787	1036.61	1044.66	1055.30				
							sum of two "Equation2"	0Hz:30(2)	790	6	1.24	-0.12	4.42	1.08	-0.34	5.86	157.04	784	979.65	993.79	1012.35	21.682	1.69E-13	57.0	
3C	5 Hz Ctrl 50 Hz PI	+	1-10	Norm	+	Control	"Equation2" pooled data	5Hz:49	750	3	1.01	-0.20	3.23				159.01	747	973.09	981.14	991.57				
							sum of two "Equation2"	0Hz:26(2)	750	6	1.06	-0.20	3.92	0.94	-0.20	0.00	153.67	744	953.46	967.61	985.80	8.622	1.25E-05	19.6	

Supplementary table 8. Comparison eGFP- vs. eGFP+ under control conditions (data from Cathenaut et al 2021).

Stimulation protocol										Model parameters determined by non linear curve fitting										Model comparison stats					
Figure	Frequency	Control or Inflammatory	Protocol	Type of data	eGFP condition	Drug Condition	Model	N neuro ns	N obs	k	A1 eGFP	A2 eGFP	A3 eGFP	A1 eGFP+	A2 eGFP+	A3 eGFP+	SS	df	AIC	AICc	BIC	F	p	dAIC	
I	5 Hz	Ctrl	1-10	Raw	and	Control	"Equation2" pooled data	54-	1133	3	-57.93	12.17	3.29				957197.83	1130	10856.76	10866.80	10878.89				
							sum of two "Equation2"	49+	1133	6	-55.42	16.42	3.38	-60.20	8.32	3.12	927586.17	1127	10829.16	10843.26	10864.39	11.993	9.88E-08	29.6	
I	50 Hz	Ctrl	1-10	Raw	and	Control	"Equation2" pooled data	27-	517	3	-68.28	14.98	1.82				855892.23	514	5307.11	5315.19	5324.70				
							sum of two "Equation2"	19+	517	6	-68.49	31.86	2.18	-68.03	3.88	1.01	795499.75	511	5275.28	5289.50	5305.02	12.931	3.73E-08	31.8	
I	5 Hz	Ctrl	1-10	Norm	and	Control	"Equation2" pooled data	54-	980	3	1.15	-0.16	4.17				193.21	977	1197.84	1205.88	1217.39				
							sum of two "Equation2"	49+	980	6	1.06	-0.20	3.92	1.24	-0.12	4.42	179.49	974	1131.64	1143.75	1165.85	24.823	1.76E-15	66.2	
I	50 Hz	Ctrl	1-10	Norm	and	Control	"Equation2" pooled data	27-	470	3	1.37	-0.20	0.56				444.30	467	1315.37	1323.46	1331.98				
							sum of two "Equation2"	19+	470	6	1.19	-0.46	0.98	1.44	0.12	23.59	393.36	464	1264.14	1278.38	1293.21	20.028	3.19E-12	51.2	

Supplementary table 9. Comparison of plasticities in eGFP- vs. eGFP+ neurons under conditions of PI

Stimulation protocol										Model parameters determined by non linear curve fitting										Model comparison stats						
Figure	Frequency	Control or Inflammatory	Protocol	Repetition	Type of data	eGFP condition	Drug condition	Model	N neuro ns	N obs	k	A1 eGFP-	A2 eGFP-	A3 eGFP-	A1 eGFP+	A2 eGFP+	A3 eGFP+	SS	df	AIC	AICc	BIC	F	p	dAIC	
2C3C	5 Hz	PI	1-10	Raw and-	Raw	Control	Control	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	74(33)- 64(34)+	1518	3	-65.33	16.20	3.47	-69.18	15.31	6.03	2050975.88	1515	15268.67	15266.70	15279.97	21.003		<b>2.48E-13</b>	56.0
2C3C	50 Hz	PI	1-10	Raw and-	Raw	Control	Control	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	30(21)- 26(20)+	616	3	-80.45	31.24	4.29	-80.52	77.60	29.07	673737.00	613	6066.50	6074.56	6084.19	12.438		<b>6.64E-08</b>	30.6
2C3C	5 Hz	PI	1-10	Norm and-	Norm	Control	Control	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	74(33)- 64(34)+	1380	3	0.93	-0.20	4.98	0.97	-0.10	0.00	62.75	1377	-340.96	-332.93	-320.04	15.120		<b>1.10E-09</b>	38.8
2C3C	50 Hz	PI	1-10	Norm and-	Norm	Control	Control	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	30(21)- 26(20)+	560	3	1.00	-0.27	4.50	1.08	-0.34	5.86	134.62	557	798.93	807.00	816.24	4.846		<b>2.45E-03</b>	8.5

Supplementary table 10. Comparison of summated amplitudes

Stimulation protocol										Model parameters determined by non linear curve fitting										Model comparison stats						
Figure	Frequency	Control or Inflammatory	Protocol	Repetition	Type of data	eGFP condition	Drug condition	Model	N neuro ns	N obs	k	A1 eGFP-	A2 eGFP-	A3 eGFP-	A1 eGFP+	A2 eGFP+	A3 eGFP+	SS	df	AIC	AICc	BIC	F	p	dAIC	
2D3D	50 Hz	Ctrl	1-10	Raw and-	Raw	Control	Control	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	27- 19+	504	3	-74.64	-86.09	4.00	-73.18	-42.60	1.71	2905059.44	501	5802.62	5810.70	5819.51	12.815		<b>4.44E-08</b>	31.5
2D3D	50 Hz	PI	1-10	Raw and-	Raw	Control	Control	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	30(21)- 26(20)+	614	3	-81.83	-90.91	2.64	-87.33	-59.54	2.38	3661992.96	611	7088.28	7096.35	7105.96	10.419		<b>1.08E-06</b>	24.8
2D	50 Hz	Ctrl vs PI	1-10	Raw -	Raw	Control	Control	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	27- 19+	625	3	-75.81	-117.46	3.54	-77.03	-118.26	2.76	4348698.21	622	7311.44	7319.51	7329.19	2.876		<b>3.55E-02</b>	2.7
3D	50 Hz	Ctrl vs PI	1-10	Raw +	Raw	Control	Control	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	26(20)+ 493	493	3	-81.59	-52.13	2.16	-87.33	-59.54	2.38	1965224.77	490	5484.34	5502.43	5511.15	6.381		<b>3.01E-04</b>	13.0
2D	50 Hz	PI	1-10	Raw -	Raw	Control	Control	Equation2" pooled data sameA sum of two "Equation2"	30(21) 625	5	-68.29	-113.62	3.51	-82.25	-120.65	idem	2.76	4294484.42	620	7307.60	7319.74	7334.23	0.805		<b>3.70E-01</b>	-1.2
2D	50 Hz	PI	1-10	Raw -	Raw	Control	Control	quation2" pooled data sameA1 sum of two "Equation2"	30(21) 625	4	-75.08	-120.21	4.92	idem	idem	2.72	4289190.96	621	7304.83	7314.93	7327.02	0.021		<b>9.80E-01</b>	-4.0	
3D	50 Hz	PI	1-10	Raw +	Raw	Control	Control	Equation2" pooled data sameA sum of two "Equation2"	26(20) 493	5	-75.40	-42.06	2.20	-86.45	-59.52	idem	2.38	1891222.12	488	5479.42	5491.59	5504.62	0.083		<b>7.73E-01</b>	-1.9
3D	50 Hz	PI	1-10	Raw +	Raw	Control	Control	quation2" pooled data sameA1 sum of two "Equation2"	26(20) 493	4	-86.00	-60.11	10.27	idem	idem	2.24	1896411.90	489	5478.77	5488.89	5499.77	0.710		<b>4.92E-01</b>	-2.6	
2D	50 Hz	PI	1-10	Raw -	Raw	Control	Control	Equation2" pooled data sameA quation2" pooled data sameA1A2	30(21) 625	5	-68.29	-113.62	3.51	-82.25	-120.65	idem	2.72	4294484.42	620	7307.60	7319.74	7334.23	-0.766		<b>0.00E+00</b>	2.8

Supplementary table 11. Effect of CGP55845 or DPCPX on connections onto eGFP- neurons

Stimulation protocol										Model parameters determined by non linear curve fitting										Model comparison stats					
Figure	Frequency	Control or Inflammatory	Protocol	Type of data	eGFP condition	Drug Condition	Model	N neuro ns	N obs	k	A1 eGFP	A2 eGFP	A3 eGFP	A1 eGFP+	A2 eGFP+	A3 eGFP+	SS	df	AIC	AICc	BIC	F	p	dAIC if N/k>40 otherw ise	dAICc
2ES2	5 Hz	PI	1-10	Raw	-	CGP55845	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	10(7)	264	3	-65.26	15.05	7.46	-76.64	19.53	9.35	201717.08	261	2509.81	2517.96	2524.11	14.875	5.82E-09	36.1	2524.11
2FS2	5 Hz	PI	1-10	Raw	-	DPCPX	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	11(8)	242	3	-93.21	17.14	3.70	-103.33	22.19	5.56	659144.65	239	2608.93	2617.10	2622.88	2.658	4.90E-02	2.0	2622.88
2ES2	50 Hz	PI	1-10	Raw	-	CGP55845	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	11(5)	240	6	-82.09	9156.74	4262.91	-117.25	45.78	2.56	461197.52	237	2503.72	2511.89	2517.64	2.391	6.94E-02	1.2	2517.64
2FS2	50 Hz	PI	1-10	Raw	-	DPCPX	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	12(7)	262	3	-85.99	59.68	13.57	-85.78	16194.98	5703.91	193072.64	256	2487.37	2501.81	2512.35	0.964	4.10E-01	-3.1	2498.59
2ES2	5 Hz	PI	1-10	Norm	-	CGP55845	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	10(7)	238	3	1.07	-66.47	5303.45	1.11	-0.06	4.48	20.52	235	100.15	108.32	114.03	2.192	8.97E-02	0.7	114.03
2FS2	5 Hz	PI	1-10	Norm	-	DPCPX	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	11(8)	218	3	0.93	-0.86	70.83	0.91	-142.37	11683.37	9.27	215	-61.64	-53.45	-48.10	0.508	6.77E-01	-10.8	-48.10
2ES2	50 Hz	PI	1-10	Norm	-	CGP55845	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	11(5)	218	3	0.96	-40.62	1930.81	0.88	-58.11	2684.92	24.85	215	153.21	161.40	166.75	4.298	5.73E-03	0.5	166.75
2FS2	50 Hz	PI	1-10	Norm	-	DPCPX	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	12(7)	238	3	1.02	-0.33	2.33	/	/	/	15.66	235	35.83	44.00	49.72	0.556	6.45E-01	-10.6	49.72

Supplementary table 12. Effect of CGP55845 or DPCPX on connections onto eGFP+ neurons

Stimulation protocol										Model parameters determined by non linear curve fitting										Model comparison stats					
Figure	Frequency	Control or Inflammatory	Protocol	Type of data	eGFP condition	Drug Condition	Model	N neuro ns	N obs	k	A1 eGFP	A2 eGFP	A3 eGFP	A1 eGFP+	A2 eGFP+	A3 eGFP+	SS	df	AIC	AICc	BIC	F	p	dAIC if N/k>40 otherw ise	dAICc
3ES2	5 Hz	PI	1-10	Raw	+	CGP55845	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	10(7)	220	3	-50.69	11.89	3.29	-54.78	13.95	2.82	28555.71	217	1702.85	1711.04	1716.42	1.998	1.15E-01	-6.3	1716.42
3FS2	5 Hz	PI	1-10	Raw	+	DPCPX	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	11(7)	242	3	-53.25	17.63	2.34	-48.94	12.29	2.34	59294.30	239	2026.09	2034.26	2040.04	0.885	4.50E-01	-3.3	2040.04
3ES2	50 Hz	PI	1-10	Raw	+	CGP55845	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	12(8)	262	3	-87.11	41.40	2.47	-90.53	42.12	2.71	162734.80	259	2436.59	2444.74	2450.86	1.958	1.21E-01	-0.1	2450.86
3FS2	50 Hz	PI	1-10	Raw	+	DPCPX	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	10(7)	218	3	-66.42	33835.38	11556.45	-69.28	18583.39	5666.07	257587.17	215	2169.36	2177.55	2182.90	0.142	9.35E-01	-11.9	2182.90
3ES2	5 Hz	PI	1-10	Norm	+	CGP55845	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	10(7)	198	3	0.95	-0.15	3.35	0.95	-0.18	2.55	6.30	195	-112.71	-104.50	-99.55	1.959	1.22E-01	-6.4	-99.55
3FS2	5 Hz	PI	1-10	Norm	+	DPCPX	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	11(7)	218	3	0.89	-0.17	2.86	0.93	-0.12	3.27	9.99	215	-45.41	-37.22	-31.87	9.867	4.05E-06	16.1	-31.87
3ES2	50 Hz	PI	1-10	Norm	+	CGP55845	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	12(8)	238	3	0.93	-2.89	116.13	0.90	-8.34	322.58	101.71	235	481.08	489.25	494.97	0.378	7.69E-01	-11.2	494.97
3FS2	50 Hz	PI	1-10	Norm	+	DPCPX	"Equation2" pooled data sum of two "Equation2"	10(7)	198	3	0.72	-0.27	5.19	0.76	-0.29	4.24	22.86	195	142.45	150.66	155.60	0.101	9.59E-01	-12.1	155.60



# **DISCUSSION**





# DISCUSSION

L'objectif général de ce travail de thèse était d'étudier les phénomènes de plasticité synaptique à court-terme (STP) des synapses inhibitrices entre les neurones de la lamina II de la corne dorsale de la moelle épinière. Nos objectifs spécifiques étaient de déterminer 1) si ces connexions exprimaient des **mécanismes de STP** lors d'activation répétées pouvant survenir lors de stimulations nociceptives de faible ou de forte intensité, 2) si ces plasticités **différait selon la nature** excitatrice ou inhibitrice du neurone **postsynaptique**, 3) d'identifier **des mécanismes impliqués** dans ces STP, et 4) de déterminer si ces STP étaient modifiées en conditions douloureuses.

Ces questions ont été abordées en réalisant des enregistrements électrophysiologiques de neurones de la lamina II dans des tranches aiguës de moelle épinière de souris adultes (5-9 semaines). Nous avons utilisé des souris exprimant l'eGFP sous le contrôle du promoteur de la GAD65, une enzyme de synthèse du GABA pour enregistrer des neurones supposément inhibiteurs (eGFP+) ou supposément excitateurs (eGFP-). Dans ces neurones, des courants postsynaptiques GABAergiques ont été évoqués par la stimulation électrique extracellulaire d'un neurone GABAergique voisin. Les stimulations ont été réalisées à faible fréquence (5 Hz) ou à fréquence élevée (50 Hz), correspondant aux types de fréquences activant ces réseaux lors de stimulations nociceptives faibles ou intenses. Pour déterminer si les plasticités de ces connexions étaient affectées en conditions douloureuses, nous avons procédé à des enregistrements similaires dans des neurones provenant de souris chez lesquelles une inflammation périphérique a été induite la veille par injection intraplantaire de carragénine.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse indiquent que : 1) les connexions GABAergiques entre les neurones de la lamina II expriment des mécanismes de STP qui diffèrent suivant la fréquence de stimulation du neurone présynaptique (basse ou haute fréquence) ; 2) ces plasticités diffèrent selon la nature du neurone postsynaptique (excitateur ou inhibiteur), même lorsque ces connexions impliquent le même neurone présynaptique, et 3) ces plasticités mettent en jeu l'activation de récepteurs GABA<sub>B</sub> et/ou A1 par des concentrations extracellulaires de leurs ligands ; 4) ces plasticités sont modifiées en conditions d'inflammation périphérique.

### **STP aux synapses GABAergiques sur les neurones supposément excitateurs**

Nos résultats indiquent que dans la lamina II, en conditions physiologiques de base, les connexions GABAergiques sur les neurones supposément excitateurs ne présentent pas de plasticité à basse fréquence de stimulation. En revanche, les amplitudes initiales des CPSIe GABAergiques sont augmentées lors d'applications répétées de trains de stimulations à haute fréquence et en conditions d'inflammation périphérique, et les amplitudes des CPSIe diminuent durant les trains. En conditions d'inflammation périphérique, les effets de la fréquence sur l'amplitude et la plasticité des CPSIe sont décalés : la situation en conditions de base à 50 Hz correspondant à celle en conditions d'inflammation périphérique à 5 Hz. Lors de stimulations à 50 Hz, les CPSIe présentent une forte sommation temporelle qui n'atteint pas son maximum à la fin des 11 stimulations. Le ralentissement des cinétiques de désactivation des CPSIe GABAergiques en conditions inflammatoires augmente cette sommation temporelle. En conditions physiologiques de base, ces connexions sont sous un fort contrôle tonique impliquant l'activation de récepteurs A1 par des concentrations extracellulaires d'adénosine liées à l'activité synaptique ; lors de stimulations à basse fréquence en conditions d'inflammation périphérique, s'y ajoute un contrôle impliquant des récepteurs GABA<sub>B</sub>.

### **STP aux synapses GABAergiques sur les neurones supposément inhibiteurs**

Nos résultats indiquent que dans la lamina II, quelles que soient les fréquences des trains de stimulation, les connexions GABAergiques sur les neurones supposément inhibiteurs présentent une forte dépression. En conditions d'inflammation périphérique, les amplitudes initiales des CPSIe ne sont augmentées que lors de stimulations à 50 Hz, mais pas à 5 Hz. Tant en conditions physiologiques de base qu'en inflammation périphérique, et quelles que soient les fréquences, les amplitudes des CPSIe de la fin du train de 11 stimulations atteignent une valeur similaire. A ces connexions, les CPSIe présentent une sommation temporelle limitée qui atteint son maximum après quelques stimulations. Le ralentissement des cinétiques de désactivation des CPSIe en conditions inflammatoires augmente cette sommation temporelle. Ces connexions sont inhibées à basse fréquence par des autorécepteurs GABA<sub>B</sub> et par une inhibition tonique impliquant l'activation de récepteurs A1 en conditions physiologiques de base, mais ces contrôles disparaissent en conditions d'inflammation périphérique.

*Dans les paragraphes suivants, différents aspects de ce projet et des résultats en découlant sont discutés. Pour limiter les redondances, cette discussion ne reprend que quelques éléments des sections « discussion » des articles et des manuscrits intégrés à cette thèse et en aborde de nouveaux: la nature des neurones enregistrés et stimulés, leur place dans les réseaux de la corne dorsale, l'impact des plasticités étudiées sur le traitement de l'information par ces réseaux, et la possible mise en jeu de ces plasticités dans les stratégies analgésiques par stimulation électrique.*

### 1. Nature excitatrice ou inhibitrice des neurones enregistrés

Pour nos expériences, nous avons utilisé des souris exprimant l'eGFP sous le contrôle du promoteur de la GAD65 (lignée développée par Ferenc Erdelyi et Gabor Szabo de l'Institute of Experimental Medicine, Budapest (Cui et al., 2011)). Nous avons soit enregistré des neurones fluorescents, soit des neurones non fluorescents. Cui et al. (2011) ont rapporté que 79 % des neurones eGFP+ sont bien immunopositifs au GABA. Cependant, seulement 60% des neurones immunopositifs au GABA sont également eGFP+.

Ces pourcentages sont d'ailleurs comparables aux valeurs publiées pour une lignée exprimant l'eGFP sous le contrôle du promoteur de la GAD67, dans laquelle 86% des neurones eGFP+ sont immunopositifs au GABA, et seulement 54 % des neurones immunopositifs au GABA sont eGFP+ (Oliva, Jiang, Lam, Smith, & Swann, 2000).

Par ailleurs, les données de la littérature indiquent que la majorité des neurones GABAergiques de la lamina II présentent un motif de décharge de potentiels d'action de type *Tonic*. Ceci a été vérifié dans des neurones dont la nature inhibitrice a été déterminée par immunocytochimie (Yasaka et al., 2010), par l'expression de GAD67 (Daniele & MacDermott 2009), de GAD65 (Cui et al., 2011 ; Kloc et al., 2019), par l'expression de marqueurs présents dans des neurones GABAergiques de la lamina II (Heinke et al., 2004), simplement identifiés par leur morphologie typique de neurones inhibiteurs de la lamina II (Grudt & Perl, 2002).

Comme dans ces études, la majorité des neurones eGFP+ que nous avons enregistré présente un profil de décharge de type *tonic*.

Ces données indiquent que la grande majorité des neurones eGFP<sup>+</sup> du modèle que nous utilisons correspond bien à des neurones GABAergiques, mais des neurones GABAergiques peuvent également se retrouver dans les neurones eGFP<sup>-</sup> que nous avons enregistré.

Il reste néanmoins à déterminer si l'expression d'eGFP n'est pas affectée dans notre modèle d'inflammation périphérique aiguë pour nous assurer que nous avons bien échantillonné les mêmes populations de neurones que lors de nos expériences en conditions physiologiques de base.

## 2. Les neurones stimulés, leur nombre et leur localisation

Lors de nos enregistrements électrophysiologiques, nous avons évoqué des CPSIe GABAergiques par une stimulation électrique extracellulaire et locale. Cette électrode de stimulation est placée à environ 20-150  $\mu\text{m}$  du corps cellulaire du neurone enregistré. Un des inconvénients de la stimulation extracellulaire, est le fait que l'on ne sache pas exactement quel neurone est stimulé et la stimulation simultanée de plusieurs neurones ne peut être exclue a priori.

Néanmoins, la mise en jeu d'un effet polysynaptique de la stimulation faisant intervenir une synapse excitatrice glutamatergique peut être exclu, nos enregistrements ayant été réalisés en présence de CNQX, un antagoniste des récepteurs AMPA/kainate (en plus de la strychnine bloquant les récepteurs de la glycine). De plus, à chaque enregistrement, nous nous sommes assurés que : 1) les CPSIe étaient évoqués à partir d'un seuil précis suivant une règle de tout-ou-rien, 2) l'augmentation de l'amplitude de stimulation de 0.05 mA n'induisait pas une augmentation des CPSIe, 3) à l'inversion de polarité aucun CPSIe n'était évoqué, et 4) les CPSIe étaient évoqués avec une latence constante.

Dans ces conditions, les CPSIe ont probablement été évoqués par la stimulation locale d'un seul neurone GABAergique présynaptique. Ceci est en accord avec l'amplitude des CPSIe que nous avons enregistrés, celle-ci correspondant en moyenne à 3 fois l'amplitude des CPSI miniatures enregistrés dans la même préparation, ce qui serait compatible avec la stimulation d'une seule synapse (voir Article 1, Figure 2C). De plus, nous avons noté qu'un déplacement de quelques microns de l'électrode de stimulation suffisait à ne plus évoquer de CPSIe dans les neurones enregistrés.

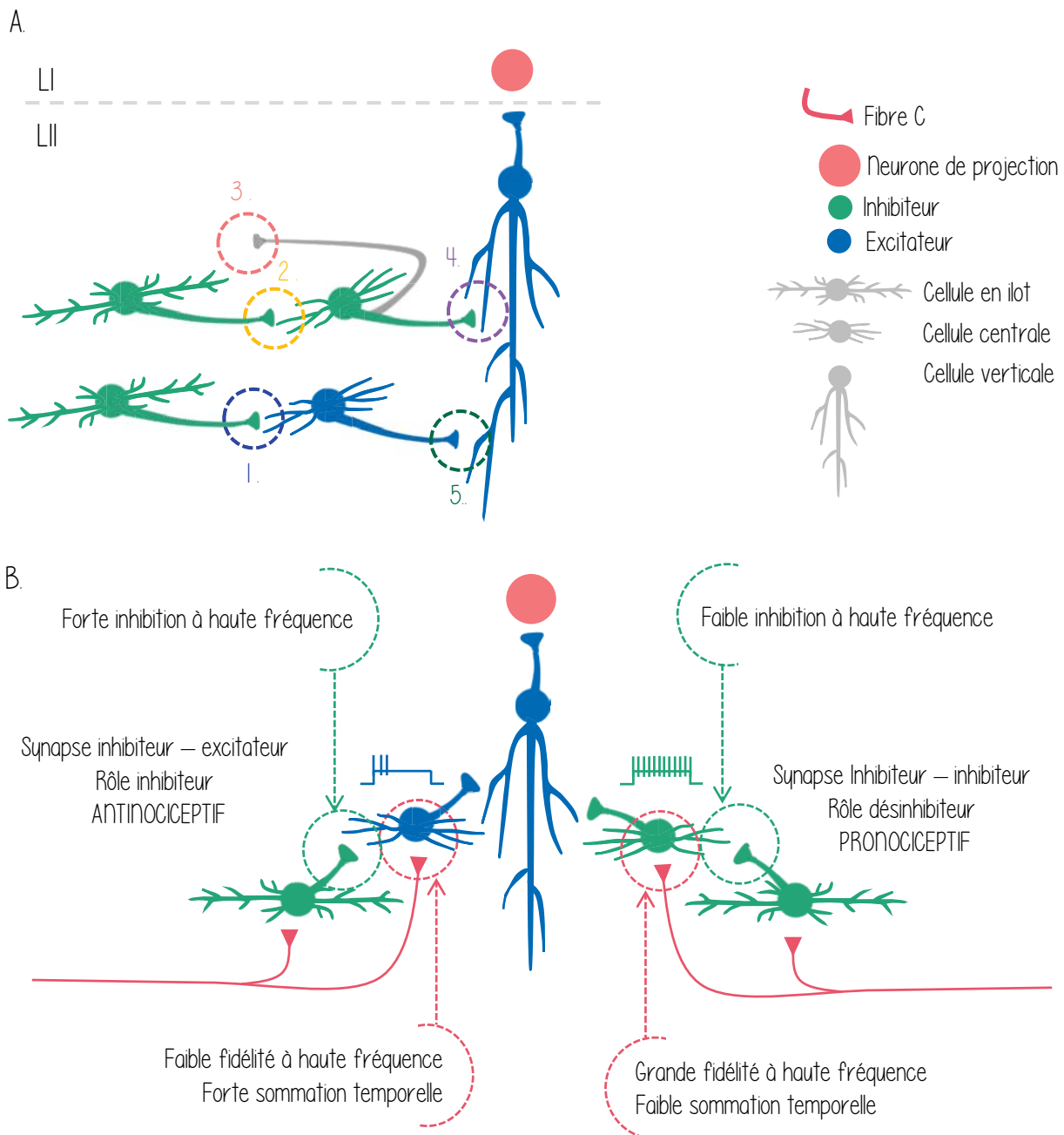
Par ailleurs, même si une seule connexion locale est stimulée au début de nos enregistrements, il ne peut être exclu que les stimulations répétées de nos protocoles augmentent l'excitabilité de neurones voisins qui n'étaient initialement pas recrutés par nos protocoles. Néanmoins, aucune potentialisation n'a été observée durant les trains de stimulations, et les résultats que nous avons observés avec notre protocole de stimulation minimale sont reproduits lors de stimulations à plus forte amplitude (voir Article 1, Figure S6).

Ces observations suggèrent que les CPSIe que nous avons enregistrés ont probablement été évoqués par la stimulation locale d'un seul et même neurone GABAergique présynaptique tout au long de chaque train.

### 3. Nature des neurones stimulés et enregistrés

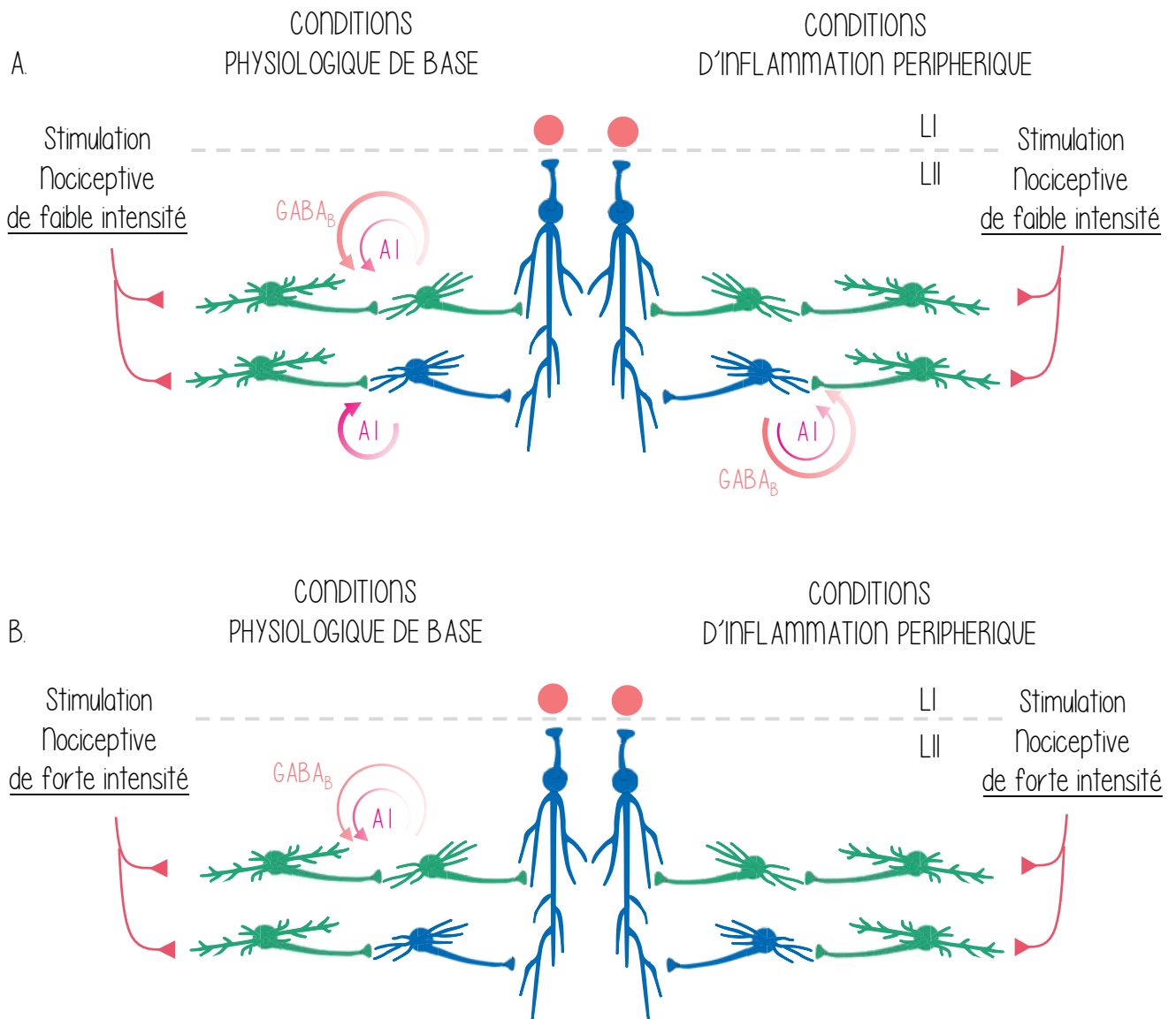
Dans nos expériences, nous avons enregistré au hasard dans la lamina II un neurone eGFP- et/ou un neurone eGFP+, puis recherché un neurone GABAergique présynaptique au(x) neurone(s) enregistré(s). Nous n'avons pas marqué ces neurones et ne connaissons donc pas les types morphologiques auxquels ils appartiennent. Ce type d'expériences étudiant la connectivité et la morphologie des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière a été réalisé par l'équipe d'Edward Roy Perl (Lu & Perl, 2003, 2005; Zheng, Lu, & Perl, 2010). Les travaux de Lu and Perl (2003) indiquent que lorsque deux neurones sont enregistrés au hasard dans la lamina II, la probabilité de connexion monosynaptique est faible (11% des paires) et un peu plus de la moitié de ces connexions sont inhibitrices (54%) et essentiellement GABAergiques (93% de ces connexions inhibitrices). Dans la totalité des cas où la morphologie du neurone présynaptique a été identifiée, il s'agissait d'une cellule en ilot, tandis que dans la totalité des cas où la morphologie du neurone postsynaptique a été déterminée il s'agissait d'une cellule centrale (Lu & Perl, 2003). Ces types neuronaux (cellules en ilot et cellules centrales) représentent d'ailleurs à eux seuls plus de la moitié des neurones de la lamina II (Lu & Perl, 2003) (voir Partie I, § C. 1,2) [Figure 3, B ; Figure 21, A].

Néanmoins, d'autres connexions GABAergiques existent entre les neurones de la lamina II [Figure 20] : celles entre les cellules centrales inhibitrices et les cellules verticales excitatrices ou inhibitrices (Lu & Perl, 2005) et la connexion parfois réciproque cellule centrale inhibitrice-cellule en ilot dont la présence a été suggérée (Zheng et al., 2010). Les cellules verticales présentent des corps cellulaires en forme de poire, plus gros que ceux des autres interneurons et sont généralement situés dans la lamina IIe, les rendant reconnaissables en microscopie à



**Figure 20 : Connexions potentiellement enregistrées et plasticité de la transmission synaptique GABAergique de la connexion des cellules en ilot et les cellules centrales.**

**A.** Parmi les connexions GABAergiques potentiellement enregistrées, il y a la connexion entre les cellules en ilot et les cellules centrales excitatrices (1) ou inhibitrices (2) ainsi que l'éventuelle connexion réciproque (3). Il y a également la connexion entre les cellules centrales inhibitrices et les cellules verticales (4) et la connexion entre les cellules centrales excitatrices et les cellules verticales (5). **B.** La synapse cellule en ilot-cellule centrale excitatrice présenterait un rôle **inhibiteur antinociceptif** alors que la synapse cellule en ilot- cellule centrale inhibitrice présenterait un rôle **désinhibiteur pronociceptif**. Avec leur profil de décharge *tonic*, les cellules centrales inhibitrices sont capables de suivre les entrées excitatrices des fibres afférentes à des fréquences élevées alors que les cellules centrales excitatrices au profil de décharge IB suivent à moins grande fidélité les entrées excitatrices à haute fréquence.



**Figure 21** : Connexions GABAergiques potentiellement étudiées: représentation schématique des modulations endogènes par des récepteurs GABA<sub>B</sub> et A1.

Les conditions physiologiques de base sont illustrées à gauche, les conditions d'inflammation périphérique sont illustrées à droite. Les modulations mises en jeu à basse fréquence de stimulation (5 Hz) sont illustrées en haut, celles mises en jeu à haute fréquence de stimulation (50 Hz) sont illustrées en bas.

infra-rouge. Ces cellules ont été évitées lors de nos enregistrements. Il est donc peu probable que nous ayons enregistré la connexion cellule centrale inhibitrice-cellule verticale. En revanche, nous ne pouvons exclure d'avoir enregistré occasionnellement la connexion cellules centrales inhibitrices-cellules en ilot, bien que de telles connexions ne soient que très rarement représentées dans les paires enregistrées au hasard par d'autres groupes (Lu & Perl, 2003; Zheng et al., 2010). Chez le rat, 12% des neurones de la lamina II sont des cellules radiales (voir Partie I, § C. 1) [Figure 3,B]. Leur connectivité étant, à notre connaissance, pas encore déterminée, il ne peut être exclu que ces cellules aient été ponctuellement enregistrées ou stimulées lors de nos expériences. Cependant l'homogénéité des STP aux connexions GABAergiques sur les neurones eGFP+ que nous avons enregistrés suggérerait plutôt qu'il s'agissait d'un seul type de connexion. Enfin, nos données indiquent que la majorité des neurones eGFP+ que nous avons enregistrés présentait un motif de décharge de potentiels d'action de type *Tonic* tandis que la majorité des neurones eGFP- enregistrés présentait un motif de type IB, ce qui correspond aux motifs de décharge majoritairement observés dans les cellules centrales inhibitrices et excitatrices, respectivement (Grudt & Perl, 2002 ; Lu et al., 2013 ; Lu & Perl, 2003, 2005 ; Yasaka et al., 2010).

L'ensemble de ces données suggère que les neurones que nous avons enregistrés et dans lesquels nous avons pu évoquer des CPSIe GABAergiques par stimulation d'un neurone voisin étaient en majorité des cellules centrales excitatrices ou inhibitrices. De plus, ces données suggèrent que les neurones présynaptiques dont la stimulation a évoqué des CPSIe GABAergiques dans les neurones enregistrés correspondaient majoritairement à des cellules en ilot. Nous pouvons donc supposer avoir en majorité enregistré les connexions entre les cellules en ilot et les cellules centrales excitatrices (eGFP-) ou inhibitrices (eGFP+) [Figure 20, B].

#### 4. Importance des connexions étudiées dans les réseaux de la lamina II

Durant nos expériences, nous avons étudié dans la lamina II les plasticités des connexions entre des neurones GABAergiques et des neurones postsynaptiques supposément excitateurs ou supposément inhibiteurs. Les données de la littérature suggèrent qu'il s'agissait probablement de connexions entre des cellules en ilot et des cellules centrales excitatrices ou des cellules centrales inhibitrices (voir paragraphe précédent). Ces dernières contactent à leur



tour les cellules verticales projetant vers la lamina I et notamment sur les neurones de projection (Grudt & Perl, 2002; Lu & Perl, 2003, 2005). Les cellules verticales sont dans leur grande majorité des neurones excitateurs, mais une faible proportion d'entre elles sont inhibitrices, représentant moins de 2 % du nombre total de neurones de la lamina II (les neurones GAD67-EGFP représentent 12 % des neurones de la lamina II, et 14 % d'entre eux sont des cellules verticales dans l'étude de Heinke et al. (2004)). Il est d'ailleurs possible que les neurones à morphologie de cellules verticales mais présentant un profil de décharge de potentiels d'action de type tonic enregistrés par Grudt and Perl (2002) correspondent à ces cellules verticales inhibitrices.

Puisque les cellules verticales inhibitrices ne représentent que moins de 2 % des neurones de la lamina II tandis que les cellules verticales dans leur ensemble représentent environ 30 % des neurones de cette lamina (Lu & Perl, 2003), nous considérerons ici l'hypothèse la plus probable où les cellules centrales excitatrices et inhibitrices que nous avons probablement enregistré contacteraient une cellule verticale excitatrice.

Les deux types de connexions que nous avons étudiées présenteraient un rôle opposé dans le traitement des informations nociceptives dans lamina II : la connexion cellule en ilot – cellule centrale excitatrice ayant un rôle global **inhibiteur** tandis que la connexion cellule en ilot – cellule centrale inhibitrice ayant un rôle global **desinhibiteur** [Figure 20, B].

## 5. Choix des fréquences de stimulation utilisées dans nos travaux et fréquences auxquelles sont soumis les neurones de la lamina II lors de stimulations nociceptives.

Voir également les § *Frequency coding of stimulation intensity by primary afferent fibers* et *Convergence of sensory afferents onto DH neurons* de la Revue 2.

Dans nos expériences, nous avons utilisé des protocoles de stimulation à 5 Hz et à 50 Hz des neurones GABAergiques de la lamina II. Les fibres afférentes représentent l'essentiel des entrées excitatrices s'exerçant sur ces neurones. En effet, la grande majorité des neurones de la lamina II est directement contactée par des fibres afférentes de type C (Grudt & Perl, 2002; Liu et al., 2021) et plus de 20 % des neurones GABAergiques de la lamina II sont contactés par des fibres A $\delta$  (Liu et al., 2021). Il existe de plus une convergence des afférences primaires sur les

neurones de la lamina II, et notamment de fibres présentant des vitesses de propagation différentes et des seuils différents. Cette convergence est particulièrement forte pour les fibres de type C contactant les cellules en ilot (Grudt & Perl, 2002).

Dans des conditions physiologiques de base, les nocicepteurs ne sont pas spontanément actifs, mais ils peuvent décharger à très basse fréquence ( $\leq 2$  Hz) lors de stimulations non-douloureuses (Andrew & Greenspan, 1999; Fleischer, Handwerker, & Joukhadar, 1983; Torebjork & Hallin, 1974). Lors de stimulations adéquates, les nocicepteurs déchargent des potentiels d'action à des fréquences corrélées avec l'intensité des stimuli (Adrian, 1920; Adrian & Zotterman, 1926; Campero, Serra, & Ochoa, 1996; Handwerker, Anton, & Reeh, 1987; Torebjork & Hallin, 1974). Lors de stimulations nociceptives intenses, ces fréquences peuvent atteindre plusieurs dizaines de Hertz au départ de la stimulation (ce point est développé dans la Revue 1, voir le tableau 1). Pour ces raisons, nous avons utilisé des protocoles de stimulations à 5 Hz et à 50 Hz, correspondant à la gamme de fréquence que peuvent présenter les fibres afférentes contactant les neurones de la lamina II lors de stimulations à faible et à forte intensité. Nos résultats indiquent que les neurones eGFP- et eGFP+ que nous avons enregistrés pouvaient décharger de manière fiable des potentiels d'actions lors de stimulations d'entrées synaptiques excitatrices à 50 Hz (Cathenaut et al. 2021, figure 1).

## 6. Possible impact des plasticités étudiées sur le traitement des informations nociceptives dans la lamina II en conditions physiologiques de base

Nos données indiquent que la plasticité des connexions GABAergiques sur les neurones excitateurs est distincte de celle sur les neurones inhibiteurs, même lorsque les deux neurones postsynaptiques sont contactés par un même neurone présynaptique. De telles différences de STP dépendants de la nature excitatrice ou inhibitrice de la cible postsynaptique ont un impact direct sur les propriétés dynamiques ainsi que sur la balance excitation/inhibition au sein des réseaux concernés (Bartley & Dobrunz, 2015; Buonomano, 2000; Klyachko & Stevens, 2006; Lovett-Barron et al., 2012; Moreno, Morris, & Canals, 2016; Pouille & Scanziani, 2004; Royer et al., 2012). Il est donc vraisemblable qu'il en soit de même dans la lamina II, d'autant plus que les cellules centrales contactent les cellules verticales qui sont les neurones de sortie de la lamina II dont la grande majorité est excitatrice et contacte des neurones de projection de la lamina I [Figure 6 et Figure 20].

Dans des conditions physiologiques de base, lors de stimulations à basse fréquence correspondant au type d'activité lors de stimulations nociceptives de faible intensité, les synapses GABAergiques sur les neurones inhibiteurs présentent une dépression à court-terme tandis que celles sur les neurones excitateurs ne présentent pas de plasticité. Lorsque la fréquence est augmentée, correspondant à des stimulations d'intensité forte, le contrôle inhibiteur sur les neurones excitateurs augmente par sommation temporelle tandis que cette augmentation est plus limitée aux synapses sur les neurones inhibiteurs.

De plus, les interneurons inhibiteurs enregistrés présentant en majorité des profils de décharge de type *tonic*, ils sont probablement capables de suivre les entrées excitatrices des fibres afférentes à des fréquences élevées, voir occasionnellement de produire plusieurs potentiels d'action par PPSE (voir Article 1, Figure 1DE) tandis que l'inhibition s'exerçant sur eux stagne. A l'inverse, les interneurons excitateurs enregistrés présentant majoritairement un motif de décharge de type IB, ceux-ci suivent à moins grande fidélité les entrées excitatrices à haute fréquence (voir Article 1, Figure 1DE) tandis que l'inhibition les contrôlant s'accroît [Figure 20].

Les synapses GABAergiques sur les neurones excitateurs ayant probablement un rôle global inhibiteur tandis que celles sur les neurones inhibiteurs ayant probablement un rôle global désinhibiteur, ces plasticités favorisant les premières au détriment des secondes lors de stimulations intenses pourraient permettre de limiter l'excitation des neurones de quatrième ordre (correspondant spéculativement aux cellules verticales). Ce type de plasticité pourrait donc correspondre à un contrôle du gain tel que proposé par Treede (2016), limitant essentiellement la transmission d'informations nociceptives intenses.

En conditions d'inflammation périphérique, ces phénomènes sont amplifiés pour les connexions sur les interneurons excitateurs, les stimulations à basse fréquence ayant un effet similaire à celles à haute fréquence en conditions physiologiques de base, tandis qu'ils ne sont amplifiés que pour des stimulations à haute fréquence aux connexions sur les interneurons inhibiteurs. De tels changements pourraient spéculativement permettre de limiter la transmission d'informations nociceptives de faible intensité tout en contribuant à une désinhibition lors de stimulations à des intensités plus fortes.

Il faut néanmoins souligner le caractère très spéculatif de ces interprétations.

## 7. Possible mise en jeu de plasticités non étudiées au cours de nos travaux.

Voir également le paragraphe § *Short-term plasticities and Cl<sup>-</sup>-extrusion capability* de la Revue 1.

La plasticité synaptique résulte d'un ensemble de phénomènes qui coexistent et dont la contribution varie selon les conditions d'activité mais aussi selon les conditions expérimentales (Buonomano, 2000; Xu-Friedman & Regehr, 2004). Dans nos conditions expérimentales,  $E_{Cl}$  était fixé à 0 mV. Dans ces conditions, le transporteur KCC2 est saturé par la concentration de 144 mM d'ions chlorures intracellulaires imposée par l'électrode d'enregistrement. Ce milieu a été utilisé pour s'affranchir de possibles effets postsynaptiques mettant en jeu des changements de  $E_{Cl}$  dépendants de l'activité synaptique inhibitrice, et également pour s'affranchir d'éventuelles altérations de l'homéostasie du chlorure qui pourraient survenir en conditions d'inflammation périphérique (voir § *Short-term plasticities and Cl<sup>-</sup>-extrusion capability de la Revue 1*).

Néanmoins, des résultats récents suggèrent que les neurones de la lamina II présentent une capacité suffisante d'extrusion des ions  $Cl^-$  en conditions de base pour que des CPSIe GABAergiques évoqués à 20 Hz ne soient pas modifiés par des changements de  $E_{Cl}$  (Ferrini et al., 2020). Les plasticités que nous avons mis en évidence dans des conditions physiologiques de base ne sont donc pas impactées par une plasticité supplémentaire affectant  $E_{Cl}$  de manière dépendante de l'activité, au moins jusqu'à des fréquences de 20 Hz.

Il est néanmoins possible que les capacités d'extrusion des ions  $Cl^-$  puissent être modifiés en conditions d'inflammation périphérique (Zhang, Liu, & Xu, 2008), mais pas forcément dans la phase aiguë sur laquelle a porté notre étude (voir § *Short-term plasticities and Cl<sup>-</sup>-extrusion capability* de la Revue 1).

## 8. Impact des contrôles modulateurs impliquant les récepteurs GABA<sub>B</sub> et A1

Voir également la discussion de l'Article 2

La quasi-totalité des connexions GABAergiques entre neurones de la lamina II est inhibée par des applications exogènes d'agonistes GABA<sub>B</sub> (Grudt & Henderson, 1998; Hugel & Schlichter, 2003) ou d'adénosine (Hugel & Schlichter, 2003; Yang, Fujita, & Kumamoto, 2004), indiquant

que virtuellement tous les interneurons GABAergiques de la lamina II contactant des neurones dans cette lamina portent ces deux types de récepteurs présynaptiques. Nos données indiquent que lors de stimulations répétées, les récepteurs GABA<sub>B</sub> et A1 peuvent être activés par des concentrations extracellulaires de leurs agonistes respectifs et contrôler les connexions GABAergiques dans la lamina II. De manière intéressante, ces contrôles sont distincts lorsque le neurone postsynaptique est inhibiteur ou lorsqu'il est excitateur, indiquant que les conditions d'activation de ces récepteurs par la libération d'agonistes endogènes diffèrent selon la nature des neurones postsynaptiques contactés (Cathenaut et al 2021) [Figure 21].

Par ailleurs, des contrôles inhibiteurs endogènes qui n'existaient pas en conditions physiologiques de base apparaissent en conditions d'inflammation périphérique et inversement (Article 2): l'activation tonique impliquant des récepteurs A1 n'est plus observée pour les connexions sur les synapses inhibitrices, et elle semble surmontée par des mécanismes de potentialisation lors de stimulations à haute fréquence des connexions sur les synapses excitatrices.

Nos résultats indiquent l'apparition en conditions inflammatoires d'une inhibition tonique des connexions GABAergiques sur les neurones excitateurs impliquant des récepteurs GABA<sub>B</sub> [Figure 21].

Ces résultats sont compatibles avec les données indiquant l'augmentation du tonus GABAergique dans la corne dorsale de la moelle épinière de rat en situation d'inflammation périphérique (Castro-Lopes, Tavares, Tolle, Coito, & Coimbra, 1992). Il faut souligner qu'en situation inflammatoire, les agonistes GABA<sub>B</sub> ne présentent généralement pas d'effet analgésique (Patel et al., 2001; Smith et al., 1994), ce qui pourrait suggérer que l'activation de ces récepteurs soit déjà maximale ou que l'inhibition qu'ils exercent soit surmontée par d'autres mécanismes de facilitation, comme nous l'avons observé lors de stimulations à haute fréquence.

Nos résultats indiquent que le contrôle tonique inhibiteur impliquant l'activation de récepteurs A1 est perdu en situation inflammatoire aux synapses GABAergiques sur les neurones inhibiteurs. L'activation des récepteurs A1 de ces synapses pourraient spéculativement contribuer à l'effet analgésique des agonistes et modulateurs allostériques A1 qui a été décrit tant en situation neuropathique qu'inflammatoire (Sawynok, 2016; Zylka, 2011).

Aux connexions où ils sont mis en jeu, ces contrôles inhibiteurs par des autorécepteurs A1 et GABA<sub>B</sub> semblent surmontés par des phénomènes de facilitation apparaissant à haute fréquence de stimulation et/ou en conditions inflammatoires.

Ces contrôles endogènes mettant en jeu des récepteurs A1 et GABA<sub>B</sub> pourraient donc représenter des mécanismes du contrôle du gain de l'information nociceptive lors de stimulations nociceptives en situation physiologique de base et/ou lors de stimulations de faible intensité en conditions d'inflammation périphérique.

L'inhibition des connexions inhibitrices sur des neurones inhibiteurs aurait un effet inhibiteur sur l'information nociceptive, tandis que l'inhibition de connexions inhibitrices sur des neurones excitateurs aurait un effet désinhibiteur sur l'information nociceptive.

### 9. Un rôle des plasticités et modulations étudiées dans les approches analgésiques non pharmacologiques ?

Des approches analgésiques consistant à appliquer des trains de stimulations électriques sur la peau comme la TENS et la SCS donnent des résultats très concluants et produisent un soulagement pour les patients souffrant de douleurs chroniques. Ces nouvelles approches permettent de soulager les douleurs neuropathiques mais elles ne sont malheureusement pas ou peu efficaces pour les douleurs d'origine inflammatoire. Les mécanismes d'action de ces approches restent encore mal compris (voir Revue 2 en Annexe).

Plusieurs études suggèrent que la corne dorsale de la moelle épinière serait le site d'action principal de ces nouvelles approches, impliquant les neurones GABAergiques de la lamina II et plus particulièrement les cellules en îlot (Jensen & Brownstone, 2019). Certaines des fréquences utilisées lors de ces approches non pharmacologiques suggèrent une mise en jeu des mécanismes de plasticité synaptique à court-terme étudiés lors de nos travaux.

En effet, la connexion GABAergique sur les cellules excitatrices que nous avons étudiée correspond probablement à celle cellule en îlot – cellule centrale excitatrice, cette connexion ayant un effet global inhibiteur sur le réseau (voir § 4 et 6 de la Discussion), or cette connexion présente une forte sommation temporelle lors de stimulations à 50 Hz qui sont également utilisées dans certains protocoles de stimulation médullaire.

Comme discuté dans les paragraphes précédents, la moelle épinière joue un rôle fondamental dans le traitement des informations douloureuses et en stimulant électriquement des neurones

de la corne dorsale, nous avons montré que la ST-P est dépendante de la cible au sein des connexions GABAergiques de la lamina II et que ceci a un impact direct sur la balance excitation/inhibition. De plus, nos résultats en situation d'inflammation périphérique suggèrent que le traitement de l'information nociceptive lors de fréquences similaires à celles des fibres lors de l'application stimulus sensoriels de faible et forte intensité est modifié par rapport à la celui en situation physiologique de base. Ces différences de ST-P observés en condition d'inflammation périphérique pourraient représenter des mécanismes de désinhibition présents dans les cas de douleur chronique. De plus, ces mécanismes de plasticité synaptiques à court-terme impliquent des récepteurs GABA<sub>B</sub> et A1 de l'adénosine, or ces récepteurs modulent l'efficacité de la stimulation médullaire. En effet, l'effet analgésique de la SCS est potentialisé par l'injection intrathécale conjointe d'agonistes GABA<sub>B</sub> et A1 tandis qu'il est inhibé par les antagonistes de ces récepteurs (Cui et al., 1998 ; Lind et al, 2004 ; Lind et al., 2008). La stimulation médullaire pourrait permettre l'activation de ces récepteurs par du GABA et de l'adénosine libérés de manière dépendante de l'activité. Ceci serait compatible avec les données indiquant que la stimulation médullaire augmente la libération de GABA chez les animaux chez lesquels cette procédure présente une efficacité analgésique. (Baba et al., 1994 ; Cui et al., 1998; Cui et al., 1997; Stiller et al., 1996). La combinaison d'approches non-pharmacologiques de neuromodulation avec des modulateurs ciblant les récepteurs GABA<sub>B</sub> et A1 pourraient donc spéculativement représenter une stratégie d'analgésie intéressante.

# CONCLUSION

En conclusion, nos résultats confirment que les connections GABAergiques de la lamina II de la moelle épinière présentent des plasticités à court terme, et démontrent que ces phénomènes dépendent de la nature inhibitrice ou excitatrice du neurone postsynaptique contacté. Cette différence de plasticité synaptique a également été vérifiée aux connexions entre un unique neurone GABAergique présynaptique et deux neurones postsynaptiques -un excitateur et un inhibiteur- enregistrés simultanément.

Nos données indiquent également que les plasticités synaptiques à court-terme exprimées à ces connexions dépendent des conditions de fréquence de stimulation et de l'intervalle entre les trains d'activité. Les propriétés dynamiques de ces synapses semblent résulter d'un ensemble de processus facilitateurs et inhibiteurs qui coexistent et s'expriment préférentiellement à certaines fréquences ou dans certaines conditions d'activité.

En conditions d'inflammation périphérique, ces transmissions GABAergiques sont potentialisées de manière dépendante de l'activité et leurs plasticités sont fortement modifiées, conduisant probablement à des changements majeurs dans la fonction de ces réseaux.

Cependant, si ils ont permis de mettre en évidence ces plasticités cibles-spécifiques et certaines de leurs modulations, ces travaux ne constituent qu'une étape dans l'étude du traitement des informations codées en fréquence par les réseaux de la lamina II. En effet, nous avons arbitrairement considéré deux groupes de neurones postsynaptiques (les eGFP- et les eGFP+), ce qui ne rend pas compte de la diversité de neurones de la lamina II, cette diversité correspondant probablement à des éléments de micro-réseaux de fonction distincte. L'utilisation d'autres modèles permettant de cibler des populations homogènes de neurones pré et postsynaptique permettra certainement de révéler des caractéristiques de plasticités propres à chacun de ces micro-réseaux.

De plus, les trains d'activité évoqués lors de stimulations nociceptives n'ont pas la régularité de ceux que nous avons appliqués lors de nos expériences. En effet, durant la phase initiale des stimulations nociceptives, la plupart des afférences primaires peuvent décharger à des fréquences supérieures à celles utilisées, mais ces fréquences diminuent rapidement pour atteindre des valeurs similaires à celles utilisées lors de nos trains à basse fréquence. Il sera



donc nécessaire d'utiliser des motifs d'activité plus proches de ceux des fibres afférentes pour déterminer leur impact différentiels sur les connexions de la lamina II. Enfin, l'impact des plasticités que nous étudions est très spéculatif, car nous n'avons pas enregistré la sortie du réseau de la lamina II (cellules verticales) et/ou la sortie du réseau spinal (neurone de projection de la lamina I). Seuls ces enregistrements permettront de déterminer l'impact exact des plasticités que nous avons étudiées sur le traitement des informations nociceptives à la sortie de ces réseaux.

# ANNEXES

## REVUE 2

Manuscrit en préparation

### Stimulation médullaire : revue des hypothèses sur les mécanismes mis en jeu

#### INTRODUCTION

La douleur est une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable. Dans des conditions normales, celle-ci permet de maintenir ou de restaurer l'intégrité physique de l'organisme. La sensation de douleur correspond à l'interprétation consciente d'informations nociceptives en provenance de la périphérie. Lorsque la douleur résulte de l'activation de neurones sensoriels spécialisés (les nocicepteurs), celle-ci est qualifiée de « douleur nociceptive ». Lorsque quelle provient d'une lésion du système nerveux, périphérique ou central, on parle alors de douleurs neuropathiques. En France, 32% de la population témoigne avoir souffert de douleurs neuropathiques, dont 63% avec des douleurs sévères (Bouhassira et al., 2008). D'une manière générale, la douleur aiguë (au rôle physiologique de protection), est relativement bien prise en charge et peut être soulagée par la prise d'antalgiques le temps de la guérison. En revanche, les douleurs chroniques (s'étendant sur plus de trois mois) et notamment celles d'origine neuropathique, restent très complexes à traiter avec moins de 50 % des patients souffrant de cette pathologie répondant aux traitements pharmacologiques (Baron, 2006; Finnerup et al., 2015). De plus, ces traitements sont généralement accompagnés de phénomènes de tolérance réduisant leur efficacité sur le long terme et empêchant une amélioration significative des conditions de vie des patients (Kemler et al., 2000; Kumar et al., 2007; Visnjevac et al., 2017).

En alternative ou en complément à ces approches pharmacologiques, de nouvelles approches analgésiques non pharmacologiques faisant intervenir des procédures de stimulation se développent. Ces procédures qui permettent de moduler le fonctionnement du système nociceptif sont qualifiées de « neuromodulation ».

L'une de ces approches est la stimulation médullaire (*SCS pour Spinal Cord Stimulation*) qui consiste à effectuer des stimulations de la moelle épinière au moyen d'électrodes implantées au niveau épidural en position médiane et en position rostrale par rapport à la zone la plus douloureuse (Holsheimer, 1998). En France, cette approche est uniquement proposée en dernier recours lors de l'échec de traitements pharmacologiques. Il s'agit pourtant d'une technique de neuromodulation disponible depuis plus de 30 ans dans le cas des douleurs neuropathiques réfractaires (Voirin et al., 2020) et son efficacité est démontrée dans plusieurs type de douleurs chroniques (Kumar et al., 2007; Kemler et al., 2008; North et al., 2011; de Vos et al., 2014; Slangen et al., 2014).

En dépit de son efficacité, la stimulation médullaire est peu utilisée. Durant la dernière décennie, des avancées importantes ont été réalisées, avec notamment l'utilisation de nouveaux protocoles de stimulation.

Les mécanismes d'action de la stimulation médullaire restent mal connus. Une mise en jeu de mécanismes du type de celui proposé par Melzack et Wall dans leur hypothèse théorique du contrôle du portillon (gate-control theory (Melzack and Wall, 1965)) est souvent évoquée.

La moelle épinière dorsale sur laquelle sont placées les électrodes est une structure intégrant et modulant des informations nociceptives provenant du tronc et des membres. Plusieurs éléments de cette structure d'intégration sont susceptibles d'être activés par la stimulation médullaire. En effet, dans la moelle épinière dorsale se retrouvent les terminaisons centrales des fibres sensorielles, des cellules gliales et des réseaux d'interneurones traitant les informations sensorielles, des neurones et des faisceaux projetant vers les centres supraspinaux et des afférences modulatrices provenant de centres supraspinaux.

Le rôle relatif de ces différents éléments dans l'effet analgésique de la stimulation médullaire ne fait pas l'unanimité dans la communauté scientifique. L'avancement des connaissances sur les mécanismes d'action de la stimulation médullaire pourrait permettre d'adapter cette procédure et sa mise en œuvre pour en améliorer les effets, mais également de mieux cibler les patients auxquels elle est proposée, et de personnaliser les protocoles.

L'objectif de cette revue est de faire le point sur les différentes hypothèses de mécanismes d'action de la stimulation médullaire, ainsi que sur des questions qui restent en suspens, comme notamment les raisons pour lesquelles l'efficacité de cette procédure n'est pas la même selon l'origine des douleurs.

## **STIMULATION MEDULLAIRE : DECOUVERTES ET PRINCIPES**

### **Utilisation de stimulations électriques pour soulager la douleur**

L'utilisation de la stimulation électrique pour soulager la douleur semble au moins remonter à l'Antiquité. En effet, l'utilisation de poissons-chats produisant des décharges électriques (*Malapterurus electricus*) est représentée dans une sculpture Egyptienne datant de -2400. La Torpille Noire (*Torpedo nobiliana*) était également connue pour soulager la douleur et était prescrite dès l'Antiquité pour lutter notamment contre les céphalées et la goutte (Tsoucalas et al., 2014). C'est cependant dans l'ouvrage datant de l'an 47 « *Les Compositions* » de Scribonius Largus (1528), un médecin de l'empereur romain Claudius, que l'on trouve la première mention écrite de l'usage de l'électricité dans le traitement de la douleur. Dans ce recueil de remèdes traditionnels et de formules pharmaceutiques, il préconise également l'application de la Torpille noire qui peut délivrer des chocs électriques atteignant 230 V et dépassant des intensités de 30 A. L'application de ce poisson vivant se faisait sur les sites douloureux jusqu'à l'obtention d'un engourdissement. Au milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle, le médecin neurologue G. Duchenne de Boulogne recommandait la « faradisation localisée » (application médicale de l'électricité d'induction) dans le traitement de l'angine de poitrine, de la sciatique et des rhumatismes (Duchenne de Boulogne, 1861).

### **Premières approches de neuromodulation en médecine moderne**

Une approche de neuromodulation, la neurostimulation transcutanée (TENS pour *transcutaneous electrical nerve stimulation*) a été développée au milieu du siècle dernier, suite aux travaux de P. Paraf, décrivant le soulagement de névralgies post-herpétiques, de névralgies faciales et de sciatgies avec cette technique (Paraf, 1948). La TENS est une approche d'électrothérapie toujours utilisée. Dans les années 1960, la neurostimulation

prend un tournant décisif avec le début des essais de stimulation thalamique de patients souffrant de douleurs neuropathiques (Mazars et al., 1960; Mazars et al., 1974). En 1965, Melzack et Wall proposent une série d'hypothèses conceptuelles relatives au fonctionnement des systèmes sensoriels impliqués dans la douleur, et en déduisent des implications thérapeutiques. L'une de ces implications est que la douleur pourrait être modulée en étant influencée par les fibres afférentes rapides de grand diamètre (Melzack and Wall, 1965).

En 1967, Wall et Sweet ont vérifié cette prédiction en montrant chez huit patients douloureux un soulagement par des stimulations électriques directes des nerfs périphériques (Wall and Sweet, 1967).

Ce type de stimulation de nerfs périphériques est aujourd'hui indiqué dans le cas de douleurs d'origine neuropathique consécutive à la lésion d'un seul nerf ou pour traiter certaines migraines (Shetter, 2009).

La stimulation médullaire a été testée pour la première fois en 1967 par Shealy (1967) et son équipe, qui ont montré que des stimulations inhibaient des douleurs associées aux carcinomes pulmonaires et/ou à leur traitement. Cette technique était alors désignée sous le nom de « stimulation cordonnale postérieure » ou « stimulation des cordons dorsaux », car il était présumé que les effets analgésiques résultaient de la stimulation de ces cordons. Des protocoles utilisant des fréquences et des motifs de stimulation différents ont été ensuite développés et sont réputés plus efficaces: des protocoles de stimulation en bouffées (stimulations en « burst » ; (De Ridder et al., 2013)) et à haute fréquence (Rapcan et al., 2015)

**[FIGURE 1].**

### **Principes de la stimulation médullaire**

La stimulation médullaire est une approche de neurostimulation utilisée pour traiter les douleurs chroniques réfractaires (non soulagées par les antidouleurs). Elle consiste à altérer le message nerveux avant que celui-ci soit interprété comme douloureux par le cortex cérébral **[FIGURE 2]**. Pour cela, une série d'électrodes sont insérées le long des vertèbres, dans l'espace épidural. Ces électrodes sont utilisées pour délivrer des stimulations électriques dont le type varie selon les protocoles suivis.

L'implantation de l'électrode peut s'effectuer à différents niveaux de la moelle épinière, rostralement par rapport au territoire douloureux principal (Cf § Différent type de SCS). La stimulation est effectuée via un générateur qui délivre des charges électriques autour de l'électrode, créant ainsi un champ électrique local (voir encadré sur les effets des stimulations électriques sur le tissu nerveux). Les cibles et mécanismes mis en jeu par la SCS et conduisant au soulagement des douleurs sont encore mal connus. De manière générale, un phénomène du type « gate-control » est souvent invoqué car il permet de conceptualiser l'interaction entre des informations sensorielles de différentes modalités à l'étage spinal. S'il peut traduire ces interactions sensorielles, le concept du « gate-control » ne renseigne pas sur les réseaux et le traitement de l'information dans la moelle épinière. En effet, le réseau hypothétique très simple proposé par Melzack & Wall ne correspond pas à la complexité de l'organisation des réseaux de la corne dorsale de la moelle épinière tels qu'ils sont connus aujourd'hui (voir Encadré 1 sur le « Gate-Control »).

### **Indications et efficacité de la stimulation médullaire**

Environ 34 000 stimulateurs de moelle épinière sont posés par an dans le monde, et les demandes de ce type d'approche par les patients ne cessent d'augmenter (Sdrulla et al.,

## Encadré 1

### Concept du Gate control

Dans une publication remarquable datant de 1965, Melzack et Wall ont proposé un ensemble d'hypothèses concernant les mécanismes mis en jeu dans l'élaboration de la douleur. Ces hypothèses sont souvent nommées *théories* par anglicisme.

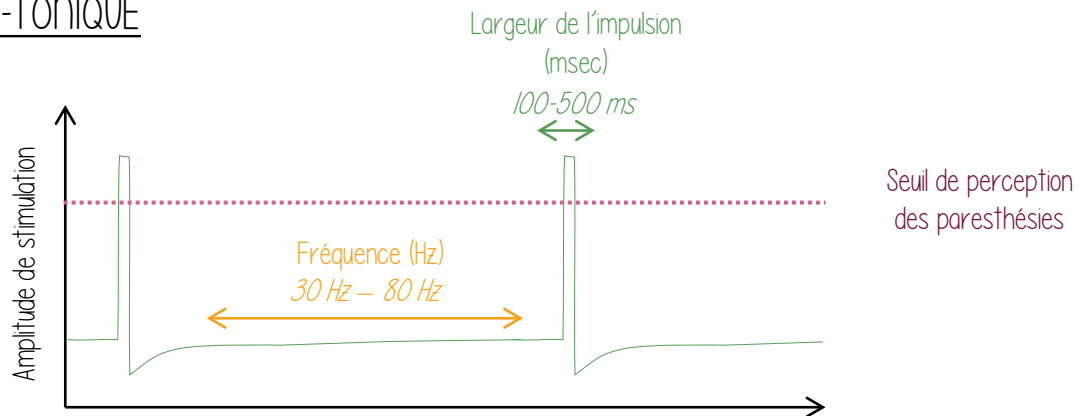
Leurs hypothèses ont été proposées comme une alternative à deux hypothèses qui apparaissaient alors mutuellement exclusives : la douleur comme résultant d'un **système sensoriel spécifique** (specificity theory) et la douleur comme résultant d'un **type d'activité** précis dans un système traitant également des informations non douloureuses (pattern theory). Les hypothèses de Melzack et Wall permettaient de concilier partiellement l'hypothèse du type d'activité avec certains éléments de l'hypothèse spécifique, et surtout permettaient de prendre en compte les observations cliniques de l'époque ainsi que ce qui était supposé de l'organisation des réseaux spinaux.

Parmi l'ensemble d'hypothèses formulées par Melzack et Wall, l'une traitait de la convergence entre des fibres afférentes de petit et de plus gros diamètre sur des neurones de projection de la moelle épinière. Dans cette hypothèse appelée contrôle du portillon (gate control), la balance entre les informations provenant des deux types de fibres était assurée par des interneurons de la lamina II inhibant présynaptiquement les afférences primaires. Ces interneurons hypothétiques assuraient alors le rôle de « portillon » : donnant la priorité aux informations provenant de l'un ou l'autre type de fibre selon leur activité respective.

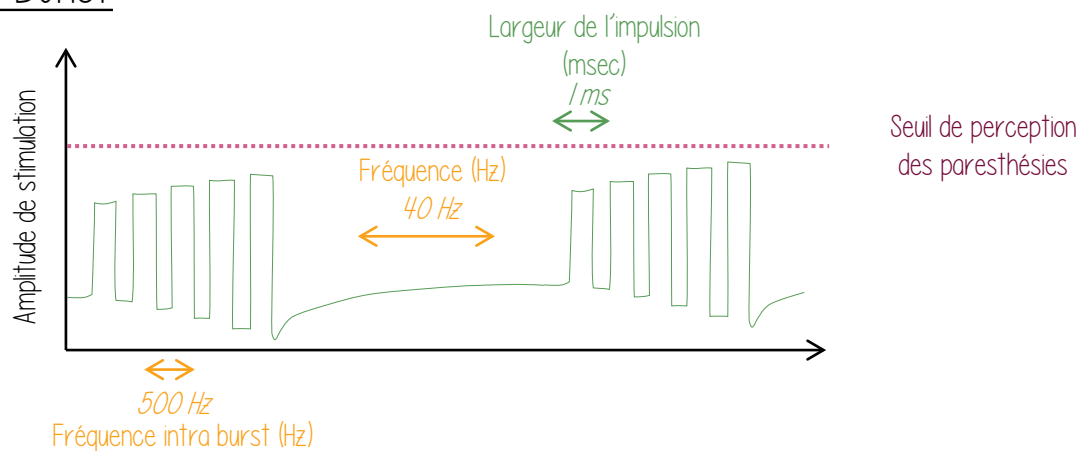
La composition et l'organisation des réseaux du système nociceptif spinal tels qu'ils sont compris aujourd'hui sont considérablement plus complexes et bien différents de ce que Melzack et Wall avaient proposé (Cordero-Erausquin et al., 2016; Peirs and Seal, 2016). Ainsi, nombre de prédictions découlant de l'hypothèse du gate control n'ont pas pu être vérifiées expérimentalement (Mendell, 2014).

Le concept du « gate control » ne permet donc pas d'éclairer sur la réalité des réseaux et du traitement de l'information dans la moelle épinière. Les données expérimentales actuelles indiquent que divers systèmes modulateurs contrôlent le gain de l'information nociceptive, de la périphérie jusqu'aux centres supraspinaux (Treede, 2016). Pourtant, même si il s'avère aujourd'hui inexact, le schéma conceptuel du réseau spinal de Melzack et Wall les a conduits à prédire les interactions entre les informations nociceptives, ce type d'interaction pouvant contribuer à l'effet de la TENS et la de la SCS.

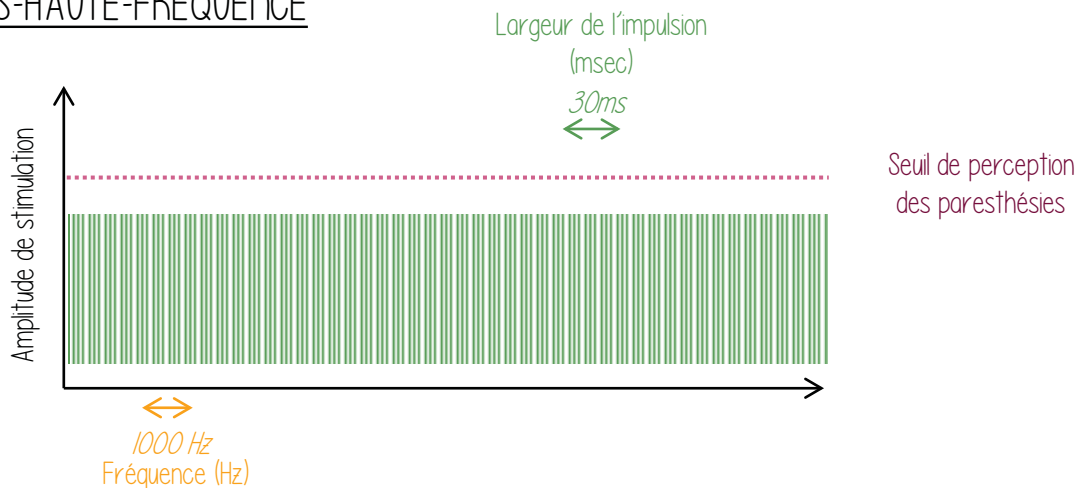
### A. SCS-TONIQUE



### B. SCS-BURST



### C. SCS-HAUTE-FREQUENCE



**Figure 1 : Les différents types de protocoles de stimulation médullaire**

**A.** La **SCS-Tonique** consiste en l'application en continu de stimulations d'une durée allant de **100-500 ms** à une fréquence de **30-80 Hz**. L'amplitude de stimulation utilisée lors de ce protocole de stimulation génère chez le patient des paresthésies. **B.** La **SCS-Burst** se caractérise par l'application de trains de 5 stimulations électriques de **1 ms** à **500 Hz** répétées à une fréquence de **40 Hz**. **C.** La **SCS-HF** se caractérise par une stimulation tonique à une fréquence supérieure à **1000 Hz**. La **SCS-Burst** et la **SCS-HF** sont des protocoles où la stimulation ne génère pas de paresthésies.

2018). La stimulation médullaire est utilisée dans le cas de différentes douleurs chroniques comme dans le cas du syndrome d'échec post chirurgical rachidien (*failed back surgery syndrome*), ou dans le cas de Syndrome Dououreux Régional Complexe (*complex regional pain syndrome*) (Kemler et al., 2000; Kumar et al., 2008). La SCS a également été jugée efficace pour diminuer les douleurs viscérales et celles résultant de maladies vasculaires périphériques (Deer et al., 2014). La SCS est moins efficace pour traiter les douleurs aiguës ou par excès de nociception (inflammatoire) que celles d'origine neuropathique. En effet, les douleurs neuropathiques chroniques d'origines périphériques sont les principales pathologies pour lesquelles ce type d'approche est utilisée (Lindblom and Meyerson, 1975; Linderoth and Meyerson, 2009). Cependant, ces dernières décennies, certaines études ont démontré que les SCS pouvaient soulager d'autres types de douleur, comme les douleurs ischémiques, celles consécutives à maladie artérielle occlusive périphérique, à des réactions angiospastiques ainsi que des douleurs d'angines de poitrine (Linderoth and Meyerson, 2009; Deer et al., 2014).

À la suite de la publication initiale de Shealy (Shealy et al., 1967), les indications de la stimulation médullaire se sont affinées, et l'effet antalgique de la SCS est désormais largement admis. A l'heure actuelle, environ 50% à 70% de patients estiment que la SCS soulage à plus de 50% leur ressenti douloureux (Kemler et al., 2000; Kumar et al., 2007, 2008; North et al., 2011; de Vos et al., 2014; Slangen et al., 2014; Deer et al., 2018).

### **Différents types de protocoles de stimulation médullaire**

Plusieurs protocoles distincts de stimulation sont utilisés en clinique. Ces protocoles diffèrent par leur amplitude, leur durée/largeur de stimulation, leur forme et leur fréquence de répétition **[FIGURE 1]**.

Les protocoles les plus classiques de SCS consistent à appliquer des stimulations d'une durée allant de 100 à 500 ms chacune, administrées en continu (**SCS-Tonique**) à une fréquence de 30-80 Hz. Habituellement, la durée et l'amplitude de stimulation sont ajustées pour dépasser les seuils sensoriels et déclencher des paresthésies (Meyerson and Linderoth, 2006; Shechter et al., 2013; Smits et al., 2013; Miller et al., 2016; Perruchoud and Mariotti, 2016; Joosten and Franken, 2020). Les territoires concernés par ces paresthésies sont d'ailleurs utilisés pour vérifier le bon placement des électrodes (Law and Miller, 1982). Chez certains patients, les paresthésies peuvent être considérées comme un effet secondaire et occasionner une gêne. Un des principaux effets secondaires de la SCS-Tonique est la survenue de paresthésies qui peuvent être gênantes pour le patient. En 2010, De Ridder et al. ont décrit un protocole qui réduit aussi bien, voir même mieux la douleur que le protocole Tonique et ce, sans induire de paresthésies (De Ridder et al., 2013). Cette nouvelle stimulation, appelé la « Burst Spinal Cord stimulation » (**SCS-Burst**), se caractérise par l'application de trains de stimulations électriques (5 stimulations de 1 ms à 500 Hz répétées 40 fois par secondes). De telles stimulations sont réputées moduler les voies de la douleur de manière plus spécifique que la SCS tonique avec notamment l'activation du cortex cingulaire antérieur (De Ridder et al., 2013). La stimulation sous forme de bouffées (burst) présente deux avantages par rapport à la SCS conventionnelle. D'une part, le soulagement de la douleur semble amélioré et d'autre par les paresthésies concomitantes sont réduites. Le fait que la stimulation par rafales ne déclenche pas de paresthésies est une avantage considérable, car ces dernières peuvent perturber le sommeil, être ressenties comme inconfortables et peuvent aussi varier en fonction de la position du corps (Ross and Abejón, 2014).

De nouveaux protocoles de stimulation ont été développés ces dernières années, comme par exemple la **SCS-HF** (haute fréquence). D'abord décrite dans un modèle animal en 2013 (Shechter et al., 2013) puis chez l'humain deux ans plus tard (Rapcan et al., 2015), elle se caractérise par un protocole de stimulation tonique à une fréquence supérieure à 1 kHz. Chaque stimulation de ce protocole est effectuée à une amplitude de 1-5 mA et dure 3 ms. Ces conditions de stimulation ne génèrent pas de paresthésies et diminuent l'intensité du ressenti douloureux de ~ 80% (Kapural et al., 2016). Outre cet incontestable avantage lié à l'absence de paresthésies, le gain de ce type de protocole en termes de soulagement n'est pas évident. Plusieurs études rapportent un soulagement similaire à différentes fréquences de stimulation en comparant la SCS-Tonique et la SCS-HFS dans des modèles animaux (Song et al., 2014), et en comparant des protocoles à 50 Hz, 1 kHz, et 10 kHz (Shechter et al., 2013) et des protocoles à 1, 4, 7 et 10 kHz (Thomson et al., 2018). Mais d'autres rapportent une amélioration en augmentant la fréquence de stimulation (Youn et al., 2015).

Ce nouveau protocole de SCS soulève de nombreuses questions (ainsi que des limites cliniques) : comment cette stimulation à haute fréquence arrive-t-elle à fournir un soulagement optimal de la douleur ? Cela pose également un défi technique, l'utilisation de stimulations à de telles fréquences engendrant une forte consommation d'énergie.

## **SITES ET MECANISMES D'ACTION DE LA SCS : LES HYPOTHESES**

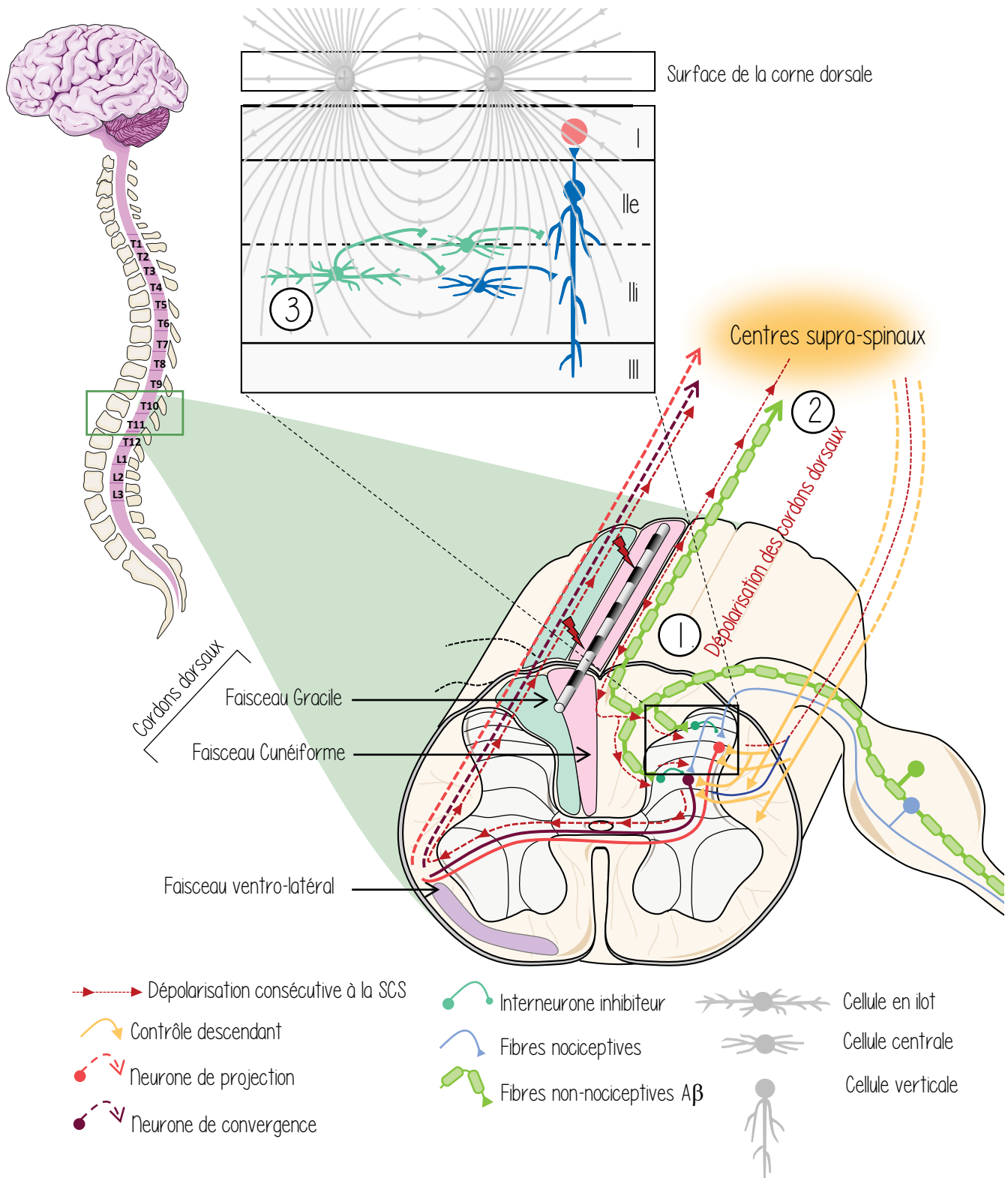
A de nombreux niveaux du système nociceptif, des nocicepteurs jusqu'aux centres supérieurs, des mécanismes modulant ou contrôlant le gain de l'information nociceptive ont été décrits (voir par exemple (Treede, 2016)). Certains de ces mécanismes intègrent également des informations non nociceptives et présentent des similarités avec le concept du « gate control ». Il est généralement admis que la SCS met en jeu de tels mécanismes contrôlant le gain de l'information nociceptive.

Il existe différentes hypothèses concernant les éléments cellulaires dont la stimulation est responsable de l'effet analgésique de la SCS. A ces hypothèses de cibles correspondent la mise en jeu de mécanismes modulateurs distincts qui ne sont pas mutuellement exclusifs. Nous présentons ici ces éléments et les mécanismes qui pourraient être recrutés par leur stimulation, ainsi que les données qui soutiennent leur implication (utilisant essentiellement de la SCS-tonique). Toutes les hypothèses impliquent plus ou moins directement une modulation du réseau spinal, mais une contribution additionnelle de mécanismes purement supraspinaux indépendants d'une modulation d'exerçant dans la corne dorsale de la moelle épinière ne peut être exclue.

La SCS est réalisée au moyen d'électrodes localisées à la surface dorsale de la moelle épinière. Puisque le courant électrique traversant le tissu décroît très fortement en fonction de la distance aux électrodes, les structures localisées à leur proximité sont les plus susceptibles d'être impliquées dans les effets observés.

Plusieurs éléments distincts du système nociceptif spinal sont directement localisés au voisinage des électrodes : les cordons dorsaux empruntés par les branches ascendantes des fibres afférentes A $\beta$  ; les racines dorsales empruntées par les fibres afférentes primaires projetant vers la moelle épinière ; les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière. Dans cette dernière, sont notamment localisées les terminaisons centrales des fibres sensorielles, des réseaux d'interneurones traitant les informations sensorielles, des





### Figure 2 : Principe et mécanismes d'action de la SCS

La SCS consiste à altérer le message nerveux avant que celui-ci soit interprété comme douloureux par le cortex cérébral. Des stimulations électriques sont délivrées par une électrode en titane insérée dans l'espace épidural. Plusieurs mécanismes pourraient être responsables de l'effet analgésique de la SCS. Dans cette figure, plusieurs hypothèses concernant les mécanismes sont illustrées. **La stimulation antidromique (1) et orthodromique des cordons dorsaux (2).** La stimulation des fibres afférentes des faisceau Gracile et Cunéiforme par la SCS peut évoquer des PA allant vers les centres supra-spinaux et vers les collatérales Aβ contactant les neurones de la CDME. **La stimulation directe de neurones de la corne dorsale (3),** notamment celle des cellules en îlot pourrait également représenter un des mécanismes d'action de la SCS. Figure adapté de Jensen, P et Brownstone, R. M., (2018) et de Joosten, E. A et Franken, G., (2020).

cellules gliales, des neurones projetant vers les centres supraspinaux et des afférences modulatrices provenant de centres supraspinaux nommés contrôles descendants.

### **Hypothèse de la stimulation des cordons dorsaux**

Initialement, la SCS était désignée sous les termes de *stimulation des cordons dorsaux* car il était présumé que la stimulation des fibres empruntant ces faisceaux pouvait avoir un effet analgésique. Ce présumé résultait notamment de la prédiction formulée par Melzack et Wall (1965, notre traduction) : « *Les implications thérapeutiques de [notre] modèle (...) suggèrent qu'un contrôle de la douleur pourrait être réalisé en influençant sélectivement les fibres rapides de gros diamètre* ». En effet, les cordons dorsaux sont majoritairement empruntés par les branches ascendantes des fibres afférentes primaires de type A $\beta$ , leur stimulation répond donc à cette prédiction.

Les cordons dorsaux sont directement localisés sous les électrodes de SCS et l'orientation rostrocaudale des fibres qui les empruntent est idéale pour une stimulation efficace par ces électrodes dont l'orientation est similaire. Tant sur le plan théorique que sur le plan pratique, les cordons dorsaux représentent donc la structure la plus évidente dont la stimulation pourrait être impliquée dans l'analgésie induite par la SCS (Dimitrijevic et al., 1980). Il faut noter qu'en théorie, les fibres qui pourraient être stimulées dans les cordons dorsaux sont relativement similaires à celles recrutées à faible intensité lors de stimulations des ganglions rachidiens ou des racines, également utilisées en clinique.

Dans l'hypothèse où la stimulation des cordons dorsaux sous-tendrait les effets analgésiques de la SCS, ces effets ne seraient pas forcément liés à une activation des fibres A $\beta$ . En effet, les cordons dorsaux sont également empruntés par des fibres non myélinisées chez le rat (Langford and Coggeshall, 1981) et chez l'homme (Saliani et al., 2017), et des études suggèrent que ces fibres non myélinisées pourraient transmettre des informations nociceptives et/ou participer au traitement de telles informations (Patterson et al., 1992).

Quelle que soit la nature exacte des fibres stimulées et du/des contrôles modulateurs mis en jeu, plusieurs études confirment le rôle majeur des cordons dorsaux dans l'effet analgésique de la SCS (Shealy et al., 1967; Barchini et al., 2012). Ceci est également en accord avec des observations chez le rat indiquant que l'allodynie et l'hyperalgésie étaient plus fortement inhibées lorsque la SCS était appliquée à un niveau où les fibres A $\beta$  sont dorso-latérales (segment T13), plutôt qu'à un niveau où elles sont plus ventrales et moins proches des électrodes (segment T11)(Smith and Deacon, 1984; Smith and Bennett, 1987).

L'activation des fibres afférentes empruntant les cordons dorsaux peut à la fois évoquer des potentiels d'action orthodromiques vers les centres supraspinaux et des potentiels d'action antidromiques vers les collatérales terminant dans corne dorsale, voire vers les terminaisons périphériques de ces fibres **[FIGURE 2]**.

### **Stimulation orthodromique des cordons dorsaux**

Dans le cas d'un rôle de l'activation orthodromique des fibres A $\beta$  des cordons dorsaux, celles-ci pourraient recruter des contrôles descendants projetant en retour vers les réseaux de la corne dorsale de la moelle épinière. Néanmoins, l'activation de structures supraspinales par les voies ascendantes n'est pas forcément le mécanisme le plus évident : la majorité des fibres A $\beta$  projettent vers d'autres étages spinaux et seules 15% d'entre elles atteignent le niveau cervical (Smith and Bennett, 1987). Le recrutement de contrôles descendants par la SCS est souvent considéré comme indiquant que l'effet de cette procédure implique la stimulation

orthodromique de fibres A $\beta$ . Une étude menée chez le rat indique que la SCS augmente l'activité dans le Locus Coeruleus, mais que paradoxalement ni l'inhibition de cette structure, ni le blocage des récepteurs de la noradrénaline dans la moelle épinière ne bloquent l'effet analgésique de la SCS (Song et al., 2013), suggérant que les contrôles descendants noradrénergiques ne sont pas impliqués. En revanche, dans un modèle de neuropathie, les rats répondants à la SCS présentent une augmentation de la concentration de sérotonine dans la corne dorsale de la moelle épinière lors des stimulations (Song et al., 2009) suggérant le recrutement de contrôles descendants sérotoninergiques. D'autres études indiquent un rôle au moins partiel du recrutement de contrôles descendants par stimulation orthodromique des cordons dorsaux. Par exemple, la SCS induit une activation indirecte du noyau prétectal antérieur qui est impliqué dans le recrutement de contrôles descendants inhibiteurs (Rees and Roberts, 1989). De plus, dans un modèle de neuropathie chez le rat, la stimulation directe des noyaux des cordons dorsaux au niveau du bulbe rachidien a un effet analgésique, même lorsque les cordons dorsaux sont lésés postérieurement à la stimulation (El-Khoury et al., 2002). Néanmoins, des travaux du même groupe indiquent que l'analgésie induite par la SCS ainsi que la durée de l'effet sont réduits de moitié lorsque les cordons dorsaux sont sectionnés en amont d'une stimulation au niveau thoracique (Barchini et al., 2012). Ceci indique que la stimulation orthodromique des cordons dorsaux est impliquée dans l'effet analgésique de la SCS, mais que d'autres mécanismes sont mis en jeu. Par ailleurs, les contrôles descendants pourraient également être recrutés dans le cas d'une stimulation directe des réseaux spinaux par la SCS et n'impliquent pas obligatoirement la stimulation de fibres A $\beta$ .

### **Stimulation antidromique des cordons dorsaux**

Les fibres afférentes empruntant les cordons dorsaux projettent des collatérales faisant synapse dans la moelle épinière. L'activation antidromique de ces fibres pourrait recruter des contrôles inhibiteurs du gain de l'information nociceptive présents dans différentes couches de la corne dorsale de la moelle épinière (Cordero-Erausquin et al., 2016; Peirs and Seal, 2016). Bien qu'elle soit réduite en durée et en amplitude, l'analgésie induite par la SCS persiste malgré la lésion des cordons dorsaux en amont du site de SCS (Barchini et al., 2012). De plus, l'effet inhibiteur de la SCS sur les neurones à convergence des couches profondes de la corne dorsale de la moelle épinière disparaît en grande partie lors d'une lésion en aval du site de stimulation (Yakhnista et al., 1998). Ces données indiquent que l'effet de la SCS implique au moins partiellement un effet local, segmentaire. Une telle inhibition du gain de l'information nociceptive au niveau spinal par stimulation des fibres A $\beta$  pourrait impliquer les contacts entre les collatérales A $\beta$  et des interneurons inhibiteurs de la corne dorsale de la moelle épinière. De tels contacts ont été mis en évidence dans la lamina II de la souris (Daniele and MacDermott, 2009). A leur tour, ces interneurons pourraient inhiber le transfert de l'information nociceptive provenant de fibres C et A $\delta$  dans la lamina II, mais également en diminuant l'activation à bas seuil des neurones de projection intégrant à la fois des informations nociceptives et non nociceptives (Torsney and MacDermott, 2006; Takazawa and MacDermott, 2010). Ceci est compatible avec des données indiquant que la SCS inhibe le réflexe de flexion à la chaleur ainsi que la réponse à la chaleur nociceptive médiée par les fibres C (Saadé et al., 1985; Marchand et al., 1991). Néanmoins, ces observations sont également compatibles avec une stimulation directe de neurones de la corne dorsale, notamment des interneurons inhibiteurs (voir plus bas et (Dubuisson, 1989; Baba et al., 1994)) **[FIGURE 2]**.

### **Problèmes de l'hypothèse de la stimulation des cordons dorsaux**

Certaines observations sont néanmoins difficiles à expliquer en invoquant simplement un effet de la SCS sur les cordons dorsaux. En effet, ces derniers comprennent le faisceau Gracile provenant des membres inférieurs et le faisceau Cunéiforme provenant des membres supérieurs. Vu le positionnement des électrodes, le recrutement des cordons dorsaux devrait se traduire par des paresthésies localisées dans les membres inférieurs à des intensités de stimulation plus faibles que celles induisant des paresthésies dans les membres antérieurs. Ceci n'est pourtant généralement pas observé (Jensen and Brownstone, 2019): lorsque l'amplitude de stimulation de la SCS est augmentée, les paresthésies apparaissent dans un premier temps bilatéralement dans les bras, avant de se propager plus caudalement (Meyerson, 1975). Par ailleurs, des expériences de modélisation suggèrent que les couches superficielles de la corne dorsale sont soumises à des densités de courant similaires ou supérieures à celles des cordons dorsaux lors de stimulations avec des électrodes monopolaires localisées sur la ligne médiane (Holsheimer, 1998). Bien que localisés au plus proche des électrodes, les cordons dorsaux ne seraient donc pas obligatoirement les éléments les plus stimulés.

Si l'effet de la SCS ne mettait en jeu que la stimulation des cordons dorsaux, cet effet devrait être peu sensible à un déplacement des électrodes dans l'axe antérieur, les cordons s'étendant dans le même axe. Pourtant, un effet optimal est obtenu lorsque les électrodes sont précisément localisées sur l'axe médian à l'étage médullaire concerné ((Law and Miller, 1982) et voir discussion dans Jensen and Brownstone (2019)).

Par ailleurs, la simple mise en jeu par les fibres A $\beta$  d'interneurones inhibant les informations nociceptives provenant des fibres C et A $\delta$  ne permet pas d'expliquer simplement pourquoi la SCS est relativement inefficace sur les douleurs inflammatoires alors qu'elle soulage les douleurs neuropathiques.

D'autre part, la persistance de l'analgésie après l'arrêt de la stimulation suggère la mise en place de phénomènes de plasticité plus complexes que le simple recrutement d'un contrôle inhibiteur du gain de l'information nociceptive ((Maeda et al., 2008; Guan et al., 2010), voir aussi plus bas § mise en jeu de phénomènes de plasticité).

### **Hypothèse de la stimulation directe d'afférences primaires (racines)**

Dans les racines dorsales, puis dans la moelle, les fibres afférentes primaires empruntant un trajet se rapprochant des électrodes de SCS ; ceci est particulièrement le cas pour les fibres A $\beta$  qui pénètrent dans la moelle plus médio-dorsalement que les autres. De plus, ces fibres A $\beta$  présentent seuil d'activation inférieur aux autres afférences, les rendant plus susceptibles d'être stimulées que celles faiblement ou non myélinisées. Le recrutement des fibres A $\beta$  par stimulation directe pourrait mettre en jeu les mêmes mécanismes que ceux présentés plus haut dans le cas de la stimulation des cordons dorsaux.

En plus des fibres A $\beta$ , des fibres C et A $\delta$  pourraient être costimulées. La stimulation de ces fibres à certaines fréquences pourrait recruter préférentiellement des réseaux inhibiteurs, notamment dans la lamina II (Cathenaut et al., 2021), ce qui pourrait paradoxalement réduire le gain de l'information nociceptive bien que des fibres nociceptives soient stimulées. De tels réseaux inhibiteurs recrutables à certaines fréquences pourraient également exister dans d'autres laminae (Chery and De Koninck, 2000; Schneider, 2008). Un tel mécanisme serait compatible avec l'implication de certains interneurones inhibiteurs de la lamina II dans l'effet

de la SCS, mais ces interneurons pourraient également être directement recrutés par la stimulation (voir plus bas).

Par ailleurs, il a également été montré que la SCS facilitait le phénomène de dépolarisation des fibres afférentes (Shimoji et al., 1982). Ce phénomène inhibe de manière présynaptique les afférences en les dépolarisant et en abaissant leur résistance membranaire. La SCS pourrait faciliter ce phénomène en stimulant directement les afférences et/ou en recrutant des réseaux spinaux ou des contrôles descendants.

Il faut noter que quelques études suggèrent que des changements au niveau de la moelle épinière peuvent avoir un impact au niveau périphérique. Par exemple, la stimulation des récepteurs A1 de l'adénosine dans moelle bloque l'accumulation des neutrophiles en périphérie lors d'inflammations (Bong et al., 1996). Puisque les effets de la SCS impliquent également ces récepteurs A1, un impact périphérique de cette procédure serait à rechercher (voir le § sur les neurotransmetteurs et neuromodulateurs impliqués).

### **Hypothèse de la mise en jeu directe de réseaux spinaux**

Des données cliniques soulignent l'importance de la localisation précise des électrodes de SCS à l'étage spinal concerné (Law and Miller, 1982). Ces données seraient compatibles avec un effet de la SCS impliquant au moins partiellement la stimulation des neurones et/ou des cellules gliales précisément localisés à l'étage concerné (Jensen and Brownstone, 2019). La corne dorsale de la moelle épinière comprend des réseaux contrôlant l'information nociceptive et notamment son gain. L'organisation de ces réseaux est extrêmement complexe et assez mal connue. De nombreux travaux indiquent que le fonctionnement de ces réseaux est modifié en conditions inflammatoires ou neuropathiques, notamment au niveau de leurs maillons inhibiteurs (Coull et al., 2003; Coull et al., 2005; Miraucourt et al., 2007; Peirs et al., 2014; Petitjean et al., 2015; Peirs and Seal, 2016). Ces réseaux peuvent être activés de manière naturelle par les fibres afférentes ou par les contrôles descendants. La majorité des études indique que la SCS recrute directement ou indirectement des éléments de ces réseaux. Par exemple, dans un modèle de douleur neuropathique, la SCS augmente la présence du marqueur d'activité c-fos dans les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (Smits et al., 2009), suggérant l'activation de ces neurones et l'éventuelle mise en jeu de mécanismes de plasticité par la SCS.

Il est généralement supposé que le recrutement des réseaux spinaux est indirect et implique la stimulation des afférences ou des contrôles descendants qui les contactent (voir plus haut). Plus récemment Jensen and Brownstone (2019) ont proposé que des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière, notamment des interneurons inhibiteurs, pouvaient être directement stimulés par la SCS. En effet, certains de ces interneurons comme les cellules en îlots ont une large arborisation dendritique rostrocaudale **[FIGURE 2]**. L'orientation parallèle des électrodes de SCS est idéale pour stimuler efficacement ces neurones, particulièrement lorsque la durée des stimulations est longue ((Stern et al., 2015), voir encadré « Effet des stimulations »).

Dans les laminae I-II, qui sont les plus proches des sites de stimulation, plusieurs réseaux inhibiteurs pouvant potentiellement réduire le gain de l'information nociceptive ont été décrits et pourraient être recrutés par des fibres afférentes C et A $\delta$  (Cordero-Erausquin et al., 2016; Peirs and Seal, 2016). Par exemple, dans la lamina II, l'un de ces réseaux met en jeu des interneurons inhibiteurs dont les synapses sont facilitées à des fréquences de stimulation de plusieurs dizaines de Hz, mais pas à des fréquences inférieures (Grudt and Perl, 2002; Lu and

## Encadré 2

### **Effet des stimulations électriques sur le tissu nerveux et paramètres de la SCS**

La stimulation médullaire est effectuée via un générateur qui délivre des charges électriques autour de l'électrode, créant ainsi un champ électrique local.

Les effets de telles stimulations pourront s'exercer sur les corps cellulaires, les synapses et axones traversés par le champ électrique (Miller et al., 2016). Ce champ peut changer le potentiel membranaire des éléments cellulaires traversés. Dans les neurones, des potentiels d'action peuvent être produits si la dépolarisation atteint leur seuil de déclenchement. Si la dépolarisation des axones est prolongée, les canaux dépendants du potentiel impliqués dans le potentiel d'action peuvent s'inactiver, ce qui conduit à un bloc de conduction.

L'amplitude de la dépolarisation des éléments cellulaires provoquée par la stimulation dépend de l'intensité et de la durée du courant, de la conductivité des tissus, de la résistance des électrodes, mais également de la distance entre les électrodes et ces éléments cellulaires, de leur diamètre, de leur degré de myélinisation, etc.

Par exemple, des stimulations de courte durée stimulent plus des petits éléments, et sont donc plus susceptibles de stimuler des axones que des dendrites. Par ailleurs, des éléments cellulaires dont l'orientation est parallèle à celle des électrodes sont plus efficacement stimulés.

Les protocoles de SCS diffèrent par leur amplitude, leur durée/largeur de stimulation, leur forme et leur fréquence de répétition [Figure 2]. L'amplitude, exprimée en mA, détermine l'étendue de la zone stimulée et influence donc le nombre de fibres et de corps cellulaires recrutés. L'intensité de stimulation est donc liée à celle des paresthésies, car des intensités plus fortes recrutent un territoire plus large du tissu nerveux. La durée ou largeur de la stimulation (ms,  $\mu$ s) est le temps durant lequel le courant est délivré pour une amplitude donnée. Ce paramètre joue sur le nombre d'éléments cellulaires recrutés ainsi que sur l'étendue des paresthésies associées. La fréquence quant à elle, est exprimée en hertz (Hz) et représente le nombre de stimulations par seconde. Par ailleurs, la résistance (ou impédance) de l'interface entre l'électrode et le tissu et celle du tissu lui-même peuvent jouer sur l'effet de la stimulation. Ces résistances peuvent changer selon la situation physiologique ou pathologique.

Perl, 2003, 2005; Cathenaut et al., 2021). Ces interneurons correspondent probablement aux cellules en îlot dont l'arborisation dendritique est très étendue dans l'axe rostrocaudal (Grudt and Perl, 2002; Lu and Perl, 2003). Un autre réseau inhibiteur pouvant être activé par les fibres A $\beta$  a été décrit dans la lamina II (Schoffnegger et al., 2006; Daniele and MacDermott, 2009) et pourrait potentiellement être recruté lors de stimulations de ces afférences par la SCS.

La SCS pourrait également recruter des neurones localisés dans les couches plus profondes de la corne dorsale de la moelle épinière. Ces couches comprennent de nombreux neurones à convergence intégrant des informations provenant de différents types de fibres sensorielles et certains de ces neurones à convergence sont des neurones de projection vers les centres supraspinaux (Cordero-Erausquin et al., 2016; Peirs and Seal, 2016). Ces neurones deviennent hyperexcitables en conditions neuropathiques, et la SCS réduit leur hyperexcitabilité et inhibe leur réponse à la stimulation des fibres C, tant chez des animaux témoins que neuropathiques (Yakhnitsa et al., 1999; Guan et al., 2010), indiquant la mise en jeu de contrôles inhibiteurs.

Outre les neurones, des cellules non neuronales comme les cellules gliales ou microgliales pourraient être impliquées dans les effets de la SCS, soit en étant directement stimulées soit en étant recrutées de manière secondaire. Par exemple, des études indiquent que la SCS change le niveau d'activation des cellules microgliales dans des modèles de neuropathie, soit en réduisant leur activation (Shinoda et al., 2020) ou en l'augmentant (Shu et al., 2020).

### **Neurotransmetteurs et neuromodulateurs impliqués dans les effets de la SCS**

La stimulation médullaire met en jeu des contrôles inhibiteurs au niveau spinal (voir plus haut). Ceci est compatible avec les données indiquant que la SCS augmente la libération de GABA spinal chez les animaux qui répondent bien à la procédure analgésique. Cette augmentation de concentration de GABA extracellulaire persiste après l'arrêt de la SCS, et est associée à une diminution de la concentration glutamate et d'aspartate extracellulaires (Baba et al., 1994; Stiller et al., 1996; Cui et al., 1997; Cui et al., 1998). De plus, les décours temporels de l'analgésie et de la diminution de l'hyperactivité des neurones à convergence des couches profondes sont similaires au décours temporel de l'élévation de GABA dans la corne dorsale lors de la SCS (Cui et al., 1997; Cui et al., 1998). L'augmentation de libération de GABA dans la corne dorsale induite par la SCS pourrait provenir de la stimulation directe des neurones et terminaisons GABAergiques, mais pourrait également résulter de l'excitation d'autres terminaisons localisées dans la moelle et libérant d'autres neurotransmetteurs et neuromodulateurs. En effet, dans la corne dorsale, la libération de GABA est par exemple potentialisée par la sérotonine, l'ATP, l'acétylcholine, la noradrénaline (pour acétylcholine et adrénaline : (Hugel and Schlichter, 2000; Song et al., 2008; Gassner et al., 2009; Zhang et al., 2009). La SCS augmente d'ailleurs la concentration de sérotonine au niveau de la moelle épinière de rats neuropathiques répondants à la procédure, et l'analgésie semble mettre en jeu des récepteurs GABA<sub>B</sub> (Song et al., 2009). L'augmentation de GABA extracellulaire, mais aussi d'adénosine, modulent l'inhibition au niveau spinal en agissant respectivement sur des récepteurs GABA<sub>B</sub> et A1. Ces récepteurs modulent de manière activité-dépendante les transmissions synaptiques inhibitrices à certaines synapses de la corne dorsale de la moelle épinière (Chery and De Koninck, 2000; Hugel and Schlichter, 2003; Cathenaut et al., 2021). L'effet analgésique de la SCS est potentialisé par l'injection intrathécale conjointe d'agonistes GABA<sub>B</sub> et A1 tandis qu'il est inhibé par les antagonistes de ces récepteurs (Cui et al., 1998;

Lind et al., 2004; Lind et al., 2008), indiquant le rôle important de ces récepteurs dans les effets de la SCS.

Le système opioïde endogène semble également mis en jeu par la SCS, mais uniquement lors de protocoles de stimulation à très basse fréquence (Sato et al., 2013).

Par ailleurs, certaines données suggèrent un rôle modulateur d'autres récepteurs sur les effets analgésiques de la SCS. Par exemple, l'application intrathécale de kétamine rend réceptifs à la SCS des rats qui ne l'étaient pas (Truin et al., 2011), suggérant une modulation par des récepteurs NMDA. Lors de SCS à basse fréquence, les endocannabinoïdes agissant sur des récepteurs CB1 seraient mis en jeu dans la réversion durable de l'hyperalgésie dans un modèle de douleur neuropathique (Sun et al., 2017).

Les effets de la SCS semblent donc mettre en jeu des tonus extracellulaires de GABA et d'adénosine et peuvent être modulés par différents types de récepteurs de neurotransmetteurs et neuromodulateurs.

### **Mise en jeu de mécanismes de plasticité à court- et long-terme par la SCS.**

L'intensité des informations nociceptives est codée sous forme de trains de potentiels d'action par les fibres afférentes primaires qui contactent les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (Adrian and Zotterman, 1926). L'intégration de telles informations codées en fréquence implique un type de **plasticité** particulier au décours temporel très court (de l'ordre de la milliseconde à quelques minutes), qui est qualifié de plasticité synaptique à court-terme (Buonomano, 2007). Des phénomènes de plasticité au décours temporel plus long (heure, jours ou plus) sont désignés sous le terme de plasticité synaptique à long terme. Dans des conditions physiologiques, ces phénomènes peuvent être mis en jeu en réponse à l'activité du réseau, mais ils pourraient également être mis en jeu par la stimulation médullaire. En effet, certains des mécanismes engagés par la stimulation médullaire impliquent des acteurs moléculaires et cellulaires mis en jeu lors ces plasticités. Par exemple, les récepteurs GABA<sub>B</sub> et A1 sont fortement impliqués dans la plasticité à court-terme dans la corne dorsale de la moelle épinière (Hugel and Schlichter, 2003; Cathenaut et al., 2021) ainsi que dans les effets analgésiques de la SCS (voir plus haut). Concernant la plasticité à long-terme, des études réalisées chez l'animal (Maeda et al., 2008; Guan et al., 2010) mais également chez l'humain (Moore et al., 2002; Kumar et al., 2007), ont montré que la durée de l'inhibition et de l'analgésie excédait celle de la SCS. De plus, chez certains patients, un soulagement prolongé est observé après plusieurs séances (Gybels and Kupers, 1987; Kumar et al., 2008). Ces résultats suggèrent la mise en place de mécanismes de plasticité consécutifs à la SCS. Il semblerait également que la SCS présente deux composantes : une à action immédiate et l'autre plus tardive. Guan *et al.* ont montré chez les rats neuropathiques que cette composante plus lente impliquerait une diminution de l'excitabilité des neurones à convergence (Guan et al., 2010). De plus, il semblerait que la SCS empêche le développement du phénomène de sensibilisation observé lors de stimulations répétées des fibres nociceptives (phénomène de Wind-up) (Guan et al., 2010).

### **Le type de SCS favoriserait certains mécanismes**

Les trois types de SCS diffèrent par leurs paramètres de stimulation. Des résultats récents suggèrent que chaque protocole favoriserait le recrutement de mécanismes différents tout en mettant en jeu des mécanismes communs.



Si les mécanismes impliqués dans la SCS-Tonique semblent complexes et ne font pas l'unanimité, ceux mis en jeu lors de la SCS-HF et SCS-Burst posent des questions supplémentaires quant à l'effet des hautes fréquences de stimulation sur le tissu nerveux. Concernant la SCS HF, l'une des premières hypothèses était qu'elle induisait un bloc de conduction dans les fibres des cordons dorsaux, notamment les fibres A $\beta$  (Kilgore and Bhadra, 2004, 2014), ce qui était cohérent avec certaines modélisations (Arle et al., 2016). Cette hypothèse est réfutée tant d'autres modélisations (Lempka et al., 2015), des expériences chez l'animal (Song et al., 2014; Crosby et al., 2017), que par des données cliniques indiquant que la fonction des fibres A $\beta$  n'est pas modifiée par la SCS-HF (cité sans référence dans Linderoth & Foreman 2017). Par ailleurs, la SCS à 4 et 60 Hz augmente l'expression du marqueur d'activation c-fos dans le noyau du raphé magnus et dans la corne dorsale alors que la SCS à 100 Hz ne l'augmente que dans la corne dorsale, suggérant que l'augmentation des fréquences de stimulation privilégierait un effet local (Maeda et al., 2009). Ces données suggèrent que le site d'action de la SCS-HF pourrait majoritairement s'exercer sur les réseaux de la corne dorsale de la moelle épinière.

Les mécanismes mis en jeu par la SCS-Burst semblent différer également de ceux mis en jeu lors de la SCS-tonique. Par exemple, la SCS-Burst ne semble pas activer les fibres A $\beta$  à la différence de la SCS-Tonique (Tang et al., 2014), ce qui pourrait suggérer un effet primaire segmentaire (local) de la SCS-Burst. Néanmoins, la SCS-Burst ne semble pas impliquer les récepteurs GABA<sub>B</sub> de la corne dorsale alors que ces récepteurs semblent très importants dans la composante segmentaire de la SCS-Tonique (Crosby et al., 2015). Les travaux de l'équipe de De Ridder indiquent que la SCS-Burst réduit la connectivité entre le cortex cingulaire antérieur dorsal et les structures corticales parahippocampiques mesurée par électroencéphalographie, alors que la SCS-tonique ne présente pas un tel effet (De Ridder and Vanneste, 2016). Des expériences chez le rat indiquent que la SCS-Burst affecte particulièrement les aires supra-spinales responsables du traitement des aspects cognitifs et motivationnels de la douleur chez le rat (Meuwissen et al., 2020). Ceci suggère que les effets analgésiques de la SCS-Burst pourraient résulter de la stimulation directe des réseaux spinaux d'une manière qui interférerait avec leur capacité à recruter des centres impliqués la perception douloureuse (Linderoth and Foreman, 2017).

Adrian ED, Zotterman Y (1926) The impulses produced by sensory nerve-endings: Part II. The response of a Single End-Organ. *The Journal of physiology* 61:151-171.

Arle JE, Mei L, Carlson KW, Shils JL (2016) High-Frequency Stimulation of Dorsal Column Axons: Potential Underlying Mechanism of Paresthesia-Free Neuropathic Pain Relief. *Neuromodulation : journal of the International Neuromodulation Society* 19:385-397.

Baba H, Yoshimura M, Nishi S, Shimoji K (1994) Synaptic responses of substantia gelatinosa neurons to dorsal column stimulation in rat spinal cord in vitro. *The Journal of physiology* 478 ( Pt 1):87-99.

Barchini J, Tchachaghian S, Shamaa F, Jabbur SJ, Meyerson BA, Song Z, Linderoth B, Saadé NE (2012) Spinal segmental and supraspinal mechanisms underlying the pain-relieving effects of spinal cord stimulation: an experimental study in a rat model of neuropathy. *Neuroscience* 215:196-208.

Baron R (2006) Mechanisms of disease: neuropathic pain--a clinical perspective. *Nat Clin Pract Neurol* 2:95-106.

- Bong GW, Rosengren S, Firestein GS (1996) Spinal cord adenosine receptor stimulation in rats inhibits peripheral neutrophil accumulation. The role of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Clin Invest* 98:2779-2785.
- Bouhassira D, Lanteri-Minet M, Attal N, Laurent B, Touboul C (2008) Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* 136:380-387.
- Buonomano DV (2007) The biology of time across different scales. *Nat Chem Biol* 3:594-597.
- Cathenaut L, Leonardon B, Kuster R, Inquimbert P, Schlichter R, Hugel S (2021) Inhibitory interneurons with differential plasticities at their connections tune excitatory/inhibitory balance in the spinal nociceptive system. *Pain*.
- Chery N, De Koninck Y (2000) GABA(B) receptors are the first target of released GABA at lamina I inhibitory synapses in the adult rat spinal cord. *Journal of neurophysiology* 84:1006-1011.
- Cordero-Erausquin M, Inquimbert P, Schlichter R, Hugel S (2016) Neuronal networks and nociceptive processing in the dorsal horn of the spinal cord. *Neuroscience* 338:230-247.
- 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 JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y (2005) BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438:1017-1021.
- Crosby ND, Janik JJ, Grill WM (2017) Modulation of activity and conduction in single dorsal column axons by kilohertz-frequency spinal cord stimulation. *Journal of neurophysiology* 117:136-147.
- Crosby ND, Weisshaar CL, Smith JR, Zeeman ME, Goodman-Keiser MD, Winkelstein BA (2015) Burst and Tonic Spinal Cord Stimulation Differentially Activate GABAergic Mechanisms to Attenuate Pain in a Rat Model of Cervical Radiculopathy. *IEEE transactions on bio-medical engineering* 62:1604-1613.
- Cui JG, Meyerson BA, Sollevi A, Linderoth B (1998) Effect of spinal cord stimulation on tactile hypersensitivity in mononeuropathic rats is potentiated by simultaneous GABA(B) and adenosine receptor activation. *Neuroscience letters* 247:183-186.
- Cui JG, O'Connor WT, Ungerstedt U, Linderoth B, Meyerson BA (1997) Spinal cord stimulation attenuates augmented dorsal horn release of excitatory amino acids in mononeuropathy via a GABAergic mechanism. *Pain* 73:87-95.
- Daniele CA, MacDermott AB (2009) Low-threshold primary afferent drive onto GABAergic interneurons in the superficial dorsal horn of the mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:686-695.
- De Ridder D, Vanneste S (2016) Burst and Tonic Spinal Cord Stimulation: Different and Common Brain Mechanisms. *Neuromodulation : journal of the International Neuromodulation Society* 19:47-59.
- De Ridder D, Plazier M, Kamerling N, Menovsky T, Vanneste S (2013) Burst spinal cord stimulation for limb and back pain. *World neurosurgery* 80:642-649.e641.
- de Vos CC, Meier K, Zaalberg PB, Nijhuis HJ, Duyvendak W, Vesper J, Enggaard TP, Lenders MW (2014) Spinal cord stimulation in patients with painful diabetic neuropathy: a multicentre randomized clinical trial. *Pain* 155:2426-2431.
- Deer T, Slavin KV, Amirdelfan K, North RB, Burton AW, Yearwood TL, Tavel E, Staats P, Falowski S, Pope J, Justiz R, Fabi AY, Taghva A, Paicius R, Houden T, Wilson D (2018) Success Using Neuromodulation With BURST (SUNBURST) Study: Results From a Prospective, Randomized Controlled Trial Using a Novel Burst Waveform. *Neuromodulation : journal of the International Neuromodulation Society* 21:56-66.
- Deer TR et al. (2014) The appropriate use of neurostimulation of the spinal cord and peripheral nervous system for the treatment of chronic pain and ischemic diseases: the

- Neuromodulation Appropriateness Consensus Committee. *Neuromodulation : journal of the International Neuromodulation Society* 17:515-550; discussion 550.
- Dimitrijevic MR, Faganel J, Sharkey PC, Sherwood AM (1980) Study of sensation and muscle twitch responses to spinal cord stimulation. *International rehabilitation medicine* 2:76-81.
- Dubuisson D (1989) Effect of dorsal-column stimulation on gelatinosa and marginal neurons of cat spinal cord. *Journal of neurosurgery* 70:257-265.
- Duchenne de Boulogne G-B (1861) *De l'électrisation localisée et de son application à la physiologie, à la pathologie et à la thérapeutique (2e édition) / par le Dr Duchenne, de Boulogne*. Paris.
- El-Khoury C, Hawwa N, Baliki M, Atweh SF, Jabbur SJ, Saadé NE (2002) Attenuation of neuropathic pain by segmental and supraspinal activation of the dorsal column system in awake rats. *Neuroscience* 112:541-553.
- Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, McNicol E, Baron R, Dworkin RH, Gilron I, Haanpaa M, Hansson P, Jensen TS, Kamerman PR, Lund K, Moore A, Raja SN, Rice AS, Rowbotham M, Sena E, Siddall P, Smith BH, Wallace M (2015) Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 14:162-173.
- Gassner M, Ruscheweyh R, Sandkühler J (2009) Direct excitation of spinal GABAergic interneurons by noradrenaline. *Pain* 145:204-210.
- Grudt TJ, Perl ER (2002) Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *The Journal of physiology* 540:189-207.
- Guan Y, Wacnik PW, Yang F, Carteret AF, Chung CY, Meyer RA, Raja SN (2010) Spinal cord stimulation-induced analgesia: electrical stimulation of dorsal column and dorsal roots attenuates dorsal horn neuronal excitability in neuropathic rats. *Anesthesiology* 113:1392-1405.
- Gybels J, Kupers R (1987) Central and peripheral electrical stimulation of the nervous system in the treatment of chronic pain. *Acta neurochirurgica Supplementum* 38:64-75.
- Holsheimer J (1998) Computer modelling of spinal cord stimulation and its contribution to therapeutic efficacy. *Spinal Cord* 36:531-540.
- Hugel S, Schlichter R (2000) Presynaptic P2X receptors facilitate inhibitory GABAergic transmission between cultured rat spinal cord dorsal horn neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:2121-2130.
- Hugel S, Schlichter R (2003) Convergent control of synaptic GABA release from rat dorsal horn neurones by adenosine and GABA autoreceptors. *The Journal of physiology* 551:479-489.
- Jensen MP, Brownstone RM (2019) Mechanisms of spinal cord stimulation for the treatment of pain: Still in the dark after 50 years. *European journal of pain (London, England)* 23:652-659.
- Joosten EA, Franken G (2020) Spinal cord stimulation in chronic neuropathic pain: mechanisms of action, new locations, new paradigms. *Pain* 161 Suppl 1:S104-S113.
- Kapur L, Yu C, Doust MW, Gliner BE, Vallejo R, Sitzman BT, Amirdeflan K, Morgan DM, Yearwood TL, Bundschu R, Yang T, Benyamin R, Burgher AH (2016) Comparison of 10-kHz High-Frequency and Traditional Low-Frequency Spinal Cord Stimulation for the Treatment of Chronic Back and Leg Pain: 24-Month Results From a Multicenter, Randomized, Controlled Pivotal Trial. *Neurosurgery* 79:667-677.
- Kemler MA, de Vet HC, Barendse GA, van den Wildenberg FA, van Kleef M (2008) Effect of spinal cord stimulation for chronic complex regional pain syndrome Type I: five-year final follow-up of patients in a randomized controlled trial. *Journal of neurosurgery* 108:292-298.
- Kemler MA, Barendse GA, van Kleef M, de Vet HC, Rijks CP, Furnee CA, van den Wildenberg FA (2000) Spinal cord stimulation in patients with chronic reflex sympathetic dystrophy. *N Engl J Med* 343:618-624.
- Kilgore KL, Bhadra N (2004) Nerve conduction block utilising high-frequency alternating current. *Medical & biological engineering & computing* 42:394-406.
- Kilgore KL, Bhadra N (2014) Reversible nerve conduction block using kilohertz frequency alternating current. *Neuromodulation : journal of the International Neuromodulation Society* 17:242-254; discussion 254-245.

- Kumar K, Taylor RS, Jacques L, Eldabe S, Meglio M, Molet J, Thomson S, O'Callaghan J, Eisenberg E, Milbouw G, Buchser E, Fortini G, Richardson J, North RB (2007) Spinal cord stimulation versus conventional medical management for neuropathic pain: a multicentre randomised controlled trial in patients with failed back surgery syndrome. *Pain* 132:179-188.
- Kumar K, Taylor RS, Jacques L, Eldabe S, Meglio M, Molet J, Thomson S, O'Callaghan J, Eisenberg E, Milbouw G, Buchser E, Fortini G, Richardson J, North RB (2008) The effects of spinal cord stimulation in neuropathic pain are sustained: a 24-month follow-up of the prospective randomized controlled multicenter trial of the effectiveness of spinal cord stimulation. *Neurosurgery* 63:762-770; discussion 770.
- Langford LA, Coggeshall RE (1981) Unmyelinated axons in the posterior funiculi. *Science* 211:176-177.
- Largus S (1528) de Compositionibus medicamentorum Liber unus, antehac nusquam excusus : Joanne Ruellio, doctore medico castigatore. Paris: Simon Silvius.
- Law JD, Miller LV (1982) Importance and documentation of an epidural stimulating position. *Applied neurophysiology* 45:461-464.
- Lempka SF, McIntyre CC, Kilgore KL, Machado AG (2015) Computational analysis of kilohertz frequency spinal cord stimulation for chronic pain management. *Anesthesiology* 122:1362-1376.
- Lind G, Meyerson BA, Winter J, Linderoth B (2004) Intrathecal baclofen as adjuvant therapy to enhance the effect of spinal cord stimulation in neuropathic pain: a pilot study. *European journal of pain (London, England)* 8:377-383.
- Lind G, Schechtmann G, Winter J, Meyerson BA, Linderoth B (2008) Baclofen-enhanced spinal cord stimulation and intrathecal baclofen alone for neuropathic pain: Long-term outcome of a pilot study. *European journal of pain (London, England)* 12:132-136.
- Lindblom U, Meyerson BA (1975) Influence on touch, vibration and cutaneous pain of dorsal column stimulation in man. *Pain* 1:257-270.
- Linderoth B, Meyerson BA (2009) Spinal cord stimulation; Techniques, indications and outcome. In: *Textbook of stereotactic and functional neurosurgery 2nd Edition* (A. M. Lozano PLGRRT, ed), p 3288. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag.
- Linderoth B, Foreman RD (2017) Conventional and Novel Spinal Stimulation Algorithms: Hypothetical Mechanisms of Action and Comments on Outcomes. *Neuromodulation : journal of the International Neuromodulation Society* 20:525-533.
- Lu Y, Perl ER (2003) A specific inhibitory pathway between substantia gelatinosa neurons receiving direct C-fiber input. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 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). *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:3900-3907.
- Maeda Y, Wacnik PW, Sluka KA (2008) Low frequencies, but not high frequencies of bi-polar spinal cord stimulation reduce cutaneous and muscle hyperalgesia induced by nerve injury. *Pain* 138:143-152.
- Maeda Y, Ikeuchi M, Wacnik P, Sluka KA (2009) Increased c-fos immunoreactivity in the spinal cord and brain following spinal cord stimulation is frequency-dependent. *Brain research* 1259:40-50.
- Marchand S, Bushnell MC, Molina-Negro P, Martinez SN, Duncan GH (1991) The effects of dorsal column stimulation on measures of clinical and experimental pain in man. *Pain* 45:249-257.
- Mazars G, Roge R, Mazars Y (1960) [Results of the stimulation of the spinothalamic fasciculus and their bearing on the physiopathology of pain]. *Revue neurologique* 103:136-138.
- Mazars G, Merienne L, Cioloca C (1974) [Treatment of certain types of pain with implantable thalamic stimulators]. *Neuro-Chirurgie* 20:117-124.
- Melzack R, Wall PD (1965) Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150:971-979.

- Meuwissen KPV, van der Toorn A, Gu JW, Zhang TC, Dijkhuizen RM, Joosten EAJ (2020) Active Recharge Burst and Tonic Spinal Cord Stimulation Engage Different Supraspinal Mechanisms: A Functional Magnetic Resonance Imaging Study in Peripherally Injured Chronic Neuropathic Rats. *Pain Pract* 20:510-521.
- Meyerson BA (1975) Proceedings: Dorsal column stimulation for chronic pain. Preliminary clinical results and physiological observations. *Acta Neurochir (Wien)* 31:264-265.
- Meyerson BA, Linderoth B (2006) Mode of action of spinal cord stimulation in neuropathic pain. *J Pain Symptom Manage* 31:S6-12.
- Miller JP, Eldabe S, Buchser E, Johanek LM, Guan Y, Linderoth B (2016) Parameters of Spinal Cord Stimulation and Their Role in Electrical Charge Delivery: A Review. *Neuromodulation : journal of the International Neuromodulation Society* 19:373-384.
- Miracourt LS, Dallel R, Voisin DL (2007) Glycine Inhibitory Dysfunction Turns Touch into Pain through PKCgamma Interneurons. *PLoS one* 2.
- 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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:6724-6731.
- North RB, Kumar K, Wallace MS, Henderson JM, Shipley J, Hernandez J, Mekel-Bobrov N, Jaax KN (2011) Spinal cord stimulation versus re-operation in patients with failed back surgery syndrome: an international multicenter randomized controlled trial (EVIDENCE study). *Neuromodulation : journal of the International Neuromodulation Society* 14:330-335; discussion 335-336.
- Paraf P (1948) Traitement des algies par les courants diadynamiques. *Bull Soc Med (Paris)* 65:114-115.
- Patterson JT, Chung K, Coggeshall RE (1992) Further evidence for the existence of long ascending unmyelinated primary afferent fibers within the dorsal funiculus: effects of capsaicin. *Pain* 49:117-120.
- Peirs C, Seal RP (2016) Neural circuits for pain: Recent advances and current views. *Science* 354:578-584.
- Peirs C, Patil S, Bouali-Benazzouz R, Artola A, Landry M, Dallel R (2014) Protein kinase C gamma interneurons in the rat medullary dorsal horn: distribution and synaptic inputs to these neurons, and subcellular localization of the enzyme. *J Comp Neurol* 522:393-413.
- Perruchoud C, Mariotti N (2016) [Spinal cord stimulation for the management of chronic pain]. *Revue medicale suisse* 12:1234-1237.
- Petitjean H, Pawlowski SA, Fraine SL, Sharif B, Hamad D, Fatima T, Berg J, Brown CM, Jan LY, Ribeiroda-Silva A, Braz JM, Basbaum AI, Sharif-Naeini R (2015) Dorsal Horn Parvalbumin Neurons Are Gate-Keepers of Touch-Evoked Pain after Nerve Injury. *Cell Rep* 13:1246-1257.
- Rapcan R, Mlaka J, Venglarcik M, Vinklerova V, Gajdos M, Illes R (2015) High-frequency - Spinal Cord Stimulation. *Bratislavske lekarske listy* 116:354-356.
- Rees H, Roberts MH (1989) Activation of cells in the anterior pretectal nucleus by dorsal column stimulation in the rat. *The Journal of physiology* 417:361-373.
- Ross E, Abejón D (2014) Improving patient experience with spinal cord stimulation: implications of position-related changes in neurostimulation. *Neuromodulation : journal of the International Neuromodulation Society* 17 Suppl 1:36-41.
- Saadé N, Atweh AF, Tabet MS, Jabbur SJ (1985) Inhibition of nociceptive withdrawal flexion reflexes through a dorsal column-brainstem-spinal loop. *Brain research* 335:306-308.
- Saliani A, Perraud B, Duval T, Stikov N, Rossignol S, Cohen-Adad J (2017) Axon and Myelin Morphology in Animal and Human Spinal Cord. *Frontiers in neuroanatomy* 11:129.
- Sato KL, King EW, Johanek LM, Sluka KA (2013) Spinal cord stimulation reduces hypersensitivity through activation of opioid receptors in a frequency-dependent manner. *European journal of pain (London, England)* 17:551-561.

- Schneider SP (2008) Local circuit connections between hamster laminae III and IV dorsal horn neurons. *Journal of neurophysiology* 99:1306-1318.
- Schoffnegger D, Heinke B, Sommer C, Sandkuhler J (2006) Physiological properties of spinal lamina II GABAergic neurons in mice following peripheral nerve injury. *The Journal of physiology* 577:869-878.
- Sdrulla AD, Guan Y, Raja SN (2018) Spinal Cord Stimulation: Clinical Efficacy and Potential Mechanisms. *Pain Pract* 18:1048-1067.
- Shealy CN, Mortimer JT, Reswick JB (1967) Electrical inhibition of pain by stimulation of the dorsal columns: preliminary clinical report. *Anesthesia and analgesia* 46:489-491.
- Shechter R, Yang F, Xu Q, Cheong YK, He SQ, Sdrulla A, Carteret AF, Wacnik PW, Dong X, Meyer RA, Raja SN, Guan Y (2013) Conventional and kilohertz-frequency spinal cord stimulation produces intensity- and frequency-dependent inhibition of mechanical hypersensitivity in a rat model of neuropathic pain. *Anesthesiology* 119:422-432.
- Shetter A (2009) Peripheral Nerve Stimulation for Neuropathic Pain. In: *Textbook of Stereotactic and Functional Neurosurgery* (Lozano AM GP, Tasker RR, ed), pp 2349-2357: Springer.
- Shimoji K, Shimizu H, Maruyama Y, Matsuki M, Kuribayashi H, Fujioka H (1982) Dorsal column stimulation in man: facilitation of primary afferent depolarization. *Anesthesia and analgesia* 61:410-413.
- Shinoda M, Fujita S, Sugawara S, Asano S, Koyama R, Fujiwara S, Soma K, Tamagawa T, Matsui T, Ikutame D, Ando M, Osada A, Kimura Y, Kobayashi K, Yamamoto T, Kusama-Eguchi K, Kobayashi M, Hayashi Y, Iwata K (2020) Suppression of Superficial Microglial Activation by Spinal Cord Stimulation Attenuates Neuropathic Pain Following Sciatic Nerve Injury in Rats. *International journal of molecular sciences* 21.
- Shu B, He SQ, Guan Y (2020) Spinal Cord Stimulation Enhances Microglial Activation in the Spinal Cord of Nerve-Injured Rats. *Neuroscience bulletin* 36:1441-1453.
- Slangen R, Schaper NC, Faber CG, Joosten EA, Dirksen CD, van Dongen RT, Kessels AG, van Kleef M (2014) Spinal cord stimulation and pain relief in painful diabetic peripheral neuropathy: a prospective two-center randomized controlled trial. *Diabetes Care* 37:3016-3024.
- Smith KJ, Bennett BJ (1987) Topographic and quantitative description of rat dorsal column fibres arising from the lumbar dorsal roots. *Journal of anatomy* 153:203-215.
- Smith MC, Deacon P (1984) Topographical anatomy of the posterior columns of the spinal cord in man. The long ascending fibres. *Brain : a journal of neurology* 107 ( Pt 3):671-698.
- Smits H, van Kleef M, Holsheimer J, Joosten EA (2013) Experimental spinal cord stimulation and neuropathic pain: mechanism of action, technical aspects, and effectiveness. *Pain Pract* 13:154-168.
- Smits H, Kleef MV, Honig W, Gerver J, Gobrecht P, Joosten EA (2009) Spinal cord stimulation induces c-Fos expression in the dorsal horn in rats with neuropathic pain after partial sciatic nerve injury. *Neuroscience letters* 450:70-73.
- Song Z, Meyerson BA, Linderoth B (2008) Muscarinic receptor activation potentiates the effect of spinal cord stimulation on pain-related behavior in rats with mononeuropathy. *Neuroscience letters* 436:7-12.
- Song Z, Ultenius C, Meyerson BA, Linderoth B (2009) Pain relief by spinal cord stimulation involves serotonergic mechanisms: an experimental study in a rat model of mononeuropathy. *Pain* 147:241-248.
- Song Z, Ansah OB, Meyerson BA, Pertovaara A, Linderoth B (2013) Exploration of supraspinal mechanisms in effects of spinal cord stimulation: role of the locus coeruleus. *Neuroscience* 253:426-434.
- Song Z, Viisanen H, Meyerson BA, Pertovaara A, Linderoth B (2014) Efficacy of kilohertz-frequency and conventional spinal cord stimulation in rat models of different pain conditions. *Neuromodulation : journal of the International Neuromodulation Society* 17:226-234; discussion 234-225.

- Stern S, Agudelo-Toro A, Rotem A, Moses E, Neef A (2015) Chronaxie Measurements in Patterned Neuronal Cultures from Rat Hippocampus. *PloS one* 10:e0132577.
- Stiller CO, Cui JG, O'Connor WT, Brodin E, Meyerson BA, Linderoth B (1996) Release of gamma-aminobutyric acid in the dorsal horn and suppression of tactile allodynia by spinal cord stimulation in mononeuropathic rats. *Neurosurgery* 39:367-374; discussion 374-365.
- Sun L, Tai L, Qiu Q, Mitchell R, Fleetwood-Walker S, Joosten EA, Cheung CW (2017) Endocannabinoid activation of CB1 receptors contributes to long-lasting reversal of neuropathic pain by repetitive spinal cord stimulation. *European journal of pain (London, England)* 21:804-814.
- Takazawa T, MacDermott AB (2010) Synaptic pathways and inhibitory gates in the spinal cord dorsal horn. *Ann N Y Acad Sci* 1198:153-158.
- Tang R, Martinez M, Goodman-Keiser M, Farber JP, Qin C, Foreman RD (2014) Comparison of burst and tonic spinal cord stimulation on spinal neural processing in an animal model. *Neuromodulation : journal of the International Neuromodulation Society* 17:143-151.
- Thomson SJ, Tavakkolizadeh M, Love-Jones S, Patel NK, Gu JW, Bains A, Doan Q, Moffitt M (2018) Effects of Rate on Analgesia in Kilohertz Frequency Spinal Cord Stimulation: Results of the PROCO Randomized Controlled Trial. *Neuromodulation : journal of the International Neuromodulation Society* 21:67-76.
- Torsney C, MacDermott AB (2006) Disinhibition opens the gate to pathological pain signaling in superficial neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:1833-1843.
- Treede RD (2016) Gain control mechanisms in the nociceptive system. *Pain* 157:1199-1204.
- Truin M, Janssen SP, van Kleef M, Joosten EA (2011) Successful pain relief in non-responders to spinal cord stimulation: the combined use of ketamine and spinal cord stimulation. *European journal of pain (London, England)* 15:1049.e1041-1049.
- Tsoucalas G, Karamanou M, Lymperi M, Gennimata V, Androutsos G (2014) The "torpedo" effect in medicine. *Int Marit Health* 65:65-67.
- Visnjevac O, Costandi S, Patel BA, Azer G, Agarwal P, Bolash R, Mekhail NA (2017) A Comprehensive Outcome-Specific Review of the Use of Spinal Cord Stimulation for Complex Regional Pain Syndrome. *Pain Pract* 17:533-545.
- Voirin J, Rigoard P, Fontaine D (2020) Stimulation médullaire : une thérapie efficace face à certaines douleurs chroniques mais ignorée. *Doleurs : Évaluation - Diagnostic - Traitement* 21:11-19.
- Wall PD, Sweet WH (1967) Temporary abolition of pain in man. *Science* 155:108-109.
- Yakhnista VA, Linderoth B, Meyerson BA (1998) Modulation of dorsal horn neuronal activity by spinal cord stimulation in a rat model of neuropathy: The role of the dorsal funicles. *Neurophysiology* 30:424-427.
- Yakhnitsa V, Linderoth B, Meyerson BA (1999) Spinal cord stimulation attenuates dorsal horn neuronal hyperexcitability in a rat model of mononeuropathy. *Pain* 79:223-233.
- Youn Y, Smith H, Morris B, Argoff C, Pilitsis JG (2015) The Effect of High-Frequency Stimulation on Sensory Thresholds in Chronic Pain Patients. *Stereotactic and functional neurosurgery* 93:355-359.
- Zhang HM, Chen SR, Cai YQ, Richardson TE, Driver LC, Lopez-Berestein G, Pan HL (2009) Signaling mechanisms mediating muscarinic enhancement of GABAergic synaptic transmission in the spinal cord. *Neuroscience* 158:1577-1588.

# BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, L. F., & Regehr, W. G. (2004). Synaptic computation. *Nature*, *431*(7010), 796-803. doi:10.1038/nature03010
- Abraira, V. E., Kuehn, E. D., Chirila, A. M., Springel, M. W., Toliver, A. A., Zimmerman, A. L., . . . Ginty, D. D. (2017). The Cellular and Synaptic Architecture of the Mechanosensory Dorsal Horn. *Cell*, *168*(1-2), 295-310 e219. doi:10.1016/j.cell.2016.12.010
- Adrian, E. D. (1920). The recovery process of excitable tissues: Part I. *J Physiol*, *54*(1-2), 1-31. doi:10.1113/jphysiol.1920.sp001905
- Adrian, E. D., & Zotterman, Y. (1926). The impulses produced by sensory nerve endings: Part 3. Impulses set up by Touch and Pressure. *J Physiol*, *61*(4), 465-483. doi:10.1113/jphysiol.1926.sp002308
- Ahmadi, S., Lippross, S., Neuhuber, W. L., & Zeilhofer, H. U. (2002). PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. *Nat Neurosci*, *5*(1), 34-40. doi:10.1038/nn778
- Alba-Delgado, C., El Khoueiry, C., Peirs, C., Dallel, R., Artola, A., & Antri, M. (2015). Subpopulations of PKCgamma interneurons within the medullary dorsal horn revealed by electrophysiologic and morphologic approach. *Pain*, *156*(9), 1714-1728. doi:10.1097/j.pain.0000000000000221
- Almarestani, L., Waters, S. M., Krause, J. E., Bennett, G. J., & Ribeiro-da-Silva, A. (2007). Morphological characterization of spinal cord dorsal horn lamina I neurons projecting to the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol*, *504*(3), 287-297. doi:10.1002/cne.21410
- Alvarez, F. J., Villalba, R. M., Carr, P. A., Grandes, P., & Somohano, P. M. (2000). Differential distribution of metabotropic glutamate receptors 1a, 1b, and 5 in the rat spinal cord. *J Comp Neurol*, *422*(3), 464-487. doi:10.1002/1096-9861(20000703)422:3<464::aid-cne11>3.0.co;2-#
- Andrew, D., & Greenspan, J. D. (1999). Peripheral coding of tonic mechanical cutaneous pain: comparison of nociceptor activity in rat and human psychophysics. *J Neurophysiol*, *82*(5), 2641-2648. doi:10.1152/jn.1999.82.5.2641
- Antal, M., Freund, T. F., & Polgar, E. (1990). Calcium-binding proteins, parvalbumin- and calbindin-D 28k-immunoreactive neurons in the rat spinal cord and dorsal root ganglia: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol*, *295*(3), 467-484. doi:10.1002/cne.902950310
- Anwar, H., Li, X., Bucher, D., & Nadim, F. (2017). Functional roles of short-term synaptic plasticity with an emphasis on inhibition. *Curr Opin Neurobiol*, *43*, 71-78. doi:10.1016/j.conb.2017.01.002
- Araque, A., Carmignoto, G., & Haydon, P. G. (2001). Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol*, *63*, 795-813. doi:10.1146/annurev.physiol.63.1.795
- Artola, A., Voisin, D., & Dallel, R. (2020). PKCgamma interneurons, a gateway to pathological pain in the dorsal horn. *J Neural Transm (Vienna)*, *127*(4), 527-540. doi:10.1007/s00702-020-02162-6
- Audinat, E., & Arnoux, I. (2014). [Microglia: immune cells sculpting and controlling neuronal synapses]. *Med Sci (Paris)*, *30*(2), 153-159. doi:10.1051/medsci/20143002012



- Baba, H., Doubell, T. P., & Woolf, C. J. (1999). Peripheral inflammation facilitates Abeta fiber-mediated synaptic input to the substantia gelatinosa of the adult rat spinal cord. *J Neurosci*, *19*(2), 859-867.
- Baba, H., Yoshimura, M., Nishi, S., & Shimoji, K. (1994). Synaptic responses of substantia gelatinosa neurones to dorsal column stimulation in rat spinal cord in vitro. *J Physiol*, *478* ( Pt 1), 87-99. doi:10.1113/jphysiol.1994.sp020232
- Bao, J., Reim, K., & Sakaba, T. (2010). Target-dependent feedforward inhibition mediated by short-term synaptic plasticity in the cerebellum. *J Neurosci*, *30*(24), 8171-8179. doi:10.1523/JNEUROSCI.0276-10.2010
- Barber, R. P., Vaughn, J. E., Saito, K., McLaughlin, B. J., & Roberts, E. (1978). GABAergic terminals are presynaptic to primary afferent terminals in the substantia gelatinosa of the rat spinal cord. *Brain Res*, *141*(1), 35-55. doi:10.1016/0006-8993(78)90615-7
- Barnard, E. A., Skolnick, P., Olsen, R. W., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., . . . Langer, S. Z. (1998). International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev*, *50*(2), 291-313.
- Bartley, A. F., & Dobrunz, L. E. (2015). Short-term plasticity regulates the excitation/inhibition ratio and the temporal window for spike integration in CA1 pyramidal cells. *Eur J Neurosci*, *41*(11), 1402-1415. doi:10.1111/ejn.12898
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, *139*(2), 267-284. doi:10.1016/j.cell.2009.09.028
- Basmore, A. W., Elliot, K. A., & Florey, E. (1957). Isolation of factor I. *J Neurochem*, *1*(4), 334-339. doi:10.1111/j.1471-4159.1957.tb12090.x
- Beierlein, M., Gibson, J. R., & Connors, B. W. (2003). Two dynamically distinct inhibitory networks in layer 4 of the neocortex. *J Neurophysiol*, *90*(5), 2987-3000. doi:10.1152/jn.00283.2003
- Ben-Ari, Y., Khalilov, I., Kahle, K. T., & Cherubini, E. (2012). The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. *Neuroscientist*, *18*(5), 467-486. doi:10.1177/1073858412438697
- Benke, D., Zemoura, K., & Maier, P. J. (2012). Modulation of cell surface GABA(B) receptors by desensitization, trafficking and regulated degradation. *World J Biol Chem*, *3*(4), 61-72. doi:10.4331/wjbc.v3.i4.61
- Bennett, G. J., Abdelmoumene, M., Hayashi, H., & Dubner, R. (1980). Physiology and morphology of substantia gelatinosa neurons intracellularly stained with horseradish peroxidase. *J Comp Neurol*, *194*(4), 809-827. doi:10.1002/cne.901940407
- Bessou, P., & Perl, E. R. (1969). Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *J Neurophysiol*, *32*(6), 1025-1043. doi:10.1152/jn.1969.32.6.1025
- Beyer, C., Roberts, L. A., & Komisaruk, B. R. (1985). Hyperalgesia induced by altered glycinergic activity at the spinal cord. *Life Sci*, *37*(9), 875-882. doi:10.1016/0024-3205(85)90523-5
- Bicknell, H. R., Jr., & Beal, J. A. (1984). Axonal and dendritic development of substantia gelatinosa neurons in the lumbosacral spinal cord of the rat. *J Comp Neurol*, *226*(4), 508-522. doi:10.1002/cne.902260406
- Boakye, P. A., Schmidt, E. K. A., Rancic, V., Kerr, B., Ballanyi, K., & Smith, P. A. (2018). Characterization of Superficial Dorsal Horn Neurons from "Tamamaki" Mice and Stability of their GAD67-EGFP Phenotype in Defined-Medium Organotypic Culture. *Neuroscience*, *372*, 126-140. doi:10.1016/j.neuroscience.2017.12.047
- Bohlhalter, S., Weinmann, O., Mohler, H., & Fritschy, J. M. (1996). Laminal compartmentalization of GABAA-receptor subtypes in the spinal cord: an immunohistochemical study. *J Neurosci*, *16*(1), 283-297.

- Bong, G. W., Rosengren, S., & Firestein, G. S. (1996). Spinal cord adenosine receptor stimulation in rats inhibits peripheral neutrophil accumulation. The role of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Clin Invest*, *98*(12), 2779-2785. doi:10.1172/JCI119104
- Borghi, V., Przewlocka, B., Labuz, D., Maj, M., Ilona, O., & Pavone, F. (2002). Formalin-induced pain and mu-opioid receptor density in brain and spinal cord are modulated by A1 and A2a adenosine agonists in mice. *Brain Res*, *956*(2), 339-348. doi:10.1016/s0006-8993(02)03568-0
- Bormann, J. (1988). Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes. *Trends Neurosci*, *11*(3), 112-116. doi:10.1016/0166-2236(88)90156-7
- Bowery, N. (1989). GABAB receptors and their significance in mammalian pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*, *10*(10), 401-407. doi:10.1016/0165-6147(89)90188-0
- Bowery, N. G. (2006). GABAB receptor: a site of therapeutic benefit. *Curr Opin Pharmacol*, *6*(1), 37-43. doi:10.1016/j.coph.2005.10.002
- Bowery, N. G., Hill, D. R., & Hudson, A. L. (1983). Characteristics of GABAB receptor binding sites on rat whole brain synaptic membranes. *Br J Pharmacol*, *78*(1), 191-206. doi:10.1111/j.1476-5381.1983.tb09380.x
- Boyes, J., & Bolam, J. P. (2003). The subcellular localization of GABA(B) receptor subunits in the rat substantia nigra. *Eur J Neurosci*, *18*(12), 3279-3293. doi:10.1111/j.1460-9568.2003.03076.x
- Boyle, K. A., Gradwell, M. A., Yasaka, T., Dickie, A. C., Polgar, E., Ganley, R. P., . . . Hughes, D. I. (2019). Defining a Spinal Microcircuit that Gates Myelinated Afferent Input: Implications for Tactile Allodynia. *Cell Rep*, *28*(2), 526-540 e526. doi:10.1016/j.celrep.2019.06.040
- Bradesi, S. (2010). Role of spinal cord glia in the central processing of peripheral pain perception. *Neurogastroenterol Motil*, *22*(5), 499-511. doi:10.1111/j.1365-2982.2010.01491.x
- Braz, J., Solorzano, C., Wang, X., & Basbaum, A. I. (2014). Transmitting pain and itch messages: a contemporary view of the spinal cord circuits that generate gate control. *Neuron*, *82*(3), 522-536. doi:10.1016/j.neuron.2014.01.018
- Braz, J. M., & Basbaum, A. I. (2009). Triggering genetically-expressed transneuronal tracers by peripheral axotomy reveals convergent and segregated sensory neuron-spinal cord connectivity. *Neuroscience*, *163*(4), 1220-1232. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.07.051
- Brennan, P. M., & Whittle, I. R. (2008). Intrathecal baclofen therapy for neurological disorders: a sound knowledge base but many challenges remain. *Br J Neurosurg*, *22*(4), 508-519. doi:10.1080/02688690802233364
- Brown, S. J., James, S., Reddington, M., & Richardson, P. J. (1990). Both A1 and A2a purine receptors regulate striatal acetylcholine release. *J Neurochem*, *55*(1), 31-38. doi:10.1111/j.1471-4159.1990.tb08817.x
- Buonomano, D. V. (2000). Decoding temporal information: A model based on short-term synaptic plasticity. *J Neurosci*, *20*(3), 1129-1141.
- Bushnell, M. C., Ceko, M., & Low, L. A. (2013). Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*, *14*(7), 502-511. doi:10.1038/nrn3516
- Butcher, S. P., Bullock, R., Graham, D. I., & McCulloch, J. (1990). Correlation between amino acid release and neuropathologic outcome in rat brain following middle cerebral artery occlusion. *Stroke*, *21*(12), 1727-1733. doi:10.1161/01.str.21.12.1727
- Cain, D. M., Khasabov, S. G., & Simone, D. A. (2001). Response properties of mechanoreceptors and nociceptors in mouse glabrous skin: an in vivo study. *J Neurophysiol*, *85*(4), 1561-1574. doi:10.1152/jn.2001.85.4.1561

- Calakos, N., Schoch, S., Sudhof, T. C., & Malenka, R. C. (2004). Multiple roles for the active zone protein RIM1 alpha in late stages of neurotransmitter release. *Neuron*, *42*(6), 889-896. doi:10.1016/j.neuron.2004.05.014
- Calver, A. R., Medhurst, A. D., Robbins, M. J., Charles, K. J., Evans, M. L., Harrison, D. C., . . . Pangalos, M. N. (2000). The expression of GABA(B1) and GABA(B2) receptor subunits in the cNS differs from that in peripheral tissues. *Neuroscience*, *100*(1), 155-170. doi:10.1016/s0306-4522(00)00262-1
- Campero, M., Serra, J., & Ochoa, J. L. (1996). C-polymodal nociceptors activated by noxious low temperature in human skin. *J Physiol*, *497* ( Pt 2), 565-572. doi:10.1113/jphysiol.1996.sp021789
- Carew, T. J., Castellucci, V. F., & Kandel, E. R. (1971). An analysis of dishabituation and sensitization of the gill-withdrawal reflex in Aplysia. *Int J Neurosci*, *2*(2), 79-98. doi:10.3109/00207457109146995
- Castro-Lopes, J. M., Tavares, I., Tolle, T. R., Coito, A., & Coimbra, A. (1992). Increase in GABAergic Cells and GABA Levels in the Spinal Cord in Unilateral Inflammation of the Hindlimb in the Rat. *Eur J Neurosci*, *4*(4), 296-301. doi:10.1111/j.1460-9568.1992.tb00877.x
- Castro, A. R., Pinto, M., Lima, D., & Tavares, I. (2004). Nociceptive spinal neurons expressing NK1 and GABAB receptors are located in lamina I. *Brain Res*, *1003*(1-2), 77-85. doi:10.1016/j.brainres.2003.12.027
- Castro, A. R., Pinto, M., Lima, D., & Tavares, I. (2005). Imbalance between the expression of NK1 and GABAB receptors in nociceptive spinal neurons during secondary hyperalgesia: a c-Fos study in the monoarthritic rat. *Neuroscience*, *132*(4), 905-916. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.01.048
- Chance, F. S., Nelson, S. B., & Abbott, L. F. (1998). Synaptic depression and the temporal response characteristics of V1 cells. *J Neurosci*, *18*(12), 4785-4799.
- Charles, K. J., Deuchars, J., Davies, C. H., & Pangalos, M. N. (2003). GABA B receptor subunit expression in glia. *Mol Cell Neurosci*, *24*(1), 214-223. doi:10.1016/s1044-7431(03)00162-3
- Charlet, A., Lasbennes, F., Darbon, P., & Poisbeau, P. (2008). Fast non-genomic effects of progesterone-derived neurosteroids on nociceptive thresholds and pain symptoms. *Pain*, *139*(3), 603-609. doi:10.1016/j.pain.2008.06.016
- Chen, C., Blitz, D. M., & Regehr, W. G. (2002). Contributions of receptor desensitization and saturation to plasticity at the retinogeniculate synapse. *Neuron*, *33*(5), 779-788. doi:10.1016/s0896-6273(02)00611-6
- Chen, S. R., & Pan, H. L. (2003). Spinal GABAB receptors mediate antinociceptive actions of cholinergic agents in normal and diabetic rats. *Brain Res*, *965*(1-2), 67-74. doi:10.1016/s0006-8993(02)04123-9
- Cherubini, E., & Conti, F. (2001). Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends Neurosci*, *24*(3), 155-162. doi:10.1016/s0166-2236(00)01724-0
- Chery, N., & de Koninck, Y. (1999). Junctional versus extrajunctional glycine and GABA(A) receptor-mediated IPSCs in identified lamina I neurons of the adult rat spinal cord. *J Neurosci*, *19*(17), 7342-7355.
- Chery, N., & De Koninck, Y. (2000). GABA(B) receptors are the first target of released GABA at lamina I inhibitory synapses in the adult rat spinal cord. *J Neurophysiol*, *84*(2), 1006-1011. doi:10.1152/jn.2000.84.2.1006
- Choca, J. I., Green, R. D., & Proudfit, H. K. (1988a). Adenosine A1 and A2 receptors of the substantia gelatinosa are located predominantly on intrinsic neurons: an autoradiography study. *J Pharmacol Exp Ther*, *247*(2), 757-764.

- Choca, J. I., Green, R. D., & Proudfit, H. K. (1988b). Adenosine a-1 and a-2 Receptors of the Substantia Gelatinosa Are Located Predominantly on Intrinsic Neurons, an Autoradiography Study. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *247*(2), 757-764.
- Christensen, B. N., & Perl, E. R. (1970). Spinal neurons specifically excited by noxious or thermal stimuli: marginal zone of the dorsal horn. *J Neurophysiol*, *33*(2), 293-307. doi:10.1152/jn.1970.33.2.293
- Chung, J. M., Surmeier, D. J., Lee, K. H., Sorkin, L. S., Honda, C. N., Tsong, Y., & Willis, W. D. (1986). Classification of primate spinothalamic and somatosensory thalamic neurons based on cluster analysis. *J Neurophysiol*, *56*(2), 308-327. doi:10.1152/jn.1986.56.2.308
- Coderre, T. J. (1993). The role of excitatory amino acid receptors and intracellular messengers in persistent nociception after tissue injury in rats. *Mol Neurobiol*, *7*(3-4), 229-246. doi:10.1007/BF02769177
- Coppi, E., Cherchi, F., Fusco, I., Failli, P., Vona, A., Dettori, I., . . . Pugliese, A. M. (2019). Adenosine A3 receptor activation inhibits pronociceptive N-type Ca<sup>2+</sup> currents and cell excitability in dorsal root ganglion neurons. *Pain*, *160*(5), 1103-1118. doi:10.1097/j.pain.0000000000001488
- Cordero-Erausquin, M., Inquimbert, P., Schlichter, R., & Hugel, S. (2016). Neuronal networks and nociceptive processing in the dorsal horn of the spinal cord. *Neuroscience*, *338*, 230-247. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.08.048
- Coull, J. A., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., . . . De Koninck, Y. (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*, *438*(7070), 1017-1021. doi:10.1038/nature04223
- Coull, J. A., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S. A., Nault, F., Sik, A., . . . De Koninck, Y. (2003). Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature*, *424*(6951), 938-942. doi:10.1038/nature01868
- Coull, J. A. M., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S. A., Nault, F., Sik, A., . . . De Koninck, Y. (2003). Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature*, *424*(6951), 938-942. doi:10.1038/nature01868
- Craig, A. D. (2000). The functional anatomy of lamina I and its role in post-stroke central pain. *Prog Brain Res*, *129*, 137-151. doi:10.1016/S0079-6123(00)29010-9
- Cui, J. G., Meyerson, B. A., Sollevi, A., & Linderoth, B. (1998). Effect of spinal cord stimulation on tactile hypersensitivity in mononeuropathic rats is potentiated by simultaneous GABA(B) and adenosine receptor activation. *Neurosci Lett*, *247*(2-3), 183-186. doi:10.1016/s0304-3940(98)00324-3
- Cui, J. G., O'Connor, W. T., Ungerstedt, U., Linderoth, B., & Meyerson, B. A. (1997). Spinal cord stimulation attenuates augmented dorsal horn release of excitatory amino acids in mononeuropathy via a GABAergic mechanism. *Pain*, *73*(1), 87-95. doi:10.1016/s0304-3959(97)00077-8
- Cui, J. G., Sollevi, A., Linderoth, B., & Meyerson, B. A. (1997). Adenosine receptor activation suppresses tactile hypersensitivity and potentiates spinal cord stimulation in mononeuropathic rats. *Neurosci Lett*, *223*(3), 173-176. doi:10.1016/s0304-3940(97)13435-8
- Cui, L., Kim, Y. R., Kim, H. Y., Lee, S. C., Shin, H. S., Szabo, G., . . . Kim, S. J. (2011). Modulation of synaptic transmission from primary afferents to spinal substantia gelatinosa neurons by group III mGluRs in GAD65-EGFP transgenic mice. *J Neurophysiol*, *105*(3), 1102-1111. doi:10.1152/jn.00108.2010

- Cutting, D. A., & Jordan, C. C. (1975). Alternative Approaches to Analgesia - Baclofen as a Model Compound. *British Journal of Pharmacology*, *54*(2), 171-179. doi:DOI 10.1111/j.1476-5381.1975.tb06926.x
- Dahlhaus, A., Ruscheweyh, R., & Sandkuhler, J. (2005). Synaptic input of rat spinal lamina I projection and unidentified neurones in vitro. *J Physiol*, *566*(Pt 2), 355-368. doi:10.1113/jphysiol.2005.088567
- Dai, Q. X., Huang, L. P., Mo, Y. C., Yu, L. N., Du, W. W., Zhang, A. Q., . . . Yan, M. (2020). Role of spinal adenosine A1 receptors in the analgesic effect of electroacupuncture in a rat model of neuropathic pain. *J Int Med Res*, *48*(4), 300060519883748. doi:10.1177/0300060519883748
- de Groat, W. C., Nadelhaft, I., Milne, R. J., Booth, A. M., Morgan, C., & Thor, K. (1981). Organization of the sacral parasympathetic reflex pathways to the urinary bladder and large intestine. *J Auton Nerv Syst*, *3*(2-4), 135-160. doi:10.1016/0165-1838(81)90059-x
- Dean, C., & Dresbach, T. (2006). Neuroligins and neurexins: linking cell adhesion, synapse formation and cognitive function. *Trends Neurosci*, *29*(1), 21-29. doi:10.1016/j.tins.2005.11.003
- deGroat, W. C., Nadelhaft, I., Morgan, C., & Schauble, T. (1979). The central origin of efferent pathways in the carotid sinus nerve of the cat. *Science*, *205*(4410), 1017-1018. doi:10.1126/science.472721
- Diana, M. A., Levenes, C., Mackie, K., & Marty, A. (2002). Short-term retrograde inhibition of GABAergic synaptic currents in rat Purkinje cells is mediated by endogenous cannabinoids. *J Neurosci*, *22*(1), 200-208.
- Dickie, A. C., Bell, A. M., Iwagaki, N., Polgar, E., Gutierrez-Mecinas, M., Kelly, R., . . . Todd, A. J. (2019). Morphological and functional properties distinguish the substance P and gastrin-releasing peptide subsets of excitatory interneuron in the spinal cord dorsal horn. *Pain*, *160*(2), 442-462. doi:10.1097/j.pain.0000000000001406
- Dickie, A. C., McCormick, B., Lukito, V., Wilson, K. L., & Torsney, C. (2017). Inflammatory Pain Reduces C Fiber Activity-Dependent Slowing in a Sex-Dependent Manner, Amplifying Nociceptive Input to the Spinal Cord. *J Neurosci*, *37*(27), 6488-6502. doi:10.1523/JNEUROSCI.3816-16.2017
- DiGregorio, D. A., Rothman, J. S., Nielsen, T. A., & Silver, R. A. (2007). Desensitization properties of AMPA receptors at the cerebellar mossy fiber granule cell synapse. *J Neurosci*, *27*(31), 8344-8357. doi:10.1523/JNEUROSCI.2399-07.2007
- Dittman, J. S., & Regehr, W. G. (1998). Calcium dependence and recovery kinetics of presynaptic depression at the climbing fiber to Purkinje cell synapse. *J Neurosci*, *18*(16), 6147-6162.
- Djoughri, L., & Lawson, S. N. (2004). A-beta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res Brain Res Rev*, *46*(2), 131-145. doi:10.1016/j.brainresrev.2004.07.015
- Dodge, F. A., Jr., & Rahamimoff, R. (1967). Co-operative action a calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction. *J Physiol*, *193*(2), 419-432. doi:10.1113/jphysiol.1967.sp008367
- Doussau, F., Humeau, Y., Benfenati, F., & Poulain, B. (2010). A novel form of presynaptic plasticity based on the fast reactivation of release sites switched off during low-frequency depression. *J Neurosci*, *30*(49), 16679-16691. doi:10.1523/JNEUROSCI.3644-09.2010

- Draguhn, A., Verdorn, T. A., Ewert, M., Seeburg, P. H., & Sakmann, B. (1990). Functional and molecular distinction between recombinant rat GABAA receptor subtypes by Zn<sup>2+</sup>. *Neuron*, 5(6), 781-788. doi:10.1016/0896-6273(90)90337-f
- Drake, C. T., Terman, G. W., Simmons, M. L., Milner, T. A., Kunkel, D. D., Schwartzkroin, P. A., & Chavkin, C. (1994). Dynorphin opioids present in dentate granule cells may function as retrograde inhibitory neurotransmitters. *J Neurosci*, 14(6), 3736-3750.
- Draper-Joyce, C. J., Bhola, R., Wang, J., Bhattarai, A., Nguyen, A. T. N., Cowie-Kent, I., . . . Christopoulos, A. (2021). Positive allosteric mechanisms of adenosine A1 receptor-mediated analgesia. *Nature*. doi:10.1038/s41586-021-03897-2
- Duan, B., Cheng, L., Bourane, S., Britz, O., Padilla, C., Garcia-Campmany, L., . . . Ma, Q. (2014). Identification of spinal circuits transmitting and gating mechanical pain. *Cell*, 159(6), 1417-1432. doi:10.1016/j.cell.2014.11.003
- Dubin, A. E., & Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest*, 120(11), 3760-3772. doi:10.1172/JCI42843
- Dunwiddie, T. V., Diao, L., Kim, H. O., Jiang, J. L., & Jacobson, K. A. (1997). Activation of hippocampal adenosine A3 receptors produces a desensitization of A1 receptor-mediated responses in rat hippocampus. *J Neurosci*, 17(2), 607-614.
- Dunwiddie, T. V., & Masino, S. A. (2001). The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 24, 31-55. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.31
- Dutar, P., & Nicoll, R. A. (1988). Pre- and postsynaptic GABAB receptors in the hippocampus have different pharmacological properties. *Neuron*, 1(7), 585-591. doi:10.1016/0896-6273(88)90108-0
- Eaton, M. J., Plunkett, J. A., Martinez, M. A., Lopez, T., Karmally, S., Cejas, P., & Whitemore, S. R. (1999). Transplants of neuronal cells bioengineered to synthesize GABA alleviate chronic neuropathic pain. *Cell Transplant*, 8(1), 87-101. doi:10.1177/096368979900800102
- Engel, D., Schmitz, D., Gloveli, T., Frahm, C., Heinemann, U., & Draguhn, A. (1998). Laminar difference in GABA uptake and GAT-1 expression in rat CA1. *J Physiol*, 512 ( Pt 3), 643-649. doi:10.1111/j.1469-7793.1998.643bd.x
- Engle, M. P., Merrill, M. A., Marquez De Prado, B., & Hammond, D. L. (2012). Spinal nerve ligation decreases gamma-aminobutyric acidB receptors on specific populations of immunohistochemically identified neurons in L5 dorsal root ganglion of the rat. *J Comp Neurol*, 520(8), 1663-1677. doi:10.1002/cne.23005
- Ernst, M., Brauchart, D., Boesch, S., & Sieghart, W. (2003). Comparative modeling of GABA(A) receptors: limits, insights, future developments. *Neuroscience*, 119(4), 933-943. doi:10.1016/s0306-4522(03)00288-4
- Ferrini, F., Perez-Sanchez, J., Ferland, S., Lorenzo, L. E., Godin, A. G., Plasencia-Fernandez, I., . . . De Koninck, Y. (2020). Differential chloride homeostasis in the spinal dorsal horn locally shapes synaptic metaplasticity and modality-specific sensitization. *Nat Commun*, 11(1), 3935. doi:10.1038/s41467-020-17824-y
- Fiebich, B. L., Biber, K., Gyufko, K., Berger, M., Bauer, J., & van Calker, D. (1996). Adenosine A2b receptors mediate an increase in interleukin (IL)-6 mRNA and IL-6 protein synthesis in human astrogloma cells. *J Neurochem*, 66(4), 1426-1431. doi:10.1046/j.1471-4159.1996.66041426.x
- Fields, H. (2004). State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci*, 5(7), 565-575. doi:10.1038/nrn1431
- Fleischer, E., Handwerker, H. O., & Joukhadar, S. (1983). Unmyelinated nociceptive units in two skin areas of the rat. *Brain Res*, 267(1), 81-92. doi:10.1016/0006-8993(83)91041-7

- Forsythe, I. D., Tsujimoto, T., Barnes-Davies, M., Cuttle, M. F., & Takahashi, T. (1998). Inactivation of presynaptic calcium current contributes to synaptic depression at a fast central synapse. *Neuron*, *20*(4), 797-807. doi:10.1016/s0896-6273(00)81017-x
- Foster, E., Wildner, H., Tudeau, L., Haueter, S., Ralvenius, W. T., Jegen, M., . . . Zeilhofer, H. U. (2015). Targeted ablation, silencing, and activation establish glycinergic dorsal horn neurons as key components of a spinal gate for pain and itch. *Neuron*, *85*(6), 1289-1304. doi:10.1016/j.neuron.2015.02.028
- Foster, K. A., Kreitzer, A. C., & Regehr, W. G. (2002). Interaction of postsynaptic receptor saturation with presynaptic mechanisms produces a reliable synapse. *Neuron*, *36*(6), 1115-1126. doi:10.1016/s0896-6273(02)01106-6
- Gagnon, M., Bergeron, M. J., Lavertu, G., Castonguay, A., Tripathy, S., Bonin, R. P., . . . De Koninck, Y. (2013). Chloride extrusion enhancers as novel therapeutics for neurological diseases. *Nat Med*, *19*(11), 1524-1528. doi:10.1038/nm.3356
- Galan, A., Laird, J. M. A., & Cervero, F. (2004). In vivo recruitment by painful stimuli of AMPA receptor subunits to the plasma membrane of spinal cord neurons. *Pain*, *112*(3), 315-323. doi:10.1016/j.pain.2004.09.011
- Galvez, T., Urwyler, S., Prezeau, L., Mosbacher, J., Joly, C., Malitschek, B., . . . Pin, J. P. (2000). Ca(2+) requirement for high-affinity gamma-aminobutyric acid (GABA) binding at GABA(B) receptors: involvement of serine 269 of the GABA(B)R1 subunit. *Mol Pharmacol*, *57*(3), 419-426. doi:10.1124/mol.57.3.419
- Gao, Y. J., & Ji, R. R. (2010). Light touch induces ERK activation in superficial dorsal horn neurons after inflammation: involvement of spinal astrocytes and JNK signaling in touch-evoked central sensitization and mechanical allodynia. *J Neurochem*, *115*(2), 505-514. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06946.x
- Gebhart, G. F. (2004). Descending modulation of pain. *Neurosci Biobehav Rev*, *27*(8), 729-737. doi:10.1016/j.neubiorev.2003.11.008
- Geiger, J. D., LaBella, F. S., & Nagy, J. I. (1984). Characterization and localization of adenosine receptors in rat spinal cord. *J Neurosci*, *4*(9), 2303-2310.
- Gessi, S., Merighi, S., Stefanelli, A., Fazzi, D., Varani, K., & Borea, P. A. (2013). A(1) and A(3) adenosine receptors inhibit LPS-induced hypoxia-inducible factor-1 accumulation in murine astrocytes. *Pharmacol Res*, *76*, 157-170. doi:10.1016/j.phrs.2013.08.002
- Glickfeld, L. L., Roberts, J. D., Somogyi, P., & Scanziani, M. (2009). Interneurons hyperpolarize pyramidal cells along their entire somatodendritic axis. *Nat Neurosci*, *12*(1), 21-23. doi:10.1038/nn.2230
- Glitsch, M., Llano, I., & Marty, A. (1996). Glutamate as a candidate retrograde messenger at interneurone-Purkinje cell synapses of rat cerebellum. *J Physiol*, *497* ( Pt 2), 531-537. doi:10.1113/jphysiol.1996.sp021786
- Gobel, S. (1975). Golgi studies in the substantia gelatinosa neurons in the spinal trigeminal nucleus. *J Comp Neurol*, *162*(3), 397-415. doi:10.1002/cne.901620308
- Gobel, S. (1978). Golgi studies of the neurons in layer I of the dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis). *J Comp Neurol*, *180*(2), 375-393. doi:10.1002/cne.901800212
- Gobel, S., & Falls, W. M. (1979). Anatomical observations of horseradish peroxidase-filled terminal primary axonal arborizations in layer II of the substantia gelatinosa of Rolando. *Brain Res*, *175*(2), 335-340. doi:10.1016/0006-8993(79)91012-6
- Goldman, N., Chen, M., Fujita, T., Xu, Q., Peng, W., Liu, W., . . . Nedergaard, M. (2010). Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture. *Nat Neurosci*, *13*(7), 883-888. doi:10.1038/nn.2562
- Goodman, R. R., & Synder, S. H. (1982). Autoradiographic localization of adenosine receptors in rat brain using [3H]cyclohexyladenosine. *J Neurosci*, *2*(9), 1230-1241.

- Gradwell, M. A., Boyle, K. A., Browne, T. J., Bell, A. M., Leonardo, J., Peralta Reyes, F. S., . . . Graham, B. A. (2021). Diversity of inhibitory and excitatory parvalbumin interneuron circuits in the dorsal horn. *Pain*. doi:10.1097/j.pain.0000000000002422
- Graham, B. A., Brichta, A. M., & Callister, R. J. (2007). Moving from an averaged to specific view of spinal cord pain processing circuits. *J Neurophysiol*, *98*(3), 1057-1063. doi:10.1152/jn.00581.2007
- Grant, G., & Ygge, J. (1981). Somatotopic organization of the thoracic spinal nerve in the dorsal horn demonstrated with transganglionic degeneration. *J Comp Neurol*, *202*(3), 357-364. doi:10.1002/cne.902020305
- Grudt, T. J., & Henderson, G. (1998). Glycine and GABAA receptor-mediated synaptic transmission in rat substantia gelatinosa: inhibition by mu-opioid and GABAB agonists. *J Physiol*, *507* ( Pt 2), 473-483. doi:10.1111/j.1469-7793.1998.473bt.x
- Grudt, T. J., & Perl, E. R. (2002). Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *J Physiol*, *540*(Pt 1), 189-207.
- Guirimand, F., & Le Bars, D. (1996). [Physiology of nociception]. *Ann Fr Anesth Reanim*, *15*(7), 1048-1079. doi:10.1016/S0750-7658(96)89477-9
- Guntz, E., Dumont, H., Pastijn, E., d'Exaerde Ade, K., Azdad, K., Sosnowski, M., . . . Gall, D. (2008). Expression of adenosine A<sub>2A</sub> receptors in the rat lumbar spinal cord and implications in the modulation of N-methyl-d-aspartate receptor currents. *Anesth Analg*, *106*(6), 1882-1889. doi:10.1213/ane.0b013e318173251f
- Haefely, W., Kulcsar, A., Mohler, H., Pieri, L., Polc, P., & Schaffner, R. (1975). Possible involvement of GABA in the central actions of benzodiazepines. *Adv Biochem Psychopharmacol*(14), 131-151.
- Hallermann, S., Fejtova, A., Schmidt, H., Weyhersmuller, A., Silver, R. A., Gundelfinger, E. D., & Eilers, J. (2010). Bassoon speeds vesicle reloading at a central excitatory synapse. *Neuron*, *68*(4), 710-723. doi:10.1016/j.neuron.2010.10.026
- Hallermann, S., Kittel, R. J., Wichmann, C., Weyhersmuller, A., Fouquet, W., Mertel, S., . . . Heckmann, M. (2010). Naked dense bodies provoke depression. *J Neurosci*, *30*(43), 14340-14345. doi:10.1523/JNEUROSCI.2495-10.2010
- Hammond, D. L., & Drower, E. J. (1984). Effects of intrathecally administered THIP, baclofen and muscimol on nociceptive threshold. *Eur J Pharmacol*, *103*(1-2), 121-125. doi:10.1016/0014-2999(84)90197-3
- Han, Z. S., Zhang, E. T., & Craig, A. D. (1998). Nociceptive and thermoreceptive lamina I neurons are anatomically distinct. *Nat Neurosci*, *1*(3), 218-225. doi:10.1038/665
- Handwerker, H. O., Anton, F., & Reeh, P. W. (1987). Discharge patterns of afferent cutaneous nerve fibers from the rat's tail during prolonged noxious mechanical stimulation. *Exp Brain Res*, *65*(3), 493-504. doi:10.1007/BF00235972
- Handwerker, H. O., & Kopal, G. (1993). Psychophysiology of experimentally induced pain. *Physiol Rev*, *73*(3), 639-671. doi:10.1152/physrev.1993.73.3.639
- Hao, J. X., Xu, X. J., & Wiesenfeld-Hallin, Z. (1994). Intrathecal gamma-aminobutyric acidB (GABAB) receptor antagonist CGP 35348 induces hypersensitivity to mechanical stimuli in the rat. *Neurosci Lett*, *182*(2), 299-302. doi:10.1016/0304-3940(94)90821-4
- Haring, M., Zeisel, A., Hochgerner, H., Rinwa, P., Jakobsson, J. E. T., Lonnerberg, P., . . . Ernfors, P. (2018). Neuronal atlas of the dorsal horn defines its architecture and links sensory input to transcriptional cell types. *Nat Neurosci*, *21*(6), 869-880. doi:10.1038/s41593-018-0141-1
- Haydon, P. G. (2001). GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci*, *2*(3), 185-193. doi:10.1038/35058528



- Heine, M., Groc, L., Frischknecht, R., Beique, J. C., Lounis, B., Rumbaugh, G., . . . Choquet, D. (2008). Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission. *Science*, *320*(5873), 201-205. doi:10.1126/science.1152089
- Heinke, B., Ruscheweyh, R., Forsthuber, L., Wunderbaldinger, G., & Sandkuhler, J. (2004). Physiological, neurochemical and morphological properties of a subgroup of GABAergic spinal lamina II neurones identified by expression of green fluorescent protein in mice. *J Physiol*, *560*(Pt 1), 249-266. doi:10.1113/jphysiol.2004.070540
- Hosie, A. M., Clarke, L., da Silva, H., & Smart, T. G. (2009). Conserved site for neurosteroid modulation of GABA A receptors. *Neuropharmacology*, *56*(1), 149-154. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.07.050
- Hosie, A. M., Wilkins, M. E., da Silva, H. M., & Smart, T. G. (2006). Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature*, *444*(7118), 486-489. doi:10.1038/nature05324
- Hosie, A. M., Wilkins, M. E., & Smart, T. G. (2007). Neurosteroid binding sites on GABA(A) receptors. *Pharmacol Ther*, *116*(1), 7-19. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.03.011
- Hosli, E., & Hosli, L. (1990). Evidence for GABAB-receptors on cultured astrocytes of rat CNS: autoradiographic binding studies. *Exp Brain Res*, *80*(3), 621-625. doi:10.1007/BF00228002
- Hosli, L., Hosli, E., Redle, S., Rojas, J., & Schramek, H. (1990). Action of baclofen, GABA and antagonists on the membrane potential of cultured astrocytes of rat spinal cord. *Neurosci Lett*, *117*(3), 307-312. doi:10.1016/0304-3940(90)90682-y
- Hosoi, N., Sakaba, T., & Neher, E. (2007). Quantitative analysis of calcium-dependent vesicle recruitment and its functional role at the calyx of Held synapse. *J Neurosci*, *27*(52), 14286-14298. doi:10.1523/JNEUROSCI.4122-07.2007
- Huang, J., Polgar, E., Solinski, H. J., Mishra, S. K., Tseng, P. Y., Iwagaki, N., . . . Hoon, M. A. (2018). Circuit dissection of the role of somatostatin in itch and pain. *Nat Neurosci*, *21*(5), 707-716. doi:10.1038/s41593-018-0119-z
- Huberfeld, G., Wittner, L., Clemenceau, S., Baulac, M., Kaila, K., Miles, R., & Rivera, C. (2007). Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*, *27*(37), 9866-9873. doi:10.1523/JNEUROSCI.2761-07.2007
- Hugel, S., Kadiri, N., Rodeau, J. L., Gaillard, S., & Schlichter, R. (2012). pH-dependent inhibition of native GABA(A) receptors by HEPES. *Br J Pharmacol*, *166*(8), 2402-2416. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01956.x
- Hugel, S., & Schlichter, R. (2003). Convergent control of synaptic GABA release from rat dorsal horn neurones by adenosine and GABA autoreceptors. *J Physiol*, *551*(Pt 2), 479-489. doi:10.1113/jphysiol.2003.047894
- Hughes, D. I., Sikander, S., Kinnon, C. M., Boyle, K. A., Watanabe, M., Callister, R. J., & Graham, B. A. (2012). Morphological, neurochemical and electrophysiological features of parvalbumin-expressing cells: a likely source of axo-axonic inputs in the mouse spinal dorsal horn. *J Physiol*, *590*(16), 3927-3951. doi:10.1113/jphysiol.2012.235655
- Hwang, J. H., & Yaksh, T. L. (1997). The effect of spinal GABA receptor agonists on tactile allodynia in a surgically-induced neuropathic pain model in the rat. *Pain*, *70*(1), 15-22. doi:10.1016/s0304-3959(96)03249-6
- Ikeda, H., Heinke, B., Ruscheweyh, R., & Sandkuhler, J. (2003). Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia. *Science*, *299*(5610), 1237-1240. doi:10.1126/science.1080659
- Inoue, K. (2008). Purinergic systems in microglia. *Cell Mol Life Sci*, *65*(19), 3074-3080. doi:10.1007/s00018-008-8210-3
- Inquimbert, P., Rodeau, J. L., & Schlichter, R. (2007a). 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(10), 2940-2949. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05919.x
- Inquimbert, P., Rodeau, J. L., & Schlichter, R. (2007b). Differential contribution of GABAergic and glycinergic components to inhibitory synaptic transmission in lamina II and laminae III-IV of the young rat spinal cord. *European Journal of Neuroscience*, 26(10), 2940-2949. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05919.x
- Inquimbert, P., Rodeau, J. L., & Schlichter, R. (2008a). 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(13), 3427-3437. doi:10.1523/JNEUROSCI.5076-07.2008
- Inquimbert, P., Rodeau, J. L., & Schlichter, R. (2008b). 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. *Journal of Neuroscience*, 28(13), 3427-3437. doi:10.1523/Jneurosci.5076-07.2008
- Ishikawa, T., Marsala, M., Sakabe, T., & Yaksh, T. L. (2000). Characterization of spinal amino acid release and touch-evoked allodynia produced by spinal glycine or GABA(A) receptor antagonist. *Neuroscience*, 95(3), 781-786. doi:10.1016/s0306-4522(99)00461-3
- Jacob, T. C., Moss, S. J., & Jurd, R. (2008). GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci*, 9(5), 331-343. doi:10.1038/nrn2370
- Janes, K., Wahlman, C., Little, J. W., Doyle, T., Tosh, D. K., Jacobson, K. A., & Salvemini, D. (2015). Spinal neuroimmune activation is independent of T-cell infiltration and attenuated by A3 adenosine receptor agonists in a model of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. *Brain Behav Immun*, 44, 91-99. doi:10.1016/j.bbi.2014.08.010
- Jensen, M. P., & Brownstone, R. M. (2019). Mechanisms of spinal cord stimulation for the treatment of pain: Still in the dark after 50 years. *Eur J Pain*, 23(4), 652-659. doi:10.1002/ejp.1336
- Ji, R. R., Gereau, R. W. t., Malcangio, M., & Strichartz, G. R. (2009). MAP kinase and pain. *Brain Res Rev*, 60(1), 135-148. doi:10.1016/j.brainresrev.2008.12.011
- Jin, H., Wu, H., Osterhaus, G., Wei, J., Davis, K., Sha, D., . . . Wu, J. Y. (2003). Demonstration of functional coupling between gamma -aminobutyric acid (GABA) synthesis and vesicular GABA transport into synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(7), 4293-4298. doi:10.1073/pnas.0730698100
- Jones, T. L., Sweitzer, S. M., Peters, M. C., Wilson, S. P., & Yeomans, D. C. (2005). GABAB receptors on central terminals of C-afferents mediate intersegmental Adelta-afferent evoked hypoalgesia. *Eur J Pain*, 9(3), 233-242. doi:10.1016/j.ejpain.2004.06.004
- Kamiya, H. (2002). Kainate receptor-dependent presynaptic modulation and plasticity. *Neurosci Res*, 42(1), 1-6. doi:10.1016/s0168-0102(01)00303-0
- Kamiya, H., Ozawa, S., & Manabe, T. (2002). Kainate receptor-dependent short-term plasticity of presynaptic Ca<sup>2+</sup> influx at the hippocampal mossy fiber synapses. *J Neurosci*, 22(21), 9237-9243.
- Kaneda, K., & Kita, H. (2005). Synaptically released GABA activates both pre- and postsynaptic GABA(B) receptors in the rat globus pallidus. *J Neurophysiol*, 94(2), 1104-1114. doi:10.1152/jn.00255.2005
- Kang, J., Jiang, L., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (1998). Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci*, 1(8), 683-692. doi:10.1038/3684
- Kangrga, I., & Randic, M. (1990). Tachykinins and calcitonin gene-related peptide enhance release of endogenous glutamate and aspartate from the rat spinal dorsal horn slice. *J Neurosci*, 10(6), 2026-2038.

- Kataoka, K., Hara, K., Haranishi, Y., Terada, T., & Sata, T. (2013). The antinociceptive effect of SNAP5114, a gamma-aminobutyric acid transporter-3 inhibitor, in rat experimental pain models. *Anesth Analg*, *116*(5), 1162-1169. doi:10.1213/ANE.0b013e318282dda7
- 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*(6), 1787-1794. doi:10.1523/JNEUROSCI.4856-05.2006
- Keller, A. F., Breton, J. D., Schlichter, R., & Poisbeau, P. (2004). Production of 5alpha-reduced neurosteroids is developmentally regulated and shapes GABA(A) miniature IPSCs in lamina II of the spinal cord. *J Neurosci*, *24*(4), 907-915. doi:10.1523/JNEUROSCI.4642-03.2004
- Keller, A. F., Coull, J. A., 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*(20), 7871-7880.
- Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiol Rev*, *91*(2), 461-553. doi:10.1152/physrev.00011.2010
- Kloc, M. L., Pradier, B., Chirila, A. M., & Kauer, J. A. (2019). NMDA receptor activation induces long-term potentiation of glycine synapses. *PLoS One*, *14*(9), e0222066. doi:10.1371/journal.pone.0222066
- Klyachko, V. A., & Stevens, C. F. (2006). Excitatory and feed-forward inhibitory hippocampal synapses work synergistically as an adaptive filter of natural spike trains. *PLoS Biol*, *4*(7), e207. doi:10.1371/journal.pbio.0040207
- Koizumi, S., Ohsawa, K., Inoue, K., & Kohsaka, S. (2013). Purinergic receptors in microglia: functional modal shifts of microglia mediated by P2 and P1 receptors. *Glia*, *61*(1), 47-54. doi:10.1002/glia.22358
- Kopach, O., Krotov, V., Belan, P., & Voitenko, N. (2015). Inflammatory-induced changes in synaptic drive and postsynaptic AMPARs in lamina II dorsal horn neurons are cell-type specific. *Pain*, *156*(3), 428-438. doi:10.1097/01.j.pain.0000460318.65734.00
- Kreitzer, A. C., & Regehr, W. G. (2002). Retrograde signaling by endocannabinoids. *Curr Opin Neurobiol*, *12*(3), 324-330. doi:10.1016/s0959-4388(02)00328-8
- Krnjevic, K., & Schwartz, S. (1967). The action of gamma-aminobutyric acid on cortical neurones. *Exp Brain Res*, *3*(4), 320-336. doi:10.1007/BF00237558
- Kuhn, S. A., van Landeghem, F. K., Zacharias, R., Farber, K., Rappert, A., Pavlovic, S., . . . Kettenmann, H. (2004). Microglia express GABA(B) receptors to modulate interleukin release. *Mol Cell Neurosci*, *25*(2), 312-322. doi:10.1016/j.mcn.2003.10.023
- Kuo, D. C., & de Groat, W. C. (1985). Primary afferent projections of the major splanchnic nerve to the spinal cord and gracile nucleus of the cat. *J Comp Neurol*, *231*(4), 421-434. doi:10.1002/cne.902310402
- Labrakakis, C., Rudolph, U., & De Koninck, Y. (2014). The heterogeneity in GABAA receptor-mediated IPSC kinetics reflects heterogeneity of subunit composition among inhibitory and excitatory interneurons in spinal lamina II. *Front Cell Neurosci*, *8*, 424. doi:10.3389/fncel.2014.00424
- Laffray, S., Bouali-Benazzouz, R., Papon, M. A., Favereaux, A., Jiang, Y., Holm, T., . . . Landry, M. (2012). Impairment of GABAB receptor dimer by endogenous 14-3-3zeta in chronic pain conditions. *EMBO J*, *31*(15), 3239-3251. doi:10.1038/emboj.2012.161
- Lai, H. C., Seal, R. P., & Johnson, J. E. (2016). Making sense out of spinal cord somatosensory development. *Development*, *143*(19), 3434-3448. doi:10.1242/dev.139592
- Larsson, M. (2017). Pax2 is persistently expressed by GABAergic neurons throughout the adult rat dorsal horn. *Neurosci Lett*, *638*, 96-101. doi:10.1016/j.neulet.2016.12.015

- Laviv, T., Riven, I., Dolev, I., Vertkin, I., Balana, B., Slesinger, P. A., & Slutsky, I. (2010). Basal GABA regulates GABA(B)R conformation and release probability at single hippocampal synapses. *Neuron*, *67*(2), 253-267. doi:10.1016/j.neuron.2010.06.022
- Lee, K. S., & Reddington, M. (1986). Autoradiographic evidence for multiple CNS binding sites for adenosine derivatives. *Neuroscience*, *19*(2), 535-549. doi:10.1016/0306-4522(86)90279-4
- Lee, M., Schwab, C., & McGeer, P. L. (2011). Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity. *Glia*, *59*(1), 152-165. doi:10.1002/glia.21087
- Li, D. P., Chen, S. R., Pan, Y. Z., Levey, A. I., & Pan, H. L. (2002). Role of presynaptic muscarinic and GABA(B) receptors in spinal glutamate release and cholinergic analgesia in rats. *J Physiol*, *543*(Pt 3), 807-818. doi:10.1113/jphysiol.2002.020644
- Li, L., Rutlin, M., Abaira, V. E., Cassidy, C., Kus, L., Gong, S., . . . Ginty, D. D. (2011). The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons. *Cell*, *147*(7), 1615-1627. doi:10.1016/j.cell.2011.11.027
- Liao, H. Y., Hsieh, C. L., Huang, C. P., & Lin, Y. W. (2017). Electroacupuncture Attenuates CFA-induced Inflammatory Pain by suppressing Nav1.8 through S100B, TRPV1, Opioid, and Adenosine Pathways in Mice. *Sci Rep*, *7*, 42531. doi:10.1038/srep42531
- Light, A. R., & Kavookjian, A. M. (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*(2), 172-189. doi:10.1002/cne.902670203
- Lind, G., Meyerson, B. A., Winter, J., & Linderoth, B. (2004). Intrathecal baclofen as adjuvant therapy to enhance the effect of spinal cord stimulation in neuropathic pain: a pilot study. *Eur J Pain*, *8*(4), 377-383. doi:10.1016/j.ejpain.2003.11.002
- Lind, G., Schechtman, G., Winter, J., Meyerson, B. A., & Linderoth, B. (2008). Baclofen-enhanced spinal cord stimulation and intrathecal baclofen alone for neuropathic pain: Long-term outcome of a pilot study. *Eur J Pain*, *12*(1), 132-136. doi:10.1016/j.ejpain.2007.03.011
- Liu, J., Reid, A. R., & Sawynok, J. (2013). Antinociception by systemically-administered acetaminophen (paracetamol) involves spinal serotonin 5-HT7 and adenosine A1 receptors, as well as peripheral adenosine A1 receptors. *Neurosci Lett*, *536*, 64-68. doi:10.1016/j.neulet.2012.12.052
- Liu, L. S., Shenoy, M., & Pasricha, P. J. (2011). The analgesic effects of the GABAB receptor agonist, baclofen, in a rodent model of functional dyspepsia. *Neurogastroenterol Motil*, *23*(4), 356-361, e160-351. doi:10.1111/j.1365-2982.2010.01649.x
- Liu, P., Yuan, H. B., Zhao, S., Liu, F. F., Jiang, Y. Q., Guo, Y. X., & Wang, X. L. (2018). Activation of GABAB Receptor Suppresses Diabetic Neuropathic Pain through Toll-Like Receptor 4 Signaling Pathway in the Spinal Dorsal Horn. *Mediators Inflamm*, *2018*, 6016272. doi:10.1155/2018/6016272
- Liu, P., Zhang, X., He, X., Jiang, Z., Wang, Q., & Lu, Y. (2021). Spinal GABAergic neurons are under feed-forward inhibitory control driven by Adelta and C fibers in Gad2 td-Tomato mice. *Mol Pain*, *17*, 1744806921992620. doi:10.1177/1744806921992620
- Llano, I., Leresche, N., & Marty, A. (1991). Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents. *Neuron*, *6*(4), 565-574. doi:10.1016/0896-6273(91)90059-9
- Lovett-Barron, M., Turi, G. F., Kaifosh, P., Lee, P. H., Bolze, F., Sun, X. H., . . . Losonczy, A. (2012). Regulation of neuronal input transformations by tunable dendritic inhibition. *Nat Neurosci*, *15*(3), 423-430, S421-423. doi:10.1038/nn.3024

- Lu, Y., Dong, H., Gao, Y., Gong, Y., Ren, Y., Gu, N., . . . Xiong, L. (2013). A feed-forward spinal cord glycinergic neural circuit gates mechanical allodynia. *J Clin Invest*, *123*(9), 4050-4062. doi:10.1172/JCI70026
- Lu, Y., & Perl, E. R. (2003). A specific inhibitory pathway between substantia gelatinosa neurons receiving direct C-fiber input. *J Neurosci*, *23*(25), 8752-8758.
- Lu, Y., & Perl, E. R. (2005). Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II). *J Neurosci*, *25*(15), 3900-3907. doi:10.1523/JNEUROSCI.0102-05.2005
- Lujan, R., & Shigemoto, R. (2006). Localization of metabotropic GABA receptor subunits GABAB1 and GABAB2 relative to synaptic sites in the rat developing cerebellum. *Eur J Neurosci*, *23*(6), 1479-1490. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04669.x
- Lujan, R., Shigemoto, R., Kulik, A., & Juiz, J. M. (2004). Localization of the GABAB receptor 1a/b subunit relative to glutamatergic synapses in the dorsal cochlear nucleus of the rat. *J Comp Neurol*, *475*(1), 36-46. doi:10.1002/cne.20160
- Lundberg, A., & Quilisch, H. (1953). On the effect of calcium on presynaptic potentiation and depression at the neuro-muscular junction. *Acta Physiol Scand Suppl*, *111*, 121-129.
- Ma, W., Saunders, P. A., Somogyi, R., Poulter, M. O., & Barker, J. L. (1993). Ontogeny of GABAA receptor subunit mRNAs in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *J Comp Neurol*, *338*(3), 337-359. doi:10.1002/cne.903380303
- MacDonald, R. L., Rogers, C. J., & Twyman, R. E. (1989). Barbiturate regulation of kinetic properties of the GABAA receptor channel of mouse spinal neurones in culture. *J Physiol*, *417*, 483-500. doi:10.1113/jphysiol.1989.sp017814
- Malan, T. P., Mata, H. P., & Porreca, F. (2002). Spinal GABA(A) and GABA(B) receptor pharmacology in a rat model of neuropathic pain. *Anesthesiology*, *96*(5), 1161-1167. doi:10.1097/0000542-200205000-00020
- Malcangio, M., Da Silva, H., & Bowery, N. G. (1993). Plasticity of GABAB receptor in rat spinal cord detected by autoradiography. *Eur J Pharmacol*, *250*(1), 153-156. doi:10.1016/0014-2999(93)90633-s
- Malcangio, M., Libri, V., Teoh, H., Constanti, A., & Bowery, N. G. (1995). Chronic (-)baclofen or CGP 36742 alters GABAB receptor sensitivity in rat brain and spinal cord. *Neuroreport*, *6*(2), 399-403. doi:10.1097/00001756-199501000-00042
- Markram, H., Gupta, A., Uziel, A., Wang, Y., & Tsodyks, M. (1998). Information processing with frequency-dependent synaptic connections. *Neurobiol Learn Mem*, *70*(1-2), 101-112. doi:10.1006/nlme.1998.3841
- Marshall, F. H., Jones, K. A., Kaupmann, K., & Bettler, B. (1999). GABAB receptors - the first 7TM heterodimers. *Trends Pharmacol Sci*, *20*(10), 396-399. doi:10.1016/s0165-6147(99)01383-8
- Martinez-Rodriguez, R., Tonda, A., Gragera, R. R., Paz-Doel, R., Garcia-Cordovilla, R., Fernandez-Fernandez, E., . . . Lopez-Bravo, A. (1993). Synaptic and non-synaptic immunolocalization of GABA and glutamate acid decarboxylase (GAD) in cerebellar cortex of rat. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, *39*(1), 115-123.
- Matveev, V., Zucker, R. S., & Sherman, A. (2004). Facilitation through buffer saturation: constraints on endogenous buffering properties. *Biophys J*, *86*(5), 2691-2709. doi:10.1016/S0006-3495(04)74324-6
- Maxwell, D. J., Belle, M. D., Cheunsuang, O., Stewart, A., & Morris, R. (2007). Morphology of inhibitory and excitatory interneurons in superficial laminae of the rat dorsal horn. *J Physiol*, *584*(Pt 2), 521-533. doi:10.1113/jphysiol.2007.140996
- McGlone, F., & Spence, C. (2010). The cutaneous senses: touch, temperature, pain/itch, and pleasure. *Neurosci Biobehav Rev*, *34*(2), 145-147. doi:10.1016/j.neubiorev.2009.08.008

- McLachlan, E. M. (1978). The statistics of transmitter release at chemical synapses. *Int Rev Physiol*, 17, 49-117.
- Melin, C., Jacquot, F., Dallel, R., & Artola, A. (2013). Segmental disinhibition suppresses C-fiber inputs to the rat superficial medullary dorsal horn via the activation of GABAB receptors. *Eur J Neurosci*, 37(3), 417-428. doi:10.1111/ejn.12048
- Melnick, I. V., Santos, S. F., & Safronov, B. V. (2004). Mechanism of spike frequency adaptation in substantia gelatinosa neurones of rat. *J Physiol*, 559(Pt 2), 383-395. doi:10.1113/jphysiol.2004.066415
- Melnick, I. V., Santos, S. F., Szokol, K., Szucs, P., & Safronov, B. V. (2004). Ionic basis of tonic firing in spinal substantia gelatinosa neurons of rat. *J Neurophysiol*, 91(2), 646-655. doi:10.1152/jn.00883.2003
- Meyer, R. A., & Campbell, J. N. (1981). Myelinated nociceptive afferents account for the hyperalgesia that follows a burn to the hand. *Science*, 213(4515), 1527-1529. doi:10.1126/science.7280675
- Meyer RA, R. M., Campbell JN, Raja SN. (1994). *Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In: McMahon SB, Koltzenburg M (eds) Wall and Melzack's textbook of pain.* London.
- Michaelis, M. L., Michaelis, E. K., & Myers, S. L. (1979). Adenosine modulation of synaptosomal dopamine release. *Life Sci*, 24(22), 2083-2092. doi:10.1016/0024-3205(79)90082-1
- Millan, M. J. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, 57(1), 1-164. doi:10.1016/s0301-0082(98)00048-3
- Millan, M. J. (2002). Descending control of pain. *Prog Neurobiol*, 66(6), 355-474.
- Milligan, E. D., & Watkins, L. R. (2009). Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*, 10(1), 23-36. doi:10.1038/nrn2533
- Miraucourt, L. S., Dallel, R., & Voisin, D. L. (2007a). Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through PKCgamma interneurons. *PLoS One*, 2(11), e1116. doi:10.1371/journal.pone.0001116
- Miraucourt, L. S., Dallel, R., & Voisin, D. L. (2007b). Glycine Inhibitory Dysfunction Turns Touch into Pain through PKCgamma Interneurons. *PLoS One*, 2(11). doi:ARTN e1116  
10.1371/journal.pone.0001116
- Mochida, S., Few, A. P., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2008). Regulation of presynaptic Ca(V)2.1 channels by Ca<sup>2+</sup> sensor proteins mediates short-term synaptic plasticity. *Neuron*, 57(2), 210-216. doi:10.1016/j.neuron.2007.11.036
- Mody, I., De Koninck, Y., Otis, T. S., & Soltesz, I. (1994). Bridging the cleft at GABA synapses in the brain. *Trends Neurosci*, 17(12), 517-525. doi:10.1016/0166-2236(94)90155-4
- Molander, C., & Grant, G. (1986). Laminar distribution and somatotopic organization of primary afferent fibers from hindlimb nerves in the dorsal horn. A study by transganglionic transport of horseradish peroxidase in the rat. *Neuroscience*, 19(1), 297-312. doi:10.1016/0306-4522(86)90023-0
- Moore, K. A., Kohno, T., Karchewski, L. A., Scholz, J., Baba, H., & Woolf, C. J. (2002). Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci*, 22(15), 6724-6731. doi:20026611
- Morales-Aza, B. M., Chillingworth, N. L., Payne, J. A., & Donaldson, L. F. (2004). Inflammation alters cation chloride cotransporter expression in sensory neurons. *Neurobiol Dis*, 17(1), 62-69. doi:10.1016/j.nbd.2004.05.010

- Moreno, A., Morris, R. G. M., & Canals, S. (2016). Frequency-Dependent Gating of Hippocampal-Neocortical Interactions. *Cereb Cortex*, 26(5), 2105-2114. doi:10.1093/cercor/bhv033
- Morgan, C., Nadelhaft, I., & de Groat, W. C. (1981). The distribution of visceral primary afferents from the pelvic nerve to Lissauer's tract and the spinal gray matter and its relationship to the sacral parasympathetic nucleus. *J Comp Neurol*, 201(3), 415-440. doi:10.1002/cne.902010308
- Nagappan, G., & Lu, B. (2005). Activity-dependent modulation of the BDNF receptor TrkB: mechanisms and implications. *Trends Neurosci*, 28(9), 464-471. doi:10.1016/j.tins.2005.07.003
- Nakamura, I., Ohta, Y., & Kemmotsu, O. (1997). Characterization of adenosine receptors mediating spinal sensory transmission related to nociceptive information in the rat. *Anesthesiology*, 87(3), 577-584. doi:10.1097/00000542-199709000-00018
- Nascimento, F. P., Figueredo, S. M., Marcon, R., Martins, D. F., Macedo, S. J., Jr., Lima, D. A., . . . Santos, A. R. (2010). Inosine reduces pain-related behavior in mice: involvement of adenosine A1 and A2A receptor subtypes and protein kinase C pathways. *J Pharmacol Exp Ther*, 334(2), 590-598. doi:10.1124/jpet.110.166058
- Neher, E., & Sakaba, T. (2008). Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron*, 59(6), 861-872. doi:10.1016/j.neuron.2008.08.019
- Neumann, S., Braz, J. M., Skinner, K., Llewellyn-Smith, I. J., & Basbaum, A. I. (2008). Innocuous, not noxious, input activates PKCgamma interneurons of the spinal dorsal horn via myelinated afferent fibers. *J Neurosci*, 28(32), 7936-7944. doi:10.1523/JNEUROSCI.1259-08.2008
- Neumann, S., Doubell, T. P., Leslie, T., & Woolf, C. J. (1996). Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurons. *Nature*, 384(6607), 360-364. doi:10.1038/384360a0
- Nilsson, M., Eriksson, P. S., Ronnback, L., & Hansson, E. (1993). GABA induces Ca<sup>2+</sup> transients in astrocytes. *Neuroscience*, 54(3), 605-614. doi:10.1016/0306-4522(93)90232-5
- Ochi, S., Lim, J. Y., Rand, M. N., During, M. J., Sakatani, K., & Kocsis, J. D. (1993). Transient presence of GABA in astrocytes of the developing optic nerve. *Glia*, 9(3), 188-198. doi:10.1002/glia.440090304
- Ochiishi, T., Chen, L., Yukawa, A., Saitoh, Y., Sekino, Y., Arai, T., . . . Miyamoto, H. (1999). Cellular localization of adenosine A1 receptors in rat forebrain: immunohistochemical analysis using adenosine A1 receptor-specific monoclonal antibody. *J Comp Neurol*, 411(2), 301-316.
- Ochiishi, T., Saitoh, Y., Yukawa, A., Saji, M., Ren, Y., Shirao, T., . . . Sekino, Y. (1999). High level of adenosine A1 receptor-like immunoreactivity in the CA2/CA3a region of the adult rat hippocampus. *Neuroscience*, 93(3), 955-967. doi:10.1016/s0306-4522(99)00179-7
- Oliva, A. A., Jr., Jiang, M., Lam, T., Smith, K. L., & Swann, J. W. (2000). Novel hippocampal interneuronal subtypes identified using transgenic mice that express green fluorescent protein in GABAergic interneurons. *J Neurosci*, 20(9), 3354-3368.
- Patel, S., Naeem, S., Kensingland, A., Froestl, W., Capogna, M., Urban, L., & Fox, A. (2001). The effects of GABA(B) agonists and gabapentin on mechanical hyperalgesia in models of neuropathic and inflammatory pain in the rat. *Pain*, 90(3), 217-226. doi:10.1016/s0304-3959(00)00404-8
- Paulus, W., & Rothwell, J. C. (2016). Membrane resistance and shunting inhibition: where biophysics meets state-dependent human neurophysiology. *J Physiol*, 594(10), 2719-2728. doi:10.1113/JP271452

- Payne, J. A., Rivera, C., Voipio, J., & Kaila, K. (2003). Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci*, *26*(4), 199-206. doi:10.1016/S0166-2236(03)00068-7
- Peakman, M. C., & Hill, S. J. (1994). Adenosine A2B-receptor-mediated cyclic AMP accumulation in primary rat astrocytes. *Br J Pharmacol*, *111*(1), 191-198. doi:10.1111/j.1476-5381.1994.tb14043.x
- Peirs, C., Dallel, R., & Todd, A. J. (2021). Correction to: Recent advances in our understanding of the organization of dorsal horn neuron populations and their contribution to cutaneous mechanical allodynia. *J Neural Transm (Vienna)*, *128*(6), 867. doi:10.1007/s00702-020-02250-7
- Peirs, C., Patil, S., Bouali-Benazzouz, R., Artola, A., Landry, M., & Dallel, R. (2014). Protein kinase C gamma interneurons in the rat medullary dorsal horn: distribution and synaptic inputs to these neurons, and subcellular localization of the enzyme. *J Comp Neurol*, *522*(2), 393-413. doi:10.1002/cne.23407
- Peirs, C., & Seal, R. P. (2016). Neural circuits for pain: Recent advances and current views. *Science*, *354*(6312), 578-584. doi:10.1126/science.aaf8933
- Peirs, C., Williams, S. G., Zhao, X., Arokiaraj, C. M., Ferreira, D. W., Noh, M. C., . . . Seal, R. P. (2020). Mechanical Allodynia Circuitry in the Dorsal Horn Is Defined by the Nature of the Injury. *Neuron*. doi:10.1016/j.neuron.2020.10.027
- Peirs, C., Williams, S. P., Zhao, X., Walsh, C. E., Gedeon, J. Y., Cagle, N. E., . . . Seal, R. P. (2015). Dorsal Horn Circuits for Persistent Mechanical Pain. *Neuron*, *87*(4), 797-812. doi:10.1016/j.neuron.2015.07.029
- Petitjean, H., Hugel, S., Barthas, F., Bohren, Y., Barrot, M., Yalcin, I., & Schlichter, R. (2014). Activation of transient receptor potential vanilloid 2-expressing primary afferents stimulates synaptic transmission in the deep dorsal horn of the rat spinal cord and elicits mechanical hyperalgesia. *Eur J Neurosci*, *40*(8), 3189-3201. doi:10.1111/ejn.12688
- Petitjean, H., Pawlowski, S. A., Fraine, S. L., Sharif, B., Hamad, D., Fatima, T., . . . Sharif-Naeini, R. (2015). Dorsal Horn Parvalbumin Neurons Are Gate-Keepers of Touch-Evoked Pain after Nerve Injury. *Cell Rep*, *13*(6), 1246-1257. doi:10.1016/j.celrep.2015.09.080
- Petitjean, H., Rodeau, J. L., & Schlichter, R. (2012). Interactions between superficial and deep dorsal horn spinal cord neurons in the processing of nociceptive information. *Eur J Neurosci*, *36*(11), 3500-3508. doi:10.1111/j.1460-9568.2012.08273.x
- Pinard, A., Seddik, R., & Bettler, B. (2010). GABAB receptors: physiological functions and mechanisms of diversity. *Adv Pharmacol*, *58*, 231-255. doi:10.1016/S1054-3589(10)58010-4
- Pitler, T. A., & Alger, B. E. (1992). Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABAA responses in hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci*, *12*(10), 4122-4132.
- Pitler, T. A., & Alger, B. E. (1994). Depolarization-induced suppression of GABAergic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells: G protein involvement in a presynaptic mechanism. *Neuron*, *13*(6), 1447-1455. doi:10.1016/0896-6273(94)90430-8
- Poisbeau, P., Patte-Mensah, C., Keller, A. F., Barrot, M., Breton, J. D., Luis-Delgado, O. E., . . . Schlichter, R. (2005). Inflammatory pain upregulates spinal inhibition via endogenous neurosteroid production. *J Neurosci*, *25*(50), 11768-11776. doi:10.1523/JNEUROSCI.3841-05.2005
- Polgar, E., Al-Khater, K. M., Shehab, S., Watanabe, M., & Todd, A. J. (2008). Large projection neurons in lamina I of the rat spinal cord that lack the neurokinin 1 receptor are densely innervated by VGLUT2-containing axons and possess GluR4-containing AMPA receptors. *J Neurosci*, *28*(49), 13150-13160. doi:10.1523/JNEUROSCI.4053-08.2008



- Polgar, E., Durrieux, C., Hughes, D. I., & Todd, A. J. (2013). A quantitative study of inhibitory interneurons in laminae I-III of the mouse spinal dorsal horn. *PLoS One*, *8*(10), e78309. doi:10.1371/journal.pone.0078309
- Polgar, E., Hughes, D. I., Riddell, J. S., Maxwell, D. J., Puskar, Z., & Todd, A. J. (2003). Selective loss of spinal GABAergic or glycinergic neurons is not necessary for development of thermal hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Pain*, *104*(1-2), 229-239.
- Poon, A., & Sawynok, J. (1998). Antinociception by adenosine analogs and inhibitors of adenosine metabolism in an inflammatory thermal hyperalgesia model in the rat. *Pain*, *74*(2-3), 235-245. doi:10.1016/s0304-3959(97)00186-3
- Popoli, P., & Pepponi, R. (2012). Potential therapeutic relevance of adenosine A2B and A2A receptors in the central nervous system. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, *11*(6), 664-674. doi:10.2174/187152712803581100
- Pouille, F., & Scanziani, M. (2004). Routing of spike series by dynamic circuits in the hippocampus. *Nature*, *429*(6993), 717-723. doi:10.1038/nature02615
- Prescott, S. A., & De Koninck, Y. (2002). Four cell types with distinctive membrane properties and morphologies in lamina I of the spinal dorsal horn of the adult rat. *J Physiol*, *539*(Pt 3), 817-836.
- Price, D. D., Hayashi, H., Dubner, R., & Ruda, M. A. (1979). Functional relationships between neurons of marginal and substantia gelatinosa layers of primate dorsal horn. *J Neurophysiol*, *42*(6), 1590-1608. doi:10.1152/jn.1979.42.6.1590
- Price, G. W., Wilkin, G. P., Turnbull, M. J., & Bowery, N. G. (1984). Are baclofen-sensitive GABAB receptors present on primary afferent terminals of the spinal cord? *Nature*, *307*(5946), 71-74. doi:10.1038/307071a0
- Price, T. J., Cervero, F., Gold, M. S., Hammond, D. L., & Prescott, S. A. (2009). Chloride regulation in the pain pathway. *Brain Res Rev*, *60*(1), 149-170. doi:10.1016/j.brainresrev.2008.12.015
- Punnakkal, P., von Schoultz, C., Haenraets, K., Wildner, H., & Zeilhofer, H. U. (2014). Morphological, biophysical and synaptic properties of glutamatergic neurons of the mouse spinal dorsal horn. *J Physiol*, *592*(4), 759-776. doi:10.1113/jphysiol.2013.264937
- Purves D, A. G., Fitzpatrick D. (2001). *The Internal Anatomy of the Spinal Cord*. Sunderland.
- Ramón y Cajal, S. (1909-1911). *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. Cervelet, cerveau moyen, rétine, couche optique, corps strié, écorce cérébrale générale et régionale, grand sympathique*. Paris
- Rees, H., & Roberts, M. H. T. (1993). The anterior pretectal nucleus: a proposed role in sensory processing. *Pain*, *53*(2), 121-135. doi:10.1016/0304-3959(93)90072-W
- Ren, K., & Ruda, M. A. (1994). A comparative study of the calcium-binding proteins calbindin-D28K, calretinin, calmodulin and parvalbumin in the rat spinal cord. *Brain Res Brain Res Rev*, *19*(2), 163-179. doi:10.1016/0165-0173(94)90010-8
- Rexed, B. (1952). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol*, *96*(3), 414-495. doi:10.1002/cne.900960303
- Rivkees, S. A., Price, S. L., & Zhou, F. C. (1995). Immunohistochemical detection of A1 adenosine receptors in rat brain with emphasis on localization in the hippocampal formation, cerebral cortex, cerebellum, and basal ganglia. *Brain Res*, *677*(2), 193-203. doi:10.1016/0006-8993(95)00062-u
- Roberts, E., & Frankel, S. (1950). gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J Biol Chem*, *187*(1), 55-63.

- Roberts, L. A., Beyer, C., & Komisaruk, B. R. (1986). Nociceptive responses to altered GABAergic activity at the spinal cord. *Life Sci*, 39(18), 1667-1674. doi:10.1016/0024-3205(86)90164-5
- Rode, F., Jensen, D. G., Blackburn-Munro, G., & Bjerrum, O. J. (2005). Centrally-mediated antinociceptive actions of GABA(A) receptor agonists in the rat spared nerve injury model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*, 516(2), 131-138. doi:10.1016/j.ejphar.2005.04.034
- Rowley, N. M., Madsen, K. K., Schousboe, A., & Steve White, H. (2012). Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. *Neurochem Int*, 61(4), 546-558. doi:10.1016/j.neuint.2012.02.013
- Royer, S., Zemelman, B. V., Losonczy, A., Kim, J., Chance, F., Magee, J. C., & Buzsaki, G. (2012). Control of timing, rate and bursts of hippocampal place cells by dendritic and somatic inhibition. *Nat Neurosci*, 15(5), 769-775. doi:10.1038/nn.3077
- Rudomin, P., & Schmidt, R. F. (1999). Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Exp Brain Res*, 129(1), 1-37. doi:10.1007/s002210050933
- Rupprecht, R., & Holsboer, F. (1999). Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci*, 22(9), 410-416. doi:10.1016/s0166-2236(99)01399-5
- Ruscheweyh, R., Forsthuber, L., Schoffnegger, D., & Sandkuhler, J. (2007). Modification of classical neurochemical markers in identified primary afferent neurons with A-beta-, A-delta-, and C-fibers after chronic constriction injury in mice. *J Comp Neurol*, 502(2), 325-336. doi:10.1002/cne.21311
- Ruscheweyh, R., & Sandkuhler, J. (2002). Lamina-specific membrane and discharge properties of rat spinal dorsal horn neurones in vitro. *J Physiol*, 541(Pt 1), 231-244.
- Russ, D. E., Cross, R. B. P., Li, L., Koch, S. C., Matson, K. J. E., Yadav, A., . . . Levine, A. J. (2021). A harmonized atlas of mouse spinal cord cell types and their spatial organization. *Nat Commun*, 12(1), 5722. doi:10.1038/s41467-021-25125-1
- Saeed, A. W., & Ribeiro-da-Silva, A. (2013). De novo expression of neurokinin-1 receptors by spinoparabrachial lamina I pyramidal neurons following a peripheral nerve lesion. *J Comp Neurol*, 521(8), 1915-1928. doi:10.1002/cne.23267
- Sagne, C., El Mestikawy, S., Isambert, M. F., Hamon, M., Henry, J. P., Giros, B., & Gasnier, B. (1997). Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome databases. *FEBS Lett*, 417(2), 177-183. doi:10.1016/s0014-5793(97)01279-9
- Sakaba, T. (2008). Two Ca(2+)-dependent steps controlling synaptic vesicle fusion and replenishment at the cerebellar basket cell terminal. *Neuron*, 57(3), 406-419. doi:10.1016/j.neuron.2007.11.029
- Sakaba, T., & Neher, E. (2001). Calmodulin mediates rapid recruitment of fast-releasing synaptic vesicles at a calyx-type synapse. *Neuron*, 32(6), 1119-1131. doi:10.1016/s0896-6273(01)00543-8
- Sala, C., Piech, V., Wilson, N. R., Passafaro, M., Liu, G., & Sheng, M. (2001). Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron*, 31(1), 115-130. doi:10.1016/s0896-6273(01)00339-7
- Sandkuhler, J. (2009). Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev*, 89(2), 707-758. doi:10.1152/physrev.00025.2008
- Sanna, E., Talani, G., Busonero, F., Pisu, M. G., Purdy, R. H., Serra, M., & Biggio, G. (2004). Brain steroidogenesis mediates ethanol modulation of GABA(A) receptor activity in rat hippocampus. *J Neurosci*, 24(29), 6521-6530. doi:10.1523/JNEUROSCI.0075-04.2004

- Santos, S. F., Luz, L. L., Szucs, P., Lima, D., Derkach, V. A., & Safronov, B. V. (2009). Transmission efficacy and plasticity in glutamatergic synapses formed by excitatory interneurons of the substantia gelatinosa in the rat spinal cord. *PLoS One*, *4*(11), e8047. doi:10.1371/journal.pone.0008047
- Sawynok, J. (1987). GABAergic mechanisms of analgesia: an update. *Pharmacol Biochem Behav*, *26*(2), 463-474. doi:10.1016/0091-3057(87)90148-1
- Sawynok, J. (2016). Adenosine receptor targets for pain. *Neuroscience*, *338*, 1-18. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.10.031
- Sawynok, J., & LaBella, F. S. (1982). On the involvement of GABA in the analgesia produced by baclofen, muscimol and morphine. *Neuropharmacology*, *21*(5), 397-403. doi:10.1016/0028-3908(82)90022-3
- Scanziani, M. (2000). GABA spillover activates postsynaptic GABA(B) receptors to control rhythmic hippocampal activity. *Neuron*, *25*(3), 673-681. doi:10.1016/s0896-6273(00)81069-7
- Schneider, S. P. (2008). Local circuit connections between hamster laminae III and IV dorsal horn neurons. *J Neurophysiol*, *99*(3), 1306-1318. doi:10.1152/jn.00962.2007
- Schneider, S. P., & Lopez, M. (2002). Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in physiologically identified interneurons of hamster spinal laminae III-V. *Neuroscience*, *115*(2), 627-636. doi:10.1016/s0306-4522(02)00346-9
- Schoenen, J. (1982). Dendritic organization of the human spinal cord: the motoneurons. *J Comp Neurol*, *211*(3), 226-247. doi:10.1002/cne.902110303
- Scholz, J., Broom, D. C., Youn, D. H., Mills, C. D., Kohno, T., Suter, M. R., . . . Woolf, C. J. (2005). Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. *J Neurosci*, *25*(32), 7317-7323. doi:10.1523/JNEUROSCI.1526-05.2005
- Schuler, V., Luscher, C., Blanchet, C., Klix, N., Sansig, G., Klebs, K., . . . Bettler, B. (2001). Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B1). *Neuron*, *31*(1), 47-58. doi:10.1016/s0896-6273(01)00345-2
- Seal, R. P., Wang, X., Guan, Y., Raja, S. N., Woodbury, C. J., Basbaum, A. I., & Edwards, R. H. (2009). Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature*, *462*(7273), 651-655. doi:10.1038/nature08505
- Seibt, F., & Schlichter, R. (2015). Noradrenaline-mediated facilitation of inhibitory synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord involves interlaminar communications. *Eur J Neurosci*, *42*(9), 2654-2665. doi:10.1111/ejn.13077
- Sivilotti, L., & Nistri, A. (1991). GABA receptor mechanisms in the central nervous system. *Prog Neurobiol*, *36*(1), 35-92. doi:10.1016/0301-0082(91)90036-z
- Sivilotti, L., & Woolf, C. J. (1994). The contribution of GABAA and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. *J Neurophysiol*, *72*(1), 169-179. doi:10.1152/jn.1994.72.1.169
- Smart, T. G., Moss, S. J., Xie, X., & Haganir, R. L. (1991). GABAA receptors are differentially sensitive to zinc: dependence on subunit composition. *Br J Pharmacol*, *103*(4), 1837-1839. doi:10.1111/j.1476-5381.1991.tb12337.x
- Smith, G. D., Harrison, S. M., Birch, P. J., Elliott, P. J., Malcangio, M., & Bowery, N. G. (1994). Increased sensitivity to the antinociceptive activity of (+/-)-baclofen in an animal model of chronic neuropathic, but not chronic inflammatory hyperalgesia. *Neuropharmacology*, *33*(9), 1103-1108. doi:10.1016/0028-3908(94)90149-x
- Smith, K. M., Boyle, K. A., Madden, J. F., Dickinson, S. A., Jobling, P., Callister, R. J., . . . Graham, B. A. (2015). Functional heterogeneity of calretinin-expressing neurons in the

- mouse superficial dorsal horn: implications for spinal pain processing. *J Physiol*, 593(19), 4319-4339. doi:10.1113/JP270855
- Smith, K. M., Boyle, K. A., Mustapa, M., Jobling, P., Callister, R. J., Hughes, D. I., & Graham, B. A. (2016). Distinct forms of synaptic inhibition and neuromodulation regulate calretinin-positive neuron excitability in the spinal cord dorsal horn. *Neuroscience*, 326, 10-21. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.03.058
- Snider, W. D., & McMahon, S. B. (1998). Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron*, 20(4), 629-632. doi:10.1016/s0896-6273(00)81003-x
- Staley, K. J., Soldo, B. L., & Proctor, W. R. (1995). Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABAA receptors. *Science*, 269(5226), 977-981. doi:10.1126/science.7638623
- Stell, B. M., Brickley, S. G., Tang, C. Y., Farrant, M., & Mody, I. (2003). Neuroactive steroids reduce neuronal excitability by selectively enhancing tonic inhibition mediated by delta subunit-containing GABAA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(24), 14439-14444. doi:10.1073/pnas.2435457100
- Stempien, L., & Tsai, T. (2000). Intrathecal baclofen pump use for spasticity: a clinical survey. *Am J Phys Med Rehabil*, 79(6), 536-541. doi:10.1097/00002060-200011000-00010
- Stiller, C. O., Cui, J. G., O'Connor, W. T., Brodin, E., Meyerson, B. A., & Linderoth, B. (1996). Release of gamma-aminobutyric acid in the dorsal horn and suppression of tactile allodynia by spinal cord stimulation in mononeuropathic rats. *Neurosurgery*, 39(2), 367-374; discussion 374-365. doi:10.1097/00006123-199608000-00026
- Stone, T. W., Ceruti, S., & Abbracchio, M. P. (2009). Adenosine receptors and neurological disease: neuroprotection and neurodegeneration. *Handb Exp Pharmacol*(193), 535-587. doi:10.1007/978-3-540-89615-9\_17
- Stubley, L. A., Martinez, M. A., Karmally, S., Lopez, T., Cejas, P., & Eaton, M. J. (2001). Only early intervention with gamma-aminobutyric acid cell therapy is able to reverse neuropathic pain after partial nerve injury. *J Neurotrauma*, 18(4), 471-477. doi:10.1089/089771501750171092
- Sugiura, Y., Lee, C. L., & Perl, E. R. (1986). Central projections of identified, unmyelinated (C) afferent fibers innervating mammalian skin. *Science*, 234(4774), 358-361. doi:10.1126/science.3764416
- Sylwestrak, E. L., & Ghosh, A. (2012). Elfn1 regulates target-specific release probability at CA1-interneuron synapses. *Science*, 338(6106), 536-540. doi:10.1126/science.1222482
- 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(1), 60-79. doi:10.1002/cne.10905
- Tang, Y., Schlumberger, T., Kim, T., Lueker, M., & Zucker, R. S. (2000). Effects of mobile buffers on facilitation: experimental and computational studies. *Biophys J*, 78(6), 2735-2751. doi:10.1016/s0006-3495(00)76819-6
- Thomas, D. A., Navarrete, I. M., Graham, B. A., McGowan, M. K., & Hammond, D. L. (1996). Antinociception produced by systemic R(+)-baclofen hydrochloride is attenuated by CGP 35348 administered to the spinal cord or ventromedial medulla of rats. *Brain Res*, 718(1-2), 129-137. doi:10.1016/0006-8993(96)00100-x
- Todd, A. J. (1990). An electron microscope study of glycine-like immunoreactivity in laminae I-III of the spinal dorsal horn of the rat. *Neuroscience*, 39(2), 387-394.
- Todd, A. J. (1996). GABA and glycine in synaptic glomeruli of the rat spinal dorsal horn. *European Journal of Neuroscience*, 8(12), 2492-2498. doi:DOI 10.1111/j.1460-9568.1996.tb01543.x

- Todd, A. J. (2010). Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci*, *11*(12), 823-836. doi:10.1038/nrn2947
- Todd, A. J. (2017). Identifying functional populations among the interneurons in laminae I-III of the spinal dorsal horn. *Mol Pain*, *13*, 1744806917693003. doi:10.1177/1744806917693003
- Todd, A. J., & Lewis, S. G. (1986). The morphology of Golgi-stained neurons in lamina II of the rat spinal cord. *J Anat*, *149*, 113-119.
- Todd, A. J., Maxwell, D. J., & Brown, A. G. (1991). Relationships between hair-follicle afferent axons and glycine-immunoreactive profiles in cat spinal dorsal horn. *Brain Res*, *564*(1), 132-137. doi:10.1016/0006-8993(91)91362-5
- Todd, A. J., & Sullivan, A. C. (1990). Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol*, *296*(3), 496-505. doi:10.1002/cne.902960312
- Torebjork, H. E., & Hallin, R. G. (1973). Perceptual changes accompanying controlled preferential blocking of A and C fibre responses in intact human skin nerves. *Exp Brain Res*, *16*(3), 321-332. doi:10.1007/BF00233334
- Torebjork, H. E., & Hallin, R. G. (1974). Responses in human A and C fibres to repeated electrical intradermal stimulation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *37*(6), 653-664. doi:10.1136/jnnp.37.6.653
- Treede, R. D., Meyer, R. A., & Campbell, J. N. (1998). Myelinated mechanically insensitive afferents from monkey hairy skin: heat-response properties. *J Neurophysiol*, *80*(3), 1082-1093. doi:10.1152/jn.1998.80.3.1082
- Treede, R. D., Meyer, R. A., Raja, S. N., & Campbell, J. N. (1992). Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. *Prog Neurobiol*, *38*(4), 397-421. doi:10.1016/0301-0082(92)90027-c
- Tsuda, M., Koga, K., Chen, T., & Zhuo, M. (2017). Neuronal and microglial mechanisms for neuropathic pain in the spinal dorsal horn and anterior cingulate cortex. *J Neurochem*, *141*(4), 486-498. doi:10.1111/jnc.14001
- Tuckett, R. P., & Wei, J. Y. (1987a). Response to an itch-producing substance in cat. I. Cutaneous receptor populations with myelinated axons. *Brain Res*, *413*(1), 87-94. doi:10.1016/0006-8993(87)90156-9
- Tuckett, R. P., & Wei, J. Y. (1987b). Response to an itch-producing substance in cat. II. Cutaneous receptor populations with unmyelinated axons. *Brain Res*, *413*(1), 95-103. doi:10.1016/0006-8993(87)90157-0
- Ulrich, D., & Bettler, B. (2007). GABA(B) receptors: synaptic functions and mechanisms of diversity. *Curr Opin Neurobiol*, *17*(3), 298-303. doi:10.1016/j.conb.2007.04.001
- Uta, D., Furue, H., Pickering, A. E., Rashid, M. H., Mizuguchi-Takase, H., Katafuchi, T., . . . 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*(11), 1960-1973. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07255.x
- Valera, A. M., Doussau, F., Poulain, B., Barbour, B., & Isope, P. (2012). Adaptation of granule cell to Purkinje cell synapses to high-frequency transmission. *J Neurosci*, *32*(9), 3267-3280. doi:10.1523/JNEUROSCI.3175-11.2012
- Vallbo, A. B., Olausson, H., & Wessberg, J. (1999). Unmyelinated afferents constitute a second system coding tactile stimuli of the human hairy skin. *J Neurophysiol*, *81*(6), 2753-2763. doi:10.1152/jn.1999.81.6.2753
- van Calker, D., Muller, M., & Hamprecht, B. (1979). Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem*, *33*(5), 999-1005. doi:10.1111/j.1471-4159.1979.tb05236.x

- Varani, K., Vincenzi, F., Merighi, S., Gessi, S., & Borea, P. A. (2017). Biochemical and Pharmacological Role of A1 Adenosine Receptors and Their Modulation as Novel Therapeutic Strategy. *Adv Exp Med Biol*, *1051*, 193-232. doi:10.1007/5584\_2017\_61
- Velez-Fort, M., Audinat, E., & Angulo, M. C. (2012). Central role of GABA in neuron-glia interactions. *Neuroscientist*, *18*(3), 237-250. doi:10.1177/1073858411403317
- Villanueva, L., Bernard, J. F., & Le Bars, D. (1995). Distribution of spinal cord projections from the medullary subnucleus reticularis dorsalis and the adjacent cuneate nucleus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol*, *352*(1), 11-32. doi:10.1002/cne.903520103
- Vincent, P., Armstrong, C. M., & Marty, A. (1992). Inhibitory synaptic currents in rat cerebellar Purkinje cells: modulation by postsynaptic depolarization. *J Physiol*, *456*, 453-471. doi:10.1113/jphysiol.1992.sp019346
- Vincenzi, F., Pasquini, S., Borea, P. A., & Varani, K. (2020). Targeting Adenosine Receptors: A Potential Pharmacological Avenue for Acute and Chronic Pain. *Int J Mol Sci*, *21*(22). doi:10.3390/ijms21228710
- Vitureira, N., Letellier, M., & Goda, Y. (2012). Homeostatic synaptic plasticity: from single synapses to neural circuits. *Curr Opin Neurobiol*, *22*(3), 516-521. doi:10.1016/j.conb.2011.09.006
- von Gersdorff, H., & Borst, J. G. (2002). Short-term plasticity at the calyx of Held. *Nat Rev Neurosci*, *3*(1), 53-64. doi:10.1038/nrn705
- Waldvogel, H. J., Faull, R. L., Jansen, K. L., Dragunow, M., Richards, J. G., Mohler, H., & Streit, P. (1990). GABA, GABA receptors and benzodiazepine receptors in the human spinal cord: an autoradiographic and immunohistochemical study at the light and electron microscopic levels. *Neuroscience*, *39*(2), 361-385. doi:10.1016/0306-4522(90)90274-8
- Wall, M., & Dale, N. (2008). Activity-dependent release of adenosine: a critical re-evaluation of mechanism. *Curr Neuropharmacol*, *6*(4), 329-337. doi:10.2174/157015908787386087
- Wang, X. L., Zhang, H. M., Chen, S. R., & Pan, H. L. (2007). Altered synaptic input and GABAB receptor function in spinal superficial dorsal horn neurons in rats with diabetic neuropathy. *J Physiol*, *579*(Pt 3), 849-861. doi:10.1113/jphysiol.2006.126102
- Wang, X. L., Zhang, Q., Zhang, Y. Z., Liu, Y. T., Dong, R., Wang, Q. J., & Guo, Y. X. (2011). Downregulation of GABAB receptors in the spinal cord dorsal horn in diabetic neuropathy. *Neurosci Lett*, *490*(2), 112-115. doi:10.1016/j.neulet.2010.12.038
- Willis, W. D. (2001). Role of neurotransmitters in sensitization of pain responses. *Ann N Y Acad Sci*, *933*, 142-156. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb05821.x
- Willis, W. D., & Westlund, K. N. (1997). Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol*, *14*(1), 2-31. doi:10.1097/00004691-199701000-00002
- Wilson, P. R., & Yaksh, T. L. (1978). Baclofen is antinociceptive in the spinal intrathecal space of animals. *Eur J Pharmacol*, *51*(4), 323-330. doi:10.1016/0014-2999(78)90423-5
- Woolf, C. J., & Wall, P. D. (1986). Morphine-sensitive and morphine-insensitive actions of C-fibre input on the rat spinal cord. *Neurosci Lett*, *64*(2), 221-225. doi:10.1016/0304-3940(86)90104-7
- Wu, H., Jin, Y., Buddhala, C., Osterhaus, G., Cohen, E., Jin, H., . . . Wu, J. Y. (2007). Role of glutamate decarboxylase (GAD) isoform, GAD65, in GABA synthesis and transport into synaptic vesicles-Evidence from GAD65-knockout mice studies. *Brain Res*, *1154*, 80-83. doi:10.1016/j.brainres.2007.04.008
- Wu, L. G., & Saggau, P. (1997). Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends Neurosci*, *20*(5), 204-212. doi:10.1016/s0166-2236(96)01015-6

- Wu, W. P., Hao, J. X., Halldner, L., Lovdahl, C., DeLander, G. E., Wiesenfeld-Hallin, Z., . . . Xu, X. J. (2005). Increased nociceptive response in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Pain*, *113*(3), 395-404. doi:10.1016/j.pain.2004.11.020
- Xu-Friedman, M. A., & Regehr, W. G. (2004). Structural contributions to short-term synaptic plasticity. *Physiol Rev*, *84*(1), 69-85. doi:10.1152/physrev.00016.2003
- Xu, J., & Wu, L. G. (2005). The decrease in the presynaptic calcium current is a major cause of short-term depression at a calyx-type synapse. *Neuron*, *46*(4), 633-645. doi:10.1016/j.neuron.2005.03.024
- Yaksh, T. L. (1989). Behavioral and autonomic correlates of the tactile evoked allodynia produced by spinal glycine inhibition: effects of modulatory receptor systems and excitatory amino acid antagonists. *Pain*, *37*(1), 111-123. doi:10.1016/0304-3959(89)90160-7
- Yaksh, T. L., & Reddy, S. V. (1981). Studies in the primate on the analgetic effects associated with intrathecal actions of opiates, alpha-adrenergic agonists and baclofen. *Anesthesiology*, *54*(6), 451-467. doi:10.1097/00000542-198106000-00004
- Yamada, K. A., & Tang, C. M. (1993). Benzothiadiazides inhibit rapid glutamate receptor desensitization and enhance glutamatergic synaptic currents. *J Neurosci*, *13*(9), 3904-3915.
- Yamamoto, T., Carr, P. A., Baimbridge, K. G., & Nagy, J. I. (1989). Parvalbumin- and calbindin D28k-immunoreactive neurons in the superficial layers of the spinal cord dorsal horn of rat. *Brain Res Bull*, *23*(6), 493-508. doi:10.1016/0361-9230(89)90195-0
- Yang, H., & Xu-Friedman, M. A. (2008). Relative roles of different mechanisms of depression at the mouse endbulb of Held. *J Neurophysiol*, *99*(5), 2510-2521. doi:10.1152/jn.01293.2007
- Yang, K., Fujita, T., & Kumamoto, E. (2004). Adenosine inhibits GABAergic and glycinergic transmission in adult rat substantia gelatinosa neurons. *J Neurophysiol*, *92*(5), 2867-2877. doi:10.1152/jn.00291.2004
- Yasaka, T., Kato, G., Furue, H., Rashid, M. H., Sonohata, M., Tamae, A., . . . 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*(Pt 2), 603-618. doi:10.1113/jphysiol.2006.123919
- Yasaka, T., Tiong, S. Y., Hughes, D. I., Riddell, J. S., & Todd, A. J. (2010a). 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*(2), 475-488. doi:10.1016/j.pain.2010.08.008
- Yasaka, T., Tiong, S. Y. X., Hughes, D. I., Riddell, J. S., & Todd, A. J. (2010b). 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*(2), 475-488. doi:10.1016/j.pain.2010.08.008
- Yoon, B. E., Woo, J., Chun, Y. E., Chun, H., Jo, S., Bae, J. Y., . . . Lee, C. J. (2014). Glial GABA, synthesized by monoamine oxidase B, mediates tonic inhibition. *J Physiol*, *592*(22), 4951-4968. doi:10.1113/jphysiol.2014.278754
- Yu, X. H., Ribeiro-da-Silva, A., & De Koninck, Y. (2005). Morphology and neurokinin 1 receptor expression of spinothalamic lamina I neurons in the rat spinal cord. *J Comp Neurol*, *491*(1), 56-68. doi:10.1002/cne.20675
- Zacharova, G., Sojka, D., & Palecek, J. (2009). Changes of parvalbumin expression in the spinal cord after peripheral inflammation. *Physiol Res*, *58*(3), 435-442. doi:10.33549/physiolres.931513
- Zeilhofer, H. U. (2005). The glycinergic control of spinal pain processing. *Cell Mol Life Sci*, *62*(18), 2027-2035. doi:10.1007/s00018-005-5107-2

- Zeilhofer, H. U., Wildner, H., & Yevenes, G. E. (2012). Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiol Rev*, 92(1), 193-235. doi:10.1152/physrev.00043.2010
- Zhang, D. X., Owens, C. M., & Willis, W. D. (1991). Two forms of inhibition of spinothalamic tract neurons produced by stimulation of the periaqueductal gray and the cerebral cortex. *J Neurophysiol*, 65(6), 1567-1579. doi:10.1152/jn.1991.65.6.1567
- Zhang, E. T., & Craig, A. D. (1997). Morphology and distribution of spinothalamic lamina I neurons in the monkey. *J Neurosci*, 17(9), 3274-3284.
- Zhang, M., Dai, Q., Liang, D., Li, D., Chen, S., Chen, S., . . . Wang, J. (2018). Involvement of adenosine A1 receptor in electroacupuncture-mediated inhibition of astrocyte activation during neuropathic pain. *Arq Neuropsiquiatr*, 76(11), 736-742. doi:10.1590/0004-282X20180128
- Zhang, W., Liu, L. Y., & Xu, T. L. (2008). Reduced potassium-chloride co-transporter expression in spinal cord dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity in rats. *Neuroscience*, 152(2), 502-510. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.12.037
- Zheng, J., Lu, Y., & Perl, E. R. (2010). Inhibitory neurones of the spinal substantia gelatinosa mediate interaction of signals from primary afferents. *J Physiol*, 588(Pt 12), 2065-2075. doi:10.1113/jphysiol.2010.188052
- Zheng, W., Xie, W., Zhang, J., Strong, J. A., Wang, L., Yu, L., . . . Lu, L. (2003). Function of gamma-aminobutyric acid receptor/channel rho 1 subunits in spinal cord. *J Biol Chem*, 278(48), 48321-48329. doi:10.1074/jbc.M307930200
- Zhou, Y. Q., Chen, S. P., Liu, D. Q., Manyande, A., Zhang, W., Yang, S. B., . . . Tian, Y. K. (2017). The Role of Spinal GABAB Receptors in Cancer-Induced Bone Pain in Rats. *J Pain*, 18(8), 933-946. doi:10.1016/j.jpain.2017.02.438
- Zilberter, Y. (2000). Dendritic release of glutamate suppresses synaptic inhibition of pyramidal neurons in rat neocortex. *J Physiol*, 528(Pt 3), 489-496. doi:10.1111/j.1469-7793.2000.00489.x
- Zilberter, Y., Kaiser, K. M., & Sakmann, B. (1999). Dendritic GABA release depresses excitatory transmission between layer 2/3 pyramidal and bitufted neurons in rat neocortex. *Neuron*, 24(4), 979-988. doi:10.1016/s0896-6273(00)81044-2
- Zimmermann, G., Zhou, D., & Taussig, R. (1998). Genetic selection of mammalian adenylyl cyclases insensitive to stimulation by Gsalpha. *J Biol Chem*, 273(12), 6968-6975. doi:10.1074/jbc.273.12.6968
- Zou, W., Song, Z., Guo, Q., Liu, C., Zhang, Z., & Zhang, Y. (2011). Intrathecal lentiviral-mediated RNA interference targeting PKCgamma attenuates chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Hum Gene Ther*, 22(4), 465-475. doi:10.1089/hum.2010.207
- Zucker, R. S. (1973). Changes in the statistics of transmitter release during facilitation. *J Physiol*, 229(3), 787-810. doi:10.1113/jphysiol.1973.sp010167
- Zucker, R. S., & Regehr, W. G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol*, 64, 355-405. doi:10.1146/annurev.physiol.64.092501.114547
- Zylka, M. J. (2011). Pain-relieving prospects for adenosine receptors and ectonucleotidases. *Trends Mol Med*, 17(4), 188-196. doi:10.1016/j.molmed.2010.12.006



## Résumé en français suivi des mots-clés en français

Insérer votre résumé en français (1000 caractères maximum) suivi des mots-clés en français

Les informations nociceptives en provenance de la périphérie sont traitées dans la corne dorsale de la moelle épinière, puis elles sont projetées aux centres supra-spinaux où la perception douloureuse pourra être élaborée. L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier les phénomènes de plasticité synaptique à court-terme (STP) des synapses inhibitrices entre les neurones de la lamina II de la corne dorsale de la moelle épinière en réalisant des enregistrements électrophysiologiques. Les résultats obtenus indiquent 1) que les connexions GABAergiques entre les neurones de la lamina II expriment des mécanismes de STP qui diffèrent suivant la fréquence de stimulation du neurone présynaptique, 2) ainsi que selon la nature du neurone postsynaptique, 3) que ces plasticités mettent en jeu l'activation de récepteurs GABAB et/ou A1 et 4) que ces plasticités sont modifiées en conditions d'inflammation périphérique.

Les STP mises en évidence pourraient avoir un impact sur la balance excitation/inhibition. Ces plasticités et leur modulation par les récepteurs GABAB et A1 pourraient représenter des cibles pour le développement de stratégies analgésiques.

**Mots clés :** Plasticité synaptique, balance inhibition-excitation, moelle épinière, informations nociceptive, inflammation GABA, adénosine

## Résumé en anglais suivi des mots-clés en anglais

Insérer votre résumé en anglais (1000 caractères maximum) suivi des mots-clés en anglais

Networks of the dorsal horn of the spinal cord process nociceptive information from the periphery. Using electrophysiological recordings, the present work aimed to define the short-term plasticity (STP) of lamina II neurons inhibitory connections. The results obtained indicate 1) that GABAergic connections between the lamina II neurons express STP mechanisms that differ according to the frequency of stimulation of the presynaptic neuron, 2) as well as according to the nature of the postsynaptic neuron, 3) that these plasticities involve the activation of GABAB and/or A1 receptors and 4) that those plasticities are modified under peripheral inflammatory conditions.

Target-specific and frequency-specific plasticities could then tune the balance between inhibition and disinhibition while processing frequency-coded information from primary afferents. These short-term plasticities and their modulation by A1 and GABAB receptors might represent an interesting target in pain-alleviating strategies.

**Keywords :** Synaptic plasticity, excitation–inhibition balance, spinal cord, nociceptive information processing, GABA, adenosine