



HAL
open science

Effets de la noradrénaline sur les transmissions synaptiques dans la corne dorsale de la moelle épinière de rat

Frederik Seibt

► **To cite this version:**

Frederik Seibt. Effets de la noradrénaline sur les transmissions synaptiques dans la corne dorsale de la moelle épinière de rat. Neurobiologie. Université de Strasbourg, 2015. Français. NNT : 2015STRAJ029 . tel-01362942

HAL Id: tel-01362942

<https://theses.hal.science/tel-01362942>

Submitted on 9 Sep 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

UPR 3212 CNRS

THÈSE présentée par :

Frederik Seibt

soutenue le : **7 juillet 2015**

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

Discipline/ Spécialité : **Neurosciences**

**Effets de la noradrénaline sur les transmissions
synaptiques dans la corne dorsale de la moelle
épineière de rat**

THÈSE dirigée par :

M. Rémy Schlichter

Professeur, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. Éric Boué-Grabot

M. Serge Charpak

Directeur de recherches CNRS, Université de Bordeaux

Directeur de recherches INSERM, Université Paris Descartes

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. Bernard Poulain

M. Jean-Marc Fritschy

Directeur de recherches CNRS, Université de Strasbourg

Professeur, Université de Zurich

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Rémy. Votre engagement, votre disponibilité, votre optimisme en tant que directeur de thèse ont fait que j'ai beaucoup apprécié travailler à vos côtés. Merci de m'avoir transmis ce goût pour la science. La science noble et honnête. Merci pour ces discussions de résultats, d'articles, d'idées, de théories, de manips à faire et à tenter. C'est dans ces moments d'échange au détour d'un couloir, penchés sur des graphiques, ou autours d'un enregistrement électrophysiologique que j'ai eu la chance de faire ce que je considère, comme étant de la science.

Mais la science ce n'est pas que l'électrophysiologie. Merci Sylvain pour ces nombreuses discussions et explications autour de tout. De l'astronomie à Wagner, en passant par les coléoptères, les théorèmes mathématiques et les blagues de comptoir. J'ai beaucoup appris de toi et j'ai beaucoup apprécié tous ces moments où nous étions des savants.

Merci à Hugues qui m'a appris le patch. C'est sur des bases solides que j'ai pu développer mes compétences, bricoler, démonter, déménager et finalement optimiser un poste d'électrophysiologie.

Merci Jean-Luc, grâce à vous je comprends les statistiques (à peu près), et n'oublierai jamais l'intérêt fondamental d'une question, ni sa réalité physique.

Merci à toute l'équipe qui a contribué autour de moments, de discussions simples ou plus complexes, à créer un cadre dans lequel il a été très agréable de travailler pendant ces années. Merci à Catherine, Stéphane, Matilde, Perrine et Chantal.

Merci aux collègues thésards. J'ai eu la chance de passer la majeure partie de ma thèse entouré de gens intéressants et rigolos, qui sont devenus des amis. Merci à Florent, Salim, Romain, Audrey, Matthieu, Vivien, Edith, Bruce, Taddy, Jérôme, Mari, et d'autres.

Merci aux amis moins scientifiques. Toujours là. Loyaux, marrants, cons, indestructibles. Les gros. Pour boire des bières au soleil, ou tenir des bougies sous la pluie. Zusammen.

Merci à mes parents d'avoir su m'élever, aux frangins d'avoir grandi avec moi, aux anciens d'avoir su m'inspirer.

Merci à celle qui donne du sens. À tout.

Aux titans de l'ancien monde

Table des matières

Liste d'abréviations :	1
INTRODUCTION	2
I. Le système somatosensoriel spinal	3
1. Afférences sensorielles primaires.....	4
Propriétés des fibres A β , A δ et C.....	5
Projection des fibres afférentes primaires cutanées vers la CDME.....	6
2. Organisation de la corne dorsale de la moelle épinière	6
Cytoarchitecture des laminae de la corne dorsale.....	7
Communication entre laminae dans la CDME	10
Aspect neurochimique et fonctionnel des laminae de la corne dorsale	11
3. Voies ascendantes.....	16
4. Modulation des messages nociceptifs et contrôles descendants.....	18
Résumé de la première partie :.....	21
II. Le système noradrénergique	22
1. Adrénocepteurs	23
Localisation	23
Localisation des adrénocepteurs dans la moelle épinière.....	24
Expression gliale des adrénocepteurs	26
2. Contrôles descendants noradrénergiques.....	28
Source de noradrénaline dans la moelle épinière.....	28
Mode de communication dans le système noradrénergique.....	29
Effets de la NA dans la corne dorsale de la moelle épinière	30
Conclusion sur le système noradrénergique spinal.....	35
Objectifs de la thèse	36

MATÉRIEL ET MÉTHODES	37
1. Animaux utilisés	37
2. Dissection et réalisation des tranches de moelle épinière	37
3. Enregistrements électrophysiologiques.....	38
a) Pipettes.....	38
b) Solutions	39
c) Dispositif expérimental et déroulement des enregistrements électrophysiologiques	39
Acquisition des données	41
Analyse des données	41
d) Révélation immunohistochimique des neurones enregistrés	43
4. Tests comportementaux	44
5. Statistiques.....	45
RÉSULTATS	46
I. Glia to neuron communication underlies Noradrenaline-induced facilitation of inhibitory synaptic transmission in the dorsal horn of the spinal cord	48
II. Effet de la NA sur la transmission synaptique dans la lamina II de la CDME ..	75
Effets de la NA et des agonistes noradrénergiques sur la transmission synaptique inhibitrice dans la lamina II	76
Effets des agonistes des adrénoccepteurs	76
III. Comparaison des effets de la dopamine et de la noradrénaline sur la transmission synaptique inhibitrice dans les couches III-IV de la CDME	77
1) Effet de la dopamine sur la transmission synaptique inhibitrice	79
2) Effet des antagonistes des adrénoccepteurs	79
3) Effet du fluorocitrate.....	80
4) Effet des agonistes et antagonistes des récepteurs de la dopamine sur la transmission synaptique inhibitrice (données préliminaires).....	80

IV. Contribution des cellules gliales à la modulation des réseaux nerveux contrôlant la sensibilité nociceptive	81
1) Effets du FC sur la facilitation de la transmission synaptique par la capsaïcine dans la CDME	82
2) Effets du FC sur la sensibilité nociceptive mécanique et thermique	83
DISCUSSION	85
I. Aspects méthodologiques	85
Conditions d'enregistrement et application des substances	85
Expériences de section	86
Fluorocitrate, cellules gliales et transmission synaptique	87
II. Effets de la NA	87
III. Effets pré et/ou postsynaptiques de la NA	88
IV. Propriétés pharmacologiques des effets de la NA dans les laminae III-IV et V	89
V. Analgésie comportementale et récepteurs α_2	90
VI. Implication de la NA endogène	91
VII. Réseau neuro-glial spinal	92
1) Importance de la glie	92
2) Réseau modulé par la NA	95
VIII. Relations entre les systèmes noradrénergiques et dopaminergiques spinaux	101
Conclusion	102
Perspectives	103
1. Rôle des récepteurs α_2 gliaux dans la nociception	103
2. Transfert d'informations des laminae profondes aux laminae superficielles par un réseau glial	104
3. Identification des messagers impliqués dans la communication glie-neurone	104
4. Stimulation optogénétique des fibres noradrénergiques	105
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	106

Liste d'abréviations :

AMPA : α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionate

ACSF : artificial cerebrospinal fluid

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

APV : D-2-amino-5-phosphonovalerate

CDME : corne dorsale de la moelle épinière

CGRP : calcitonin gene-related peptide

CNQX : 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione

CPSEs : courant postsynaptique excitateur spontané

CPSIs : courant postsynaptique inhibiteur spontané

DA : dopamine

GABA : acide gamma-amino-butyrique

IB4 : isolectine B4

LC : locus cœruleus

NA : noradrénaline

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

PA : potentiel d'action

PAG : substance grise périaqueducule

PKC γ : protéine kinase C de type gamma

SNC : système nerveux central

TRPV1 : transient receptor potential vanilloïde 1

TTX : tétrodotoxine

WDR : wide dynamic range

INTRODUCTION

Au cours de l'évolution, différents systèmes sensoriels complexes ont été sélectionnés. Ils assurent la collecte d'informations en provenance de l'extérieur et de l'intérieur de l'organisme et sont nécessaires à la survie et à l'adaptation de l'individu à son environnement. L'un de ces systèmes s'est spécialisé dans la détection d'informations somatosensorielles. Parmi ces informations, certaines sont nocives et potentiellement dommageables pour l'organisme, nous parlons alors d'informations nociceptives. Le système nociceptif, qui détecte ces informations préjudiciables à l'organisme, est composé de réseaux nerveux spinaux et supraspinaux. La communication entre les différents éléments de ce système est essentielle pour le traitement des informations sensorielles détectées par l'organisme, la modulation des informations nociceptives et l'élaboration de la sensation de douleur. Une partie importante de ce processus se fait dans la moelle épinière, plus précisément dans la corne dorsale de la moelle épinière (CDME) où transitent les différents messages sensoriels acheminés par les afférences primaires. Les réseaux nerveux de la CDME jouent un rôle primordial dans la manière dont nous percevons notre environnement.

L'étude de la structure et du fonctionnement de ces réseaux est au cœur des projets de recherche menés par notre laboratoire.

I. Le système somatosensoriel spinal

La CDME est une région clé du système nerveux central dans laquelle les informations sensorielles sont intégrées et relayées vers les centres supraspinaux. Au niveau spinal, à l'inverse de l'encéphale, c'est la substance blanche qui entoure la substance grise. Cette dernière comprend les corps cellulaires des neurones spinaux. Des différences morphologiques (taille et forme du corps cellulaire, organisation de l'arbre dendritique, densité cellulaire) suivant l'axe dorso-ventral ont été observées par Rexed et l'ont conduit à proposer une classification de la substance grise en laminae (Rexed, 1952). Les laminae I à VI forment la CDME en s'organisant dans un axe dorso-ventral, la lamina I étant la plus dorsale.

Les informations sensorielles d'origine périphérique sont acheminées par les fibres afférentes primaires qui projettent vers la moelle épinière. Ces fibres peuvent être classées selon différents critères tels que la vitesse de conduction ou le type de modalité sensorielle véhiculée. Deux groupes fonctionnels de fibres peuvent être ainsi distingués : les fibres non nociceptives (majoritairement les fibres de type $A\beta$) véhiculant de l'information non nociceptive thermique, mécanique tactile et proprioceptive (pression, vibration) et les fibres nociceptives (principalement C et $A\delta$) qui acheminent des informations liées aux stimulations potentiellement dommageables pour l'organisme (chimiques, thermiques et/ou mécaniques). Ces stimuli sont détectés au niveau de la peau, des articulations, des viscères et des muscles.

La plupart des axones des afférences primaires nociceptives ont un petit diamètre et sont faiblement myélinisés pour les fibres $A\delta$ ou non myélinisés pour les fibres C. Les projections nociceptives vers la CDME se font majoritairement vers les laminae les plus superficielles, I et II, ainsi que vers la lamina V, plus profonde.

Les fibres afférentes primaires se terminant dans les laminae III-IV sont essentiellement de type $A\beta$ formées d'axones de gros diamètre et fortement myélinisés. Ces fibres transmettent des informations non nociceptives mécaniques à bas seuil.

L'innervation de la CDME par les afférences sensorielles primaires s'effectue selon une

organisation somatotopique (Millan, 1999).

Les réseaux formés par les neurones de la CDME participent au traitement des différentes modalités sensorielles. Les neurones qui répondent uniquement à des stimulations nociceptives et/ou à des stimulations thermiques non-nociceptives sont localisés majoritairement dans les laminae les plus superficielles (I-II). La plupart des neurones des laminae III-IV reçoivent directement des informations non-nociceptives et la lamina V se distingue des laminae plus superficielles en possédant le plus grand contingent de neurones à convergence (dans la littérature : neurone WDR pour Wide Dynamic Range), recevant à la fois des informations nociceptives et non-nociceptives.

Dans la première partie de cette introduction nous présenterons ce système neuronal de la CDME en nous intéressant successivement à ses entrées (afférences primaires sensorielles), son organisation intrinsèque (cytoarchitecture, neurochimie, réseau), puis ses sorties (voies ascendantes). Dans la deuxième partie de l'introduction nous présenterons des données de la littérature concernant la modulation de ces réseaux neuronaux de la CDME par le système noradrénergique.

1. Afférences sensorielles primaires

Les stimuli nociceptifs sont détectés et convertis en signaux électriques par les terminaisons périphériques libres de neurones sensoriels primaires. Ces neurones sont appelés « nocicepteurs » et l'étape de conversion du stimulus physique (mécanique, thermique, chimique) en un signal électrique correspond à la transduction sensorielle. Comme pour les autres neurones sensoriels primaires, les corps cellulaires des nocicepteurs sont localisés dans les ganglions crâniens pour les informations en provenance de la face, et dans les ganglions rachidiens (en anglais : DRG pour Dorsal Root Ganglion) en ce qui concerne les informations en provenance du tronc, des membres et des viscères. Ces neurones sensoriels sont des neurones pseudo-unipolaires en « T ». Ils possèdent deux branches d'axone, l'une périphérique innervant les tissus cibles (peau, articulations muscles, viscères) et l'autre dite « centrale » projetant vers la moelle épinière ou le tronc cérébral. Leur corps cellulaire est placé en dérivation sur cet axone.

Après transduction, l'information nociceptive donne lieu à un potentiel générateur,

dont l'amplitude dépend de l'intensité du stimulus sensoriel. Lorsque l'amplitude de ce potentiel générateur est suffisante, des potentiels d'action se déclenchent. Leur fréquence et la durée de la décharge des potentiels d'action codent l'intensité et la durée du stimulus (Woolf et Ma, 2007). Ces potentiels d'action se propagent le long de l'axone du nocicepteur jusqu'à la moelle épinière ou jusqu'au tronc cérébral.

Les terminaisons centrales des nocicepteurs établissent des contacts synaptiques avec des interneurons locaux et/ou des neurones de projection à destination supraspinale dans les laminae I et V de la CDME pour les fibres A δ , et les laminae I, II et X pour les fibres C (Besson et al., 1982; Brown, 1982; Millan, 1999).

Propriétés des fibres A β , A δ et C

Trois types de fibres afférentes primaires sont classiquement distinguées : le type A β / α , le type A δ et le type C. Ces types de fibres sont définis selon leur vitesse de conduction des messages nerveux qui est directement liée au diamètre et au degré de myélinisation des axones. Les afférences du type A β / α présentent la plus grande vitesse de conduction (35 à 100 mètres par seconde, diamètre de l'axone >10 μ m) et sont fortement myélinisées. Les fibres du type A δ présentent une vitesse de conduction intermédiaire (5 à 35 mètres par seconde, diamètre de l'axone 2 à 6 μ m), et les fibres C ont une vitesse de conduction faible (<2 m/s, diamètre de l'axone 0,4 à 1,2 μ m) (Millan, 1999; Zigmond et al., 1999).

Les terminaisons présynaptiques des fibres afférentes primaires utilisent le glutamate comme neurotransmetteur principal. En plus de leurs différences morphologiques, les fibres afférentes primaires peuvent aussi être classées selon divers marqueurs neurochimiques. Nous distinguons ainsi les fibres C peptidergiques et non peptidergiques. Les fibres C représenteraient 70 % du total des fibres sensorielles cutanées chez le rat, et les fibres A β et A δ 10 % et 20 % respectivement (Brown, 1982; Averill et al., 1995; Todd, 2010; Braz et al., 2014). Ces proportions peuvent varier selon les espèces (Lynn, 1984). Il existe cependant des exceptions : 20 % des fibres A β sont des nocicepteurs (Djoughri et Lawson, 2004); de même, l'information non-nociceptive (thermique ou mécanique) peut être véhiculée par une sous-population de fibres C à bas seuil (Alvarez et Fyffe, 2000) et une sous-population de petites fibres A δ (Braz et al., 2014). Ainsi, l'acheminement des

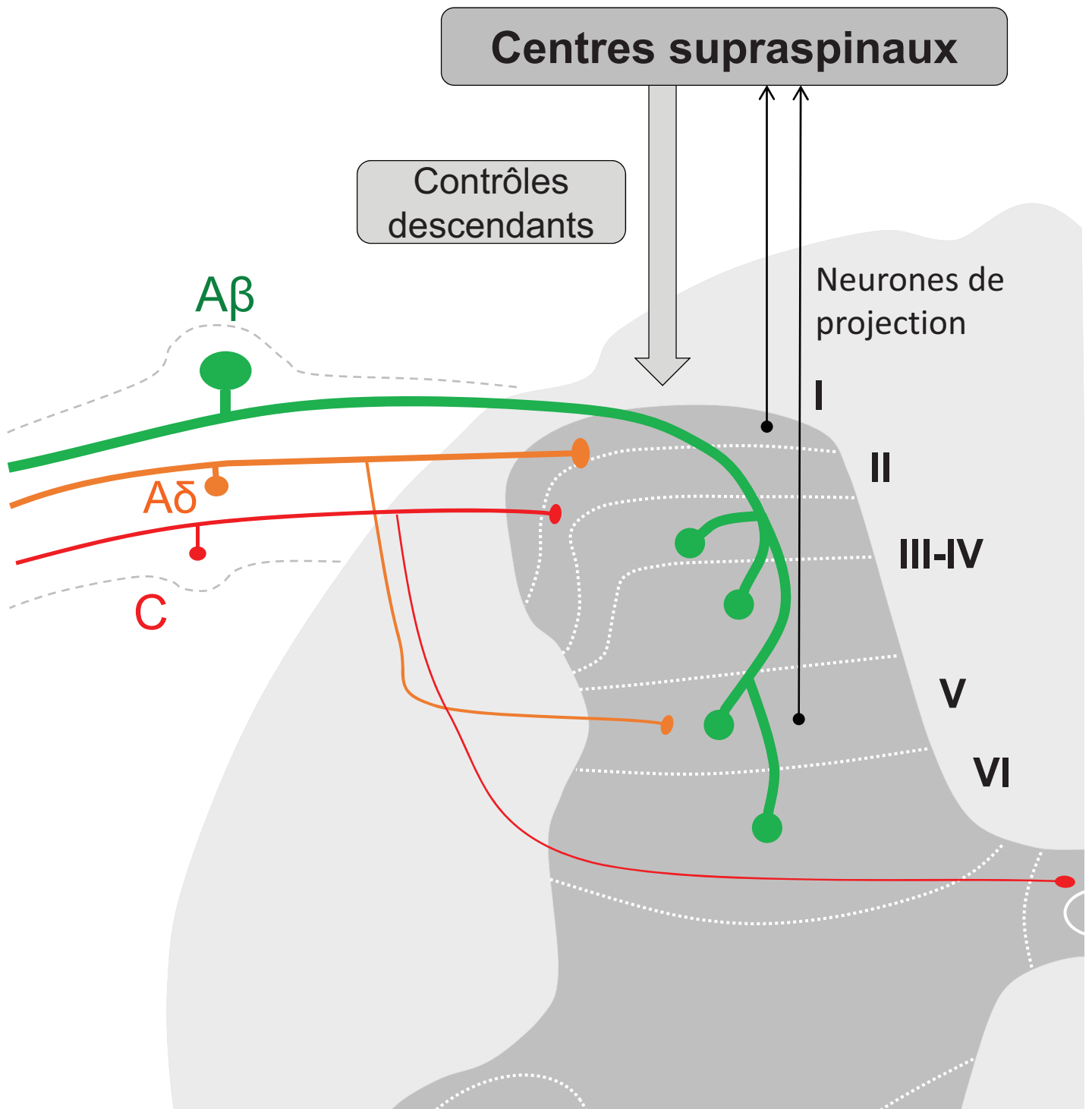


Figure 1. Le système nociceptif spinal

Les six laminae de la CDME sont illustrées et numérotées avec des chiffres romains. Les informations nociceptives sont acheminées vers la CDME par les fibres A δ et C. Les fibres C s'articulent essentiellement dans les laminae II et X tandis que les fibres A δ font synapses dans les laminae I et V. Les neurones projetant vers les centres supraspinaux sont principalement localisés dans les laminae I et V. Des structures supraspinales (telles que le LC) exercent en retour un contrôle sur le système nociceptif spinal (contrôles descendants). Le trajet des axones de projection vers les structures supraspinales indiqué ne correspond pas à la réalité. Il a été modifié pour la représentation schématique. En réalité les axones décussent au niveau spinal et projettent vers les structures supraspinales via le tractus antéro-latéral ou controlatéral.

différentes modalités sensorielles n'est pas strictement lié à un type de fibre sensorielle.

Projection des fibres afférentes primaires cutanées vers la CDME

Chez le rat, les terminaisons centrales des afférences primaires contactent les neurones de la CDME selon une organisation précise (Figure 1). Des collatérales des fibres A β , dont les branches principales projettent vers les noyaux des cordons dorsaux (noyaux gracile et cunéen) situés dans la moelle allongée, font synapse avec des cellules des laminae III-VI de la CDME (Brown, 1982) avec dans certains cas des extensions dans la lamina II interne (Woodbury et Koerber, 2003). Les fibres nociceptives de type A δ contactent des neurones des laminae I, V et X (Light et Perl, 1979). Il faut noter que chez la souris les mécano-nocicepteurs myélinisés de type A β et A δ s'arborescent dans toutes les laminae de CDME (Woodbury et al., 2008). Les fibres nociceptives de type C et A δ contenant des neuropeptides (Calcitonin gene-related peptide (CGRP), substance P) projettent dans les laminae I et II externe, alors que la plupart des fibres nociceptives non peptidergiques liant l'isolectine B4 (IB4) se terminent dans la partie la plus dorsale de la lamina II interne (Todd, 2010).

2. Organisation de la corne dorsale de la moelle épinière

Une des premières études portant sur la substance grise de la CDME a permis la description de la substance gélatineuse par Rolando sur des coupes de moelle épinière traitées à l'alcool (Rolando, 1809; Naderi et al., 2004). Avec l'apparition des marquages cellulaires, Clarke, Waldeyer, Ramon y Cajal puis Rexed ont établi la description anatomique en couches, ou laminae (feuillet), de la moelle épinière que nous connaissons aujourd'hui. La classification établie par Rexed en 1952 repose sur la densité des corps cellulaires, la morphologie, et la taille des arborisations dendritiques des neurones (Figures 2 et 3). Cette classification se fonde sur les propriétés cytoarchitecturales des neurones dans un plan transversal de la moelle épinière et dénombre dix laminae. Les six premières laminae sont arrangées l'une en dessous de l'autre dans le plan dorso-ventral et forment la CDME. Les laminae VII-IX présentent des amas de corps cellulaires qui sont regroupés dans la corne ventrale de la moelle épinière. La lamina X entoure le canal de l'épendyme.

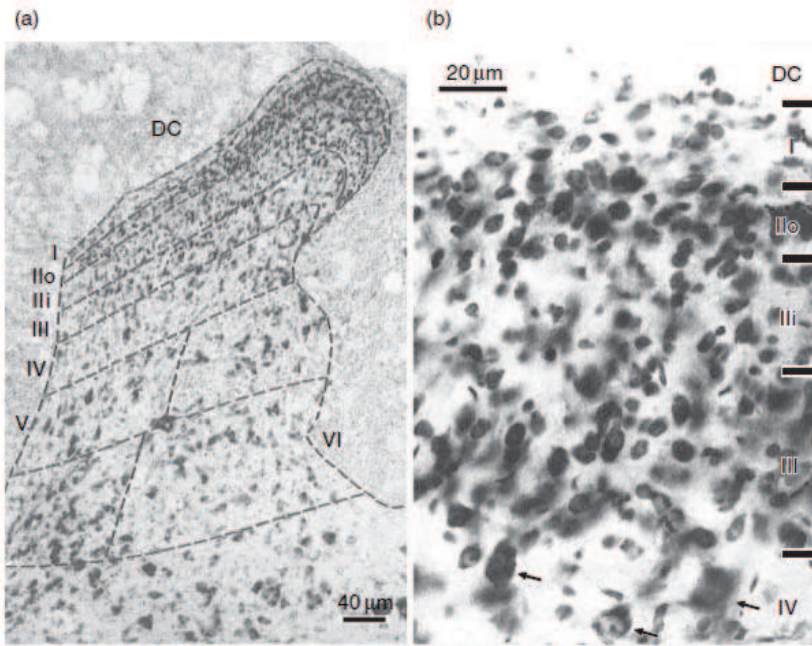
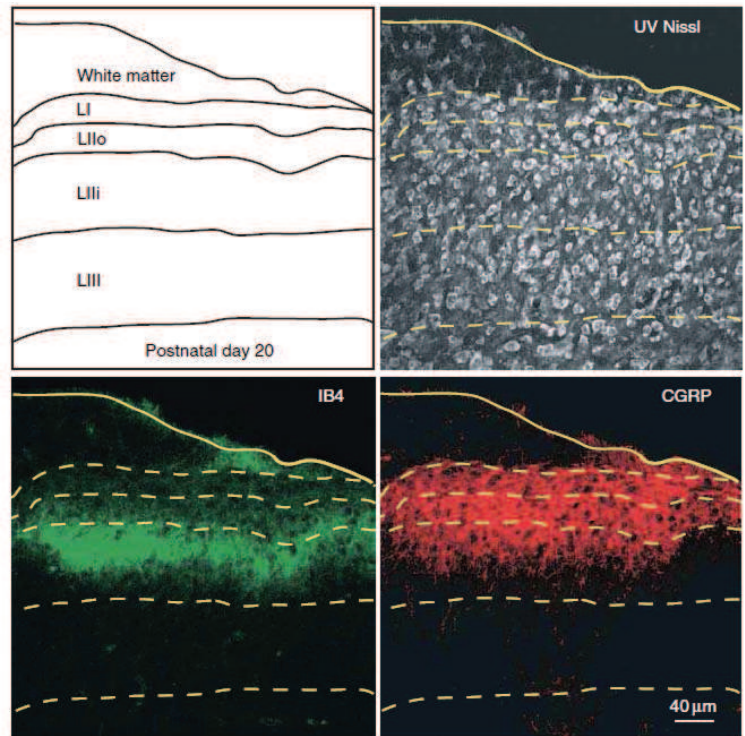


Figure 2. Les laminae de Rexed

Photos de coupes transversales de moelle épinière de rat au niveau C4. Le tissu est marqué avec du bleu de toluidine. (a) organisation laminaire générale de la moelle épinière. (b) Illustration de la forte densité de corps cellulaires dans les laminae superficielles de la CDME (reporté de Ribeiro-da-Silva et De Koninck, 2008).

Figure 3. Laminations de Rexed et projections des fibres nociceptives IB4- et CGRP-positives chez un jeune rat

Laminations de Rexed au niveau L5 de la moelle épinière d'un rat de 20 jours. Photographies représentant la fusion de plusieurs sections optiques. Le marquage de Nissl est utilisé pour délimiter les laminae de Rexed (en-haut à gauche) et superposer cette délimitation avec les immunomarquages contre le CGRP et l'IB4. Les photos du bas montrent que les marquages CGRP (L I, II externe et II interne dorsale) et IB4 (L II externe et II interne) sont répartis différemment dans les laminae superficielles de la CDME (Ribeiro-da-Silva et De Koninck, 2008).



Cytoarchitecture des laminae de la corne dorsale

a) La lamina I

La lamina I de la CDME, ou zone marginale de Waldeyer, se caractérise par la présence d'un plexus dense d'axones orientés parallèlement à la surface de la moelle épinière (Ralston, 1979). Elle contient des neurones de projection qui présentent des corps cellulaires d'une surface supérieure à 200 μm^2 et des interneurons avec un corps cellulaire d'une surface inférieure à 200 μm^2 (Al Ghamdi et al., 2009) dont les dendrites sont orientés de manière rostro-caudale et qui restent majoritairement confinés à la lamina I. Morphologiquement, les neurones de la lamina I peuvent être classés en trois catégories : les neurones fusiformes, pyramidaux et multipolaires (Lima et Coimbra, 1986; Zhang et al., 1996). Les neurones de projection de cette lamina représentent la sortie majeure de la CDME vers les centres supraspinaux : thalamus, tronc cérébral, PAG (substance grise périaqueducule), noyau parabrachial, formation réticulée bulbaire et mésencéphalique, colliculus supérieur, hypothalamus, locus cœruleus (Brown, 1982; Craig, 1992; D'Mello et Dickenson, 2008).

On y trouve principalement des neurones nociceptifs qui vont être activés par les fibres A δ et C, répondant fortement, souvent de façon soutenue, à des stimuli nociceptifs thermiques et mécaniques. Ces neurones présentent une corrélation morphologie-fonction chez le chat. Les cellules fusiformes sont nociceptives-spécifiques, les cellules pyramidales thermoceptives-spécifiques, les cellules multipolaires sont polymodales ou nociceptives-spécifiques (Han et al., 1998).

b) La lamina II

La lamina II de la moelle épinière (la substance gélatineuse de Rolando) apparaît comme un croissant translucide en microscopie optique en raison de sa faible teneur en myéline et du nombre important de corps cellulaires de petit diamètre (~10 μm chez le rongeur) qu'on y trouve. Les neurones de la lamina II présentent un vaste système de collatérales d'axones locaux projetant rostralement, caudalement ou médialement vers les laminae I-III (Li et al., 1999). On trouve des neurones présentant des aspects morphologiques variés dont les trois principaux types sont les cellules en tige, les cellules en îlot et les cellules centrales (Figures 4 et 5) (Ramón y Cajal, 1899; Gobel, 1975, 1978). Les

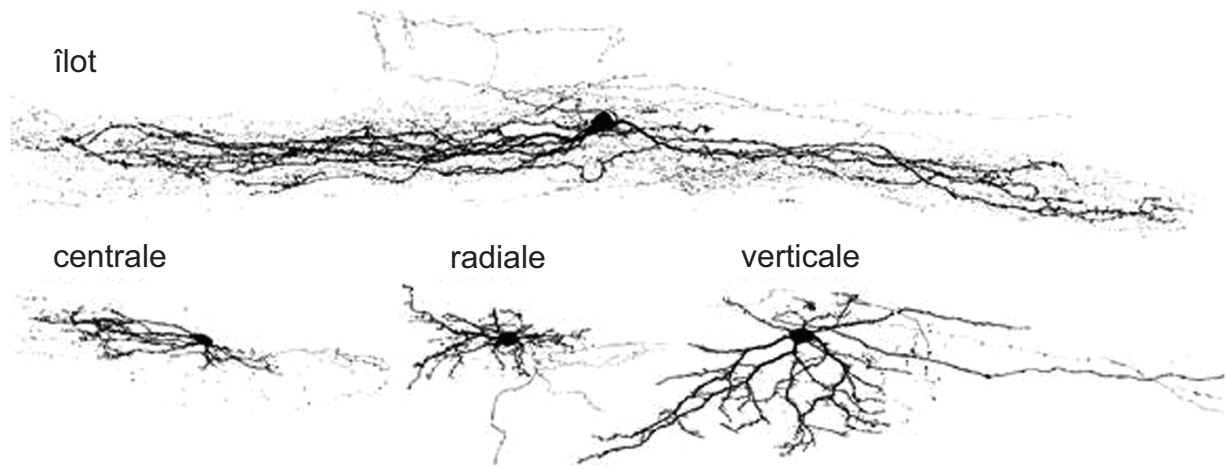


Figure 4. Caractéristiques morphologiques des principaux types de neurones des laminae superficielles de la CDME

Illustration des principaux types morphologiques d'interneurones de la lamina II de la CDME selon un plan sagittal. Les cellules en **îlot** ont l'arborisation dendritique la plus longue, prolongeant leurs axones et leurs dendrites rostro-caudalement dans la lamina où se situe leur corps cellulaire. Les cellules **centrales** présentent une arborisation rostro-caudale laminaire moins importante que les cellules en îlot. Les cellules **verticales** ont un arbre dendritique complexe et ramifié qui s'étend largement dorso-ventralement aux travers des laminae de la CDME où elles reçoivent des entrées synaptiques de différents neurones locaux et des fibres afférentes primaires. Les cellules **radiales** ont un arbre dendritique réduit et leur axone est plus ou moins dirigé. Les cellules en îlot sont exclusivement inhibitrices, les cellules verticales et radiales sont majoritairement glutamatergiques, les cellules centrales peuvent être excitatrices ou inhibitrices (reproduit de Braz et al., 2014).

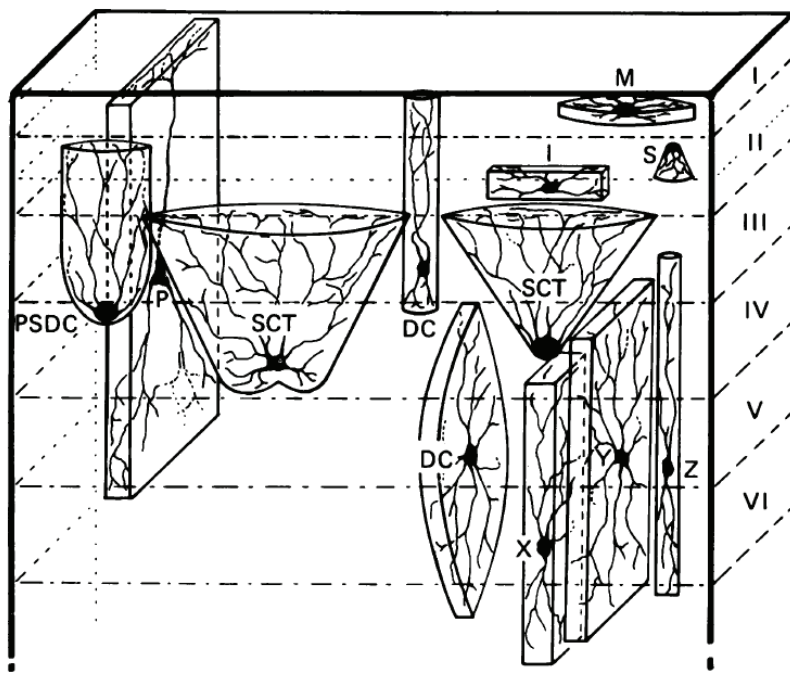


Figure 5. Représentation schématique de la morphologie et des prolongements dendritiques des interneurones de la CDME

Illustration des interneurones de la CDME représentés dans un bloc parasagittal de tissu de moelle épinière de chat. I : cellule en îlot, M : cellule marginale de la lamina I, P : cellule pyramidale de la lamina III, PSDC : trois principaux types de neurones envoyant des axones vers les colonnes dorsales, S : cellule en panier de la lamina II, SCT : cellules du tractus spino-cervical, X, Y et Z : interneurones des laminae V et VI. Les chiffres romains (à droite) indiquent les numéros des laminae de Rexed (reproduit de Brown, 1982).

caractéristiques morphologiques, neurochimiques et électrophysiologiques des interneurons de la lamina II sont hétérogènes et ne peuvent pas directement être corrélées avec leurs propriétés/rôles physiologiques (Yasaka et al., 2010).

La lamina II peut être subdivisée en deux régions : la lamina II externe (lamina IIo pour lamina II outer ou IIext) qui est contactée par des afférences nociceptives de type C contenant des neuropeptides (substance P, CGRP) et la lamina II interne (lamina Ili pour lamina II inner ou IIint) qui reçoit des afférences nociceptives de type C non peptidergiques et C bas-seuil, ainsi que des afférences non nociceptives de type A β (Price et al., 1979; Millan, 1999; Braz et al., 2014). La lamina II n'est pas un simple lieu de relais de l'information nociceptive ; elle assure surtout un rôle fondamental dans l'intégration et la modulation de cette information avant son acheminement vers les centres supraspinaux.

Étant donné que les fibres afférentes véhiculant l'information nociceptive projettent majoritairement vers la lamina II, celle-ci a fait l'objet de la majorité des études électrophysiologiques réalisées dans le but de comprendre la manière dont ces cellules intègrent les informations nociceptives et la manière dont ce phénomène est modulé par les contrôles descendants (voir partie 4 de l'introduction) d'origine supraspinale.

c) Les laminae III-IV

Les laminae III-IV (nucleus proprius ou noyau propre de la CDME) se distinguent de la lamina II par la présence d'un plexus de nombreuses fibres myélinisées. On y trouve avec une densité faible des corps cellulaires et des neurones de projection de deux types : ceux qui expriment et ceux qui n'expriment pas les récepteurs NK1 des neurokinines (Al-Khater et al., 2008). Les corps cellulaires des interneurons locaux sont plus grands que ceux des interneurons de la lamina II et ont une arborisation dendritique soit rostro-caudale restant confinée à la lamina III, soit dorso-ventrale traversant les limites des laminae supérieures et profondes. Ces interneurons reçoivent des informations à partir d'afférences non nociceptives projetant vers les laminae III-IV et d'afférences nociceptives se terminant dans les laminae I, II ou V. La transmission synaptique inhibitrice prépondérante dans les laminae III-IV est la transmission glycinergique (Inquimbert et al., 2007; Schneider, 2008).

Ces deux laminae que l'on considère en général comme une seule entité fonctionnelle sont parfois décrites comme une structure de transition entre les laminae superficielles (I,II) et les laminae profondes (V et VI) de la CDME. Des résultats récents de notre laboratoire (Petitjean et al., 2012, 2014) indiquent leur implication dans l'intégration des informations nociceptives dans le réseau de neurones de la CDME.

d) La lamina V

La lamina V, également appelée le « cou » (neck) de la CDME, est la plus épaisse des laminae. Ses caractéristiques cytoarchitecturales se situent entre celle des laminae III-IV et VI. On y trouve notamment des neurones WDR qui répondent aux stimulations sensorielles nociceptives et non-nociceptives. La partie latérale de la lamina V a une apparence réticulée en raison d'une importante pénétration de fibres A β et est désignée sous le nom de « zone réticulaire » de la CDME (Stilling, 1842). La majorité des axones des neurones empruntent la commissure antérieure pour rejoindre le tractus spinothalamique. La lamina V exerce un contrôle inhibiteur sur les laminae III-IV suite à l'activation des fibres nociceptives exprimant TRPV1 (transient receptor potential vanilloïde 1) (Petitjean et al., 2012). Des niveaux thoracique 1 (T1) à lombaire 3 (L3), la partie médiane de la lamina V contient le noyau de Clarke qui est une structure relais importante pour les informations proprioceptives vers le cervelet (Lenz et al., 2010).

e) La lamina VI

Dans les segments cervicaux et lombaires de la moelle épinière, la lamina VI s'intercale entre les laminae V et VII. Cette lamina est également désignée sous le nom de « base » de la CDME. Les neurones qu'on y trouve sont relativement homogènes en termes de tailles des corps cellulaires (diamètre de l'ordre de 20 μ m) et reçoivent majoritairement des entrées à partir de collatérales d'afférences proprioceptives de type I_A qui projettent vers la corne ventrale ainsi que des fibres descendantes qui cheminent dans le funiculus latéral (Scheibel et Scheibel, 1968; Tredici et al., 1985).

- → excitation
- → inhibition
- → non défini

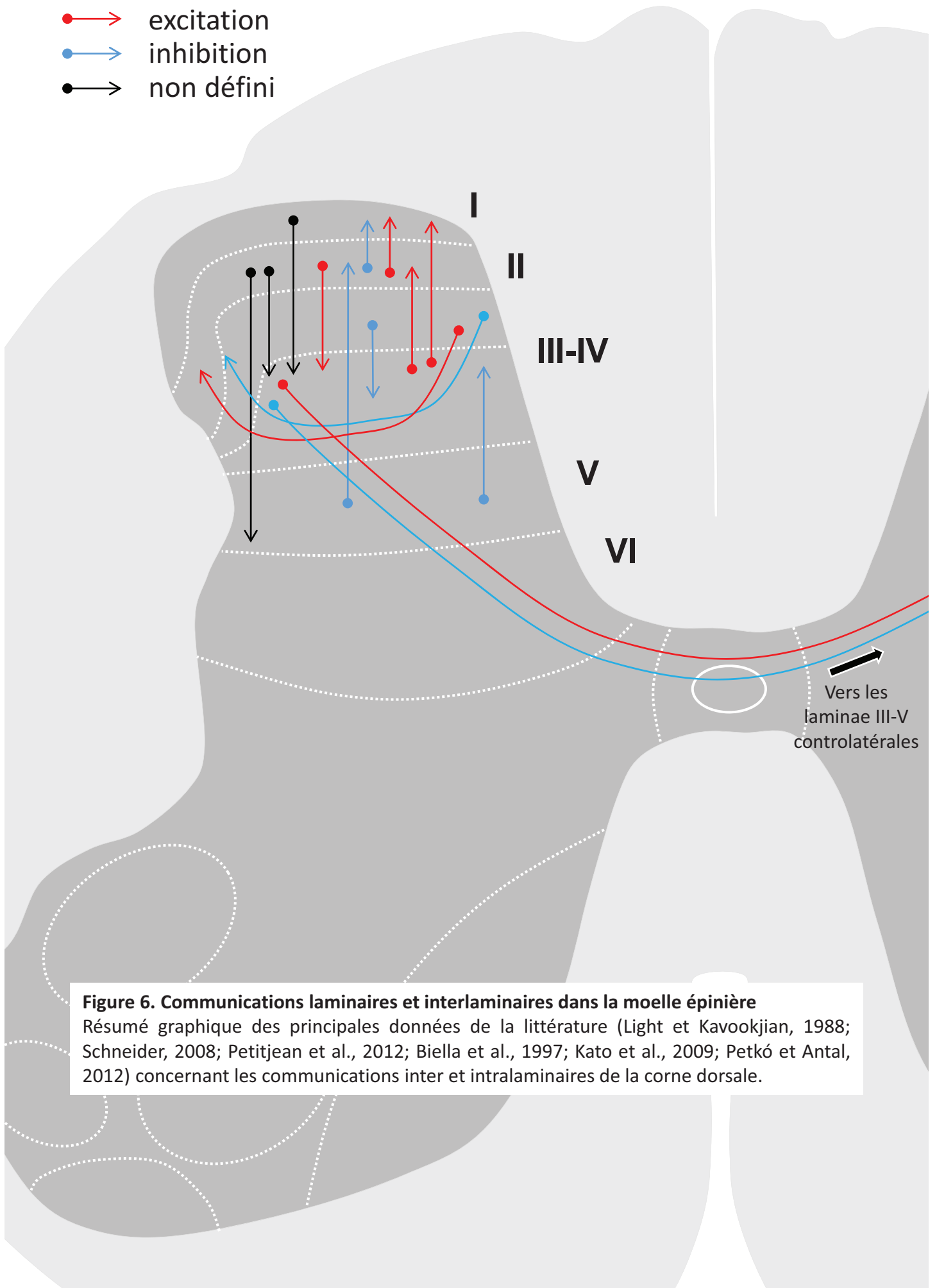


Figure 6. Communications laminaires et interlaminaires dans la moelle épinière
 Résumé graphique des principales données de la littérature (Light et Kavookjian, 1988; Schneider, 2008; Petitjean et al., 2012; Biella et al., 1997; Kato et al., 2009; Petkó et Antal, 2012) concernant les communications inter et intralaminaires de la corne dorsale.

Communication entre laminae dans la CDME

Les communications entre laminae peuvent se faire par des projections axonales entre neurones des différentes laminae mais aussi par l'intermédiaire d'arborisations dendritiques des neurones qui franchissent la limite entre deux laminae voisines et reçoivent des contacts synaptiques dans ces laminae (Figures 6 et 23).

Ainsi, des axones myélinisés de neurones localisés dans les laminae I et II projettent dans les laminae III-IV et V où leurs collatérales établissent des contacts synaptiques (Light et Kavookjian, 1988). À l'intérieur des laminae III-IV, des communications synaptiques entre neurones des laminae III et IV n'existent que dans 30 % des neurones et sont majoritairement unidirectionnelles et inhibitrices (Schneider, 2008).

Des données obtenues à partir d'enregistrements extracellulaires *in vivo* suggèrent également l'existence d'une connexion fonctionnelle entre les laminae II et V (Biella et al., 1997).

D'autres études utilisant des stimulations très localisées par « photo-décageage » de glutamate, associées à des enregistrements en configuration cellule-entière de neurones de la CDME ont cherché à décrire les connexions fonctionnelles excitatrices et inhibitrices entre les différentes laminae. Les résultats obtenus montrent l'existence de connexions excitatrices et inhibitrices entre les laminae II et I, tout comme des connexions excitatrices entre neurones des laminae III-IV et neurones des laminae II et I (Kato et al., 2009). Des interneurons dont les corps cellulaires sont localisés dans les laminae I et II font synapse sur des dendrites dorsaux d'une sous-population d'interneurones des laminae III-IV (Kato et al., 2013).

D'autre part, des communications rostro-caudales et médio-latérales au sein d'une CDME ou entre les deux cornes dorsales ont également été décrites (Petkó et Antal, 2012) mais restent peu étudiées.

Ainsi, chez le rat, certains neurones des laminae I à IV établissent des connexions rostro-caudales sur des distances courtes (2,5 mm) avec des cellules situées dans le quadrant le plus médian des laminae I-IV, ou sur des distances plus longues (tout le renflement lombaire) pour un groupe de neurones localisés dans la partie latérale des laminae superficielles de la CDME (Petkó et Antal, 2012).

Des connexions propriospinales excitatrices et inhibitrices entre les régions médianes et les régions latérales de la CDME ont également été observées (Petkó et Antal, 2012).

Par ailleurs, des relations entre les deux cornes dorsales se font par l'intermédiaire de connexions commissurales décussant dorsalement au canal de l'épendyme. Elles existent entre certains neurones des laminae III-IV et peuvent être excitatrices ou inhibitrices (Petkó et Antal, 2012).

Au sein de notre laboratoire, il a été montré que les informations nociceptives en provenance des afférences primaires exprimant TRPV1 sont transmises de la lamina II aux laminae III-IV et V via des connexions principalement excitatrices. Ces communications excitatrices vers les couches profondes, notamment celles aboutissant dans la lamina V, activent à leur tour des neurones inhibiteurs qui projettent vers les laminae III-IV et II (Petitjean et al., 2012).

Les connexions interlaminaires dorso-ventrales pourraient dans certains cas mettre en jeu de contacts synaptiques entre les neurones des laminae I-II et les dendrites de neurones des laminae III-IV dont les dendrites ont franchi la limite entre les laminae III et II (Kato et al., 2009, 2013). Les implications fonctionnelles de ces connexions sont peu connues.

Aspect neurochimique et fonctionnel des laminae de la corne dorsale

L'expression de neurotransmetteurs ou de neuromodulateurs ainsi que de leurs récepteurs présentent des profils qui peuvent être restreints à certaines zones de la CDME. Ces zones se superposent souvent aux laminations de la substance grise, et les neurones exprimant ces marqueurs présentent souvent une morphologie similaire (Todd, 2010).

Transmission excitatrice

Toutes les fibres afférentes primaires et une partie des interneurons de la CDME utilisent le glutamate comme neurotransmetteur exciteur. Dans la CDME, la transmission synaptique excitatrice implique les récepteurs-canaux de type AMPA, NMDA et/ou kaïnate du glutamate et des récepteurs métabotropes du glutamate.

La présence de glutamate en tant que neurotransmetteur dans la CDME est démontrée par la présence des transporteurs vésiculaires du glutamate VGLUT1 et VGLUT2. On retrouve ces transporteurs dans les terminaisons des fibres afférentes primaires ainsi que dans une sous-population d'interneurones qui apparaissent plutôt localisés dans les laminae les plus superficielles (Todd et al., 2003; Maxwell et al., 2007).

Les récepteurs métabotropes du glutamate mGlu₁ et mGlu₅ sont concentrés dans la lamina II et sont principalement exprimés par des interneurones locaux (Shigemoto et al., 1992; Vidnyánszky et al., 1994; Romano et al., 1995). Quant aux récepteurs-canaux du glutamate, ils se trouvent principalement sur des interneurones des laminae I, II et III mais sont exprimés dans toute la CDME (Coggeshall et Carlton, 1997).

Les quatre sous-unités du récepteur AMPA sont exprimées dans la CDME ; GluA1 et GluA2 sont majoritaires et essentiellement trouvées dans les laminae superficielles (Furuyama et al., 1993). Les récepteurs AMPA sont surtout localisés au niveau de densités postsynaptiques, mais certains d'entre eux se retrouvent dans les régions extra-synaptiques (Kopach et Voitenko, 2013). Les différentes sous-unités du récepteur NMDA sont exprimées dans toute la CDME (Tölle et al., 1993).

Transmission inhibitrice

Dans la CDME, la transmission synaptique inhibitrice est GABAergique, et/ou glycinergique. Dans le système nerveux central la transmission glycinergique est moins répandue que la transmission GABAergique. Elle se trouve principalement dans le tronc cérébral, la rétine, le cortex antérieur, le cervelet et la moelle épinière. Dans la CDME, les interneurones inhibiteurs représentent environ 25 à 30 % des neurones des laminae I-II et 40 % de ceux de la lamina III.

Les neurones libérant les neurotransmetteurs inhibiteurs GABA et glycine sont respectivement identifiés par l'expression du marquage de la glutamate décarboxylase (GAD, enzyme de synthèse du GABA) et de GlyT2 (transporteur neuronal de la glycine). Dans la substance grise de la CDME, deux types de GAD sont exprimées : la GAD 65 et la GAD 67 (Barber et al., 1982; Mackie et al., 2003). L'ARNm de GlyT2 semble être retrouvé dans l'ensemble de la substance grise (Luque et al., 1995) mais les neurones glycinergiques sont rares dans la lamina II et majoritairement retrouvés dans les laminae profondes (III-

VI) et la lamina I de la CDME (Todd et Spike, 1993; Zeilhofer et al., 2005; Hossaini et al., 2007; Polgár et al., 2013a).

Concernant les récepteurs de ces neurotransmetteurs, les récepteurs du GABA sont principalement localisés dans les laminae I et II de la CDME. On trouve deux types de récepteurs du GABA dans la CDME : les récepteurs ionotropes GABA_A qui sont les plus largement exprimés, et les récepteurs métabotropes GABA_B (Coggeshall et Carlton, 1997). Ces récepteurs se trouvent sur les axones des afférences primaires et sur leurs corps cellulaires dans les ganglions rachidiens ainsi que sur les interneurons de la CDME. Des récepteurs du GABA, particulièrement GABA_B, sont aussi retrouvés dans les laminae III et V ; où se projettent les fibres A β et A δ . Des analyses ultrastructurales montrent que les récepteurs GABA_A participent au fonctionnement des synapses classiques et sont aussi exprimés dans des sites extra-synaptiques. Les récepteurs GABA_A et de la glycine peuvent colocaliser au niveau des éléments postsynaptiques (Waldvogel et al., 1990; Sur et al., 1995; Todd et al., 1996; Coggeshall et Carlton, 1997). Dans les neurones de la CDME en culture, la moitié d'entre eux présente une colibération de GABA et d'ATP (Jo et Schlichter, 1999).

Dans la CDME, les récepteurs canaux de la glycine liant la strychnine (un antagoniste de ces récepteurs) montrent un gradient rostro-caudal avec une densité de récepteurs plus importante dans les régions les plus caudales de la moelle épinière. Il y a beaucoup d'ARNm des GlyR dans la corne ventrale et les cellules qui les expriment sont limitées aux laminae II-VIII de la moelle épinière. Les récepteurs de la glycine sont majoritairement localisés dans les laminae profondes de la CDME (III-VI) (Zarbin et al., 1981). La faible épaisseur de la lamina I explique probablement l'absence de détection de l'ARNm ou des récepteurs de la glycine dans certaines études, bien que des données fonctionnelles aient montré que ces récepteurs sont présents dans la lamina I, où chez le rat adulte ils sous-tendent une transmission synaptique inhibitrice presque exclusivement glycinergique (Chéry et de Koninck, 1999; Keller et al., 2001). Par ailleurs, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre les sous-unités α et β des récepteurs de la glycine montre un marquage de l'ensemble de la CDME (Pfeiffer et al., 1984). Les récepteurs de la glycine seraient plutôt postsynaptiques aux afférences primaires sur lesquelles ils ne sont pas retrouvés malgré le fait que la sous-unité β soit exprimée par des neurones avec des corps

cellulaires de gros diamètre dans les ganglions rachidiens. On trouve également des récepteurs de la glycine sur les cellules gliales (Coggeshall et Carlton, 1997).

Les transmissions et cotransmissions synaptiques inhibitrices GABAergiques et glycinergiques dans les laminae II et III-IV de la CDME ont été caractérisées dans plusieurs travaux réalisés dans notre laboratoire (Poisbeau et al., 2005; Inquimbert et al., 2007; Petitjean et al., 2012). Ainsi, dans la lamina II, la transmission GABAergique est dominante et on y trouve aussi une cotransmission GABA/glycine (Poisbeau et al., 2005; Inquimbert et al., 2007). La transmission glycinergique enregistrée dans la lamina II provient principalement de neurones glycinergiques localisés dans d'autres laminae car la lamina II ne contient pratiquement pas de neurones glycinergiques (Zeilhofer et al., 2005). Les laminae III-IV sont caractérisées par une prédominance de la transmission synaptique inhibitrice glycinergique et une absence de cotransmission GABA/glycine (Inquimbert et al., 2007). Nous avons pu confirmer ces résultats lors de nos enregistrements de la transmission synaptique inhibitrice dans les différentes laminae de la CDME.

Autres marqueurs moléculaires

En plus de la catégorie des récepteurs et des neurotransmetteurs qui déterminent la nature inhibitrice ou excitatrice d'une transmission synaptique, d'autres molécules synthétisées par les neurones (ou les cellules gliales) peuvent apporter des critères de distinction supplémentaires des populations cellulaires de la CDME en servant de marqueurs moléculaires des types et sous-types cellulaires.

Ainsi, quatre sous-groupes d'interneurones inhibiteurs des laminae I-III sont classiquement distingués en fonction de l'expression ou non de galanine, du NPY (neuropeptide Y), de l'isoforme neuronale de l'enzyme de synthèse du monoxyde d'azote (nNOS) ou de la parvalbumine. Ces quatre populations d'interneurones ne se recouvrent pas (Polgár et al., 2013b). Des expériences de quantification des marqueurs d'activité cellulaire pERK (phosphorylated extracellular signal-regulated kinases) et Fos suggèrent que les neurones exprimant NPY, nNOS et la galanine sont impliqués dans l'inhibition des informations nociceptives. Les interneurones des sous-groupes NPY et nNOS pourraient directement inhiber les neurones de projection de la lamina I (Polgár et al., 2013b).

La PKC γ (protéine kinase C de type γ) est exprimée par des interneurons majoritairement excitateurs qui sont localisés le long de la partie ventrale de la lamina II (Polgár et al., 1999). Cette expression spécifique peut être utilisée comme marqueur de lamination (Polgár et al., 1999; Inquimbert et al., 2008) car le marquage PKC γ se situe à la frontière entre les laminae II et III.

Les fibres afférentes primaires peuvent également être classées en différents types selon l'expression spécifique de certaines molécules. Ainsi, les fibres peptidergiques exprimant le récepteur TRPV1 véhiculent les informations nociceptives thermiques alors que celles qui expriment MrgprD (Mas-related G-protein coupled receptor member D) véhiculent des informations mécaniques nociceptives (Cavanaugh et al., 2009; Zhang et al., 2013).

Cellules gliales

Dans la moelle épinière, les cellules gliales de la corne grise dorsale expriment de nombreux récepteurs et/ou transporteurs de neurotransmetteurs tels que le GABA et le glutamate, mais également de nombreux récepteurs de neuromodulateurs (pour revue voir : (Kettenmann et Ransom, 1995)).

Parmi les cellules gliales de la CDME on compte les astrocytes, les oligodendrocytes et la microglie. Les cellules gliales participent à la balance excitation/inhibition dans la CDME en régulant les niveaux de glutamate, de GABA, de glycine et de potassium extracellulaires (Jendelová et Syková, 1991; Chvátal et al., 1999, 2004; Danbolt, 2001; Gadea et López-Colomé, 2001a, 2001b, 2001c). Les cellules gliales peuvent moduler la communication entre neurones, notamment les transmissions cholinergique, glutamatergique ou GABAergique (Daniels et Brown, 2001; Smit et al., 2001; Newman, 2003).

Les astrocytes expriment par exemple les récepteurs-canaux de l'ATP de type P2X7 (Aoyama et al., 2011), les adrénocéphes α et β (Hösli et Hösli, 1982) ou encore les transporteurs du glutamate GLAST et GLT-1 activés par la libération synaptique de glutamate (Zhang et al., 2009).

La microglie de la CDME exprime une grande diversité de récepteurs tels que P2X4, TLR 2/3 (toll-like receptor), des récepteurs de chemokines, des cannabinoïdes, etc. (Kettenmann et al., 2011).

L'activité des cellules gliales de la CDME, particulièrement les astrocytes, est modulée par la libération neuronale de neurotransmetteurs tels que le glutamate, l'acétylcholine, la substance P, le GABA, la sérotonine, l'adénosine et la noradrénaline (Jalonen et al., 1997; Fujita et al., 1998; Hirst et al., 1998; Verkhratsky et al., 1998; Kulik et al., 1999; Watkins et al., 2001) qui peuvent notamment provenir des contrôles descendants. La noradrénaline en particulier, peut contrôler le métabolisme énergétique astrocytaire ainsi que la libération de glutamate et d'ATP par les astrocytes (Salm et McCarthy, 1992; Gordon et al., 2005; Hertz et al., 2014).

3. Voies ascendantes

Des neurones possédant des axones qui projettent vers l'encéphale sont principalement retrouvés dans les laminae I et II et dans une moindre mesure dans les laminae III-IV et V. Les neurones de projection de la CDME ont des axones qui quittent la substance grise pour se regrouper dans la substance blanche sous forme de faisceaux ascendants. Ces faisceaux transmettent les informations nociceptives à diverses structures supraspinales. Il existe de nombreux faisceaux ascendants qui véhiculent des informations nociceptives sensori-discriminatives ou émotionnelles (Besson et al., 1995; Zhang et al., 1996; Millan, 1999).

Les axones de neurones de la lamina I et de la lamina V décussent au niveau du segment spinal où se trouvent leurs corps cellulaires, puis cheminent dans le quadrant ventrolatéral de la substance blanche de la moelle épinière. Chez le rat, seule une partie des fibres provenant de la lamina V croise pour rejoindre le quadrant ventrolatéral controlatéral, les autres empruntent le quadrant ventrolatéral homolatéral. Le quadrant ventrolatéral regroupe des fibres véhiculant de l'information nociceptive et de l'information thermique non-nociceptive. Les axones de ce faisceau provenant de la lamina I de la CD, rejoignent au niveau du tronc cérébral les axones de la lamina I originaires du noyau caudal du complexe trigéminal. L'ensemble de ces fibres constituent le faisceau

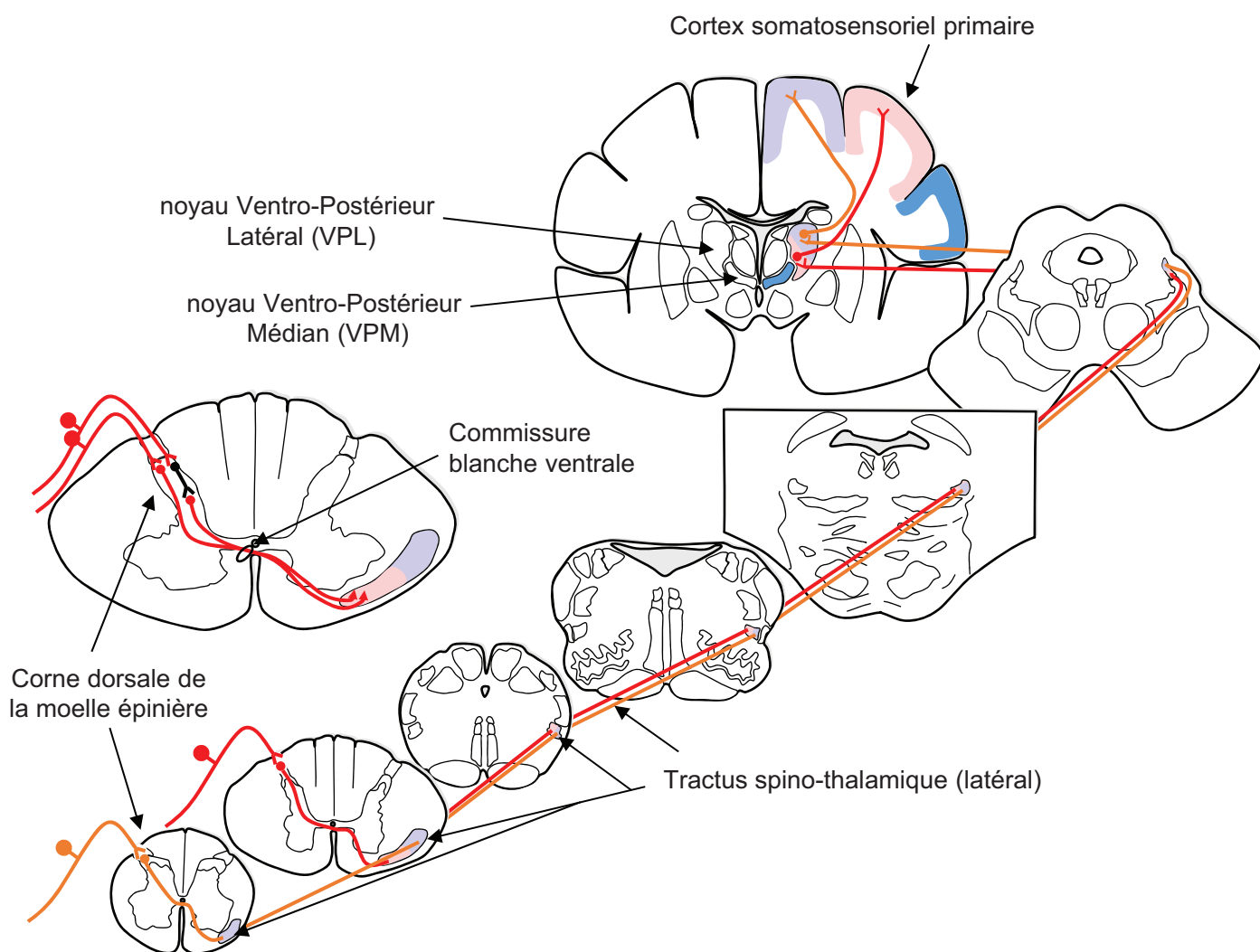


Figure 7. Voie spino-thalamique

Schéma illustrant la localisation de la voie spinothalamique latérale (schéma adapté des documents du cours de neuroanatomie du Pr. Pierre Veinante, Master Neurosciences, Université de Strasbourg).

spino-thalamique (Granum, 1986; Kemplay et Webster, 1986). Une population de neurones dont les corps cellulaires sont localisés dans les laminae III-IV projette également vers la partie la plus caudale du thalamus (Al-Khater et al., 2008).

Le faisceau spino-thalamique (Figure 7) projette dans la partie ventro-basale du thalamus latéral, en abandonnant des collatérales dans l'aire parabrachiale, dans la substance grise périaqueducale et dans les régions de la rétículo-mésencéphalique. Ces structures sont aussi innervées par des voies ascendantes propres : les voies spino-parabrachiale, spino-mésencéphalique et spino-réticulaire. Les informations nociceptives parvenant à l'aire parabrachiale sont alors acheminées vers l'hypothalamus et l'amygdale (Keay et al., 1997; Millan, 1999; Willis et Coggeshall, 2004)

Les neurones des noyaux de la partie ventro-basale du thalamus latéral recevant des informations provenant de la moelle épinière projettent vers les aires corticales somatosensorielles primaires et secondaires et vers le cortex insulaire, ainsi que vers l'amygdale (Brown, 1982; Bernard et Villanueva, 2009).

Dans le bulbe rachidien, les axones des neurones de projection de la lamina V rejoignent ceux des neurones de projection des sous-noyaux caudal et oral du trijumeau. Ces axones projettent principalement vers les noyaux réticulaires latéraux, gigantocellulaires et dorsaux du bulbe, ainsi que vers le sous-noyau parabrachial latéral interne et les noyaux du thalamus médian (Bowsher, 1976; Braz et al., 2005; Bernard et Villanueva, 2009).

Les neurones du thalamus médian contactent des neurones des aires corticales cingulaires et préfrontales (Brown, 1982; Bernard et Villanueva, 2009) impliquées dans la composante émotionnelle et affective de la douleur (Besson et al., 1995).

En résumé, l'acheminement des informations nociceptives collectées dans la CDME vers les centres supraspinaux se fait par de nombreuses voies ascendantes dont certaines sont impliquées dans la composante sensori-discriminative et d'autres dans les composantes émotionnelles et affectives de la nociception (pour plus de détails, voir revue de (Millan, 1999)).

4. Modulation des messages nociceptifs et contrôles descendants

Le système nociceptif présente une grande plasticité fonctionnelle et les caractéristiques d'intégration et de transmission des informations nociceptives sont modifiées à court terme ou à long terme. Cette capacité de modulation est essentielle pour des aspects de survie et de protection de l'organisme. En situation de fuite ou de combat, l'information nociceptive passe au second plan. En cas de lésions, de blessures, l'hyperalgésie (une situation où une stimulation douloureuse peut être ressentie comme plus douloureuse) et l'allodynie (un phénomène où une stimulation non douloureuse le devient) permettent une protection de la région durant la régénération des tissus. Cependant lors de situations pathologiques de douleurs neuropathiques qui font suite à une lésion du système nerveux, ou de douleurs inflammatoires, la plasticité du système somatosensoriel n'est plus adaptative. En effet, dans ces conditions, des hyperalgésies et des allodynies thermiques et/ou mécaniques peuvent spontanément apparaître et persister même après la réparation des tissus endommagés. Tous ces phénomènes peuvent être évalués chez l'Homme et chez l'animal par l'utilisation de tests nociceptifs, qui le plus souvent quantifient l'hyperalgésie et l'allodynie en réponse à des stimuli thermiques (chaud, froid) ou mécaniques (statique, dynamique) (Barrot, 2012).

Il existe des systèmes de contrôle endogènes permettant de moduler l'intégration et la transmission de l'information nociceptive au niveau de la CDME. Ces systèmes impliquent des contrôles descendants, c'est-à-dire des projections nerveuses provenant de centres supraspinaux (hypothalamus, locus coeruleus, noyau raphé magnus, rétículo bulbaire ventro-médiane) ainsi que des réseaux d'interneurones locaux de la CDME (Millan, 2002). Les molécules messagères impliquées dans ces contrôles sont des neurotransmetteurs classiques (glutamate, GABA, glycine) et/ou des neuropeptides. Cependant les conditions de libération et les modes d'action de la majorité de ces neuromodulateurs sont encore mal connus. Ils participent néanmoins à la modulation des informations nociceptives arrivant à la moelle épinière. Par exemple, les stimuli nociceptifs induisent l'activation de neurones de la substance grise périaqueducale (PAG) par l'intermédiaire de la voie spino-mesencéphalique, qui activent à leur tour des neurones de

la partie rostroventromédiane (RVM) du bulbe rachidien du tronc cérébral impliquée dans les contrôles inhibiteurs descendants (Villanueva et Bourgeais, 2009). Les axones des neurones des contrôles descendants sérotoninergiques, GABAergiques et glycinergiques de la RVM projettent le long des faisceaux dorso-latéraux pour contacter les neurones de la CDME, et inhiber la transmission nociceptive (Zhang et al., 1991; Kato et al., 2006).

Les contrôles descendants provenant de la formation réticulée bulbaire et du locus coeruleus (LC) exercent soit une action facilitatrice, soit une action inhibitrice sur l'information nociceptive en fonction du type de neurotransmetteur que libèrent ces fibres et du type de récepteurs activés par ce neurotransmetteur (Fleetwood-Walker et al., 1985; Ridet et al., 1993; Millan, 2002). Les fibres provenant des structures supraspinales empruntent les faisceaux dorso-latéraux et ventro-latéraux de la substance blanche pour contacter les neurones de la CDME. Les opioïdes endogènes exercent un effet antinociceptif en agissant aux niveaux spinal et supraspinal (Millan, 1999; Fields, 2004).

Certaines projections hypothalamo-spinales peptidergiques exercent également des contrôles descendants supraspinaux modulant les messages nociceptifs afférents (Cechetto et Saper, 1988; Millan, 2002). Les neurones hypothalamo-spinaux projettent vers les laminae superficielles de la CDME et contiennent une variété de neuropeptides tels que l'ocytocine qui a un effet antinociceptif au niveau de la CDME (Breton et al., 2008, 2009), la vasopressine et des peptides opioïdes, dont les enképhalines. De manière intéressante, 25 % des neurones hypothalamiques projetant vers la moelle épinière expriment la pro-opiomélanocortine et contiennent de l' α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) ou hormone mélanotrope exerçant un effet pronociceptif via les récepteurs MC4 (Bertorelli et al., 2005; Starowicz et al., 2009).

Des contrôles descendants aminergiques projetant à partir des principaux centres supraspinaux dopaminergiques et noradrénergiques vers la CDME jouent également un rôle important dans la modulation et l'intégration des informations nociceptives à ce niveau.

Les contrôles descendants dopaminergiques prenant leur origine dans une composante mineure de la substance noire pars compacte et surtout l'hypothalamus périventriculaire postérieur (principalement A11) exercent une action antinociceptive chez

le rongeur (Millan, 2002; Tamae et al., 2005). Les contrôles descendants sérotoninergiques proviennent majoritairement du noyau raphé magnus (Bowker et al., 1983) et auraient un effet pro ou antinociceptif selon les types de récepteurs et d'interneurones spinaux impliqués (Besson et al., 1981; Milne et Gamble, 1990; Ren et al., 1991; Eide et Hole, 1993). L'effet antinociceptif de la sérotonine semble également impliquer un relais dans la région noradrénergique du bulbe rachidien (Millan et al., 1996).

Il existe d'autres contrôles descendants monoaminergiques, notamment les contrôles descendants noradrénergiques auxquels nous nous sommes intéressés durant les travaux de cette thèse. Ils prennent leur origine dans les régions A5, A6 et A7 (Fritschy et al., 1987; Bruinstroop et al., 2012). Le rôle analgésique de la noradrénaline dans la modulation de la nociception est clairement établi (Belcher et al., 1978; Headley et al., 1978; Fleetwood-Walker et al., 1985). Cet effet implique les divers adrénoccepteurs exprimés dans la moelle épinière, et particulièrement les récepteurs de type α_2 (notamment α_{2A} et α_{2C} (Budai et al., 1998; Stone et al., 1998; Malmberg et al., 2001)). Bien que ce système soit connu depuis longtemps, son action tant au niveau cellulaire qu'au niveau des réseaux neuronaux de la CDME est mal comprise. C'est à l'étude de ce système qu'a été consacrée une grande partie de cette thèse.

Résumé de la première partie :

Dans la moelle épinière, les fibres afférentes contactent : soit directement des neurones de projection dans les laminae I et V qui acheminent les informations somatosensorielles jusqu'aux centres supraspinaux, soit des interneurons locaux de la CDME (Brown, 1982; Millan, 1999). Ces derniers peuvent être des interneurons excitateurs (glutamatergiques) ou inhibiteurs (GABAergiques et/ou glycinergiques). En effet, dans la CDME on trouve une grande variété de neurotransmetteurs et de neuropeptides ainsi qu'une grande diversité de récepteurs-canaux ou de récepteurs couplés aux protéines G pouvant être activés par des messagers extracellulaires endogènes (neurotransmetteurs, neuropeptides, etc.) (Coggeshall et Carlton, 1997). Les interneurons assurent l'intégration et la modulation de l'information nociceptive à l'étage spinal avant son transfert vers les centres supérieurs via les neurones de projection. Ces réseaux d'interneurones sont placés sous le contrôle de voies descendantes inhibitrices ou facilitatrices (contrôles descendants) en provenance de différentes structures supraspinales principalement situées dans le tronc cérébral, comme la rétículo bulbaire ventro-médiane ou le LC duquel proviennent les fibres noradrénergiques innervant la CDME.

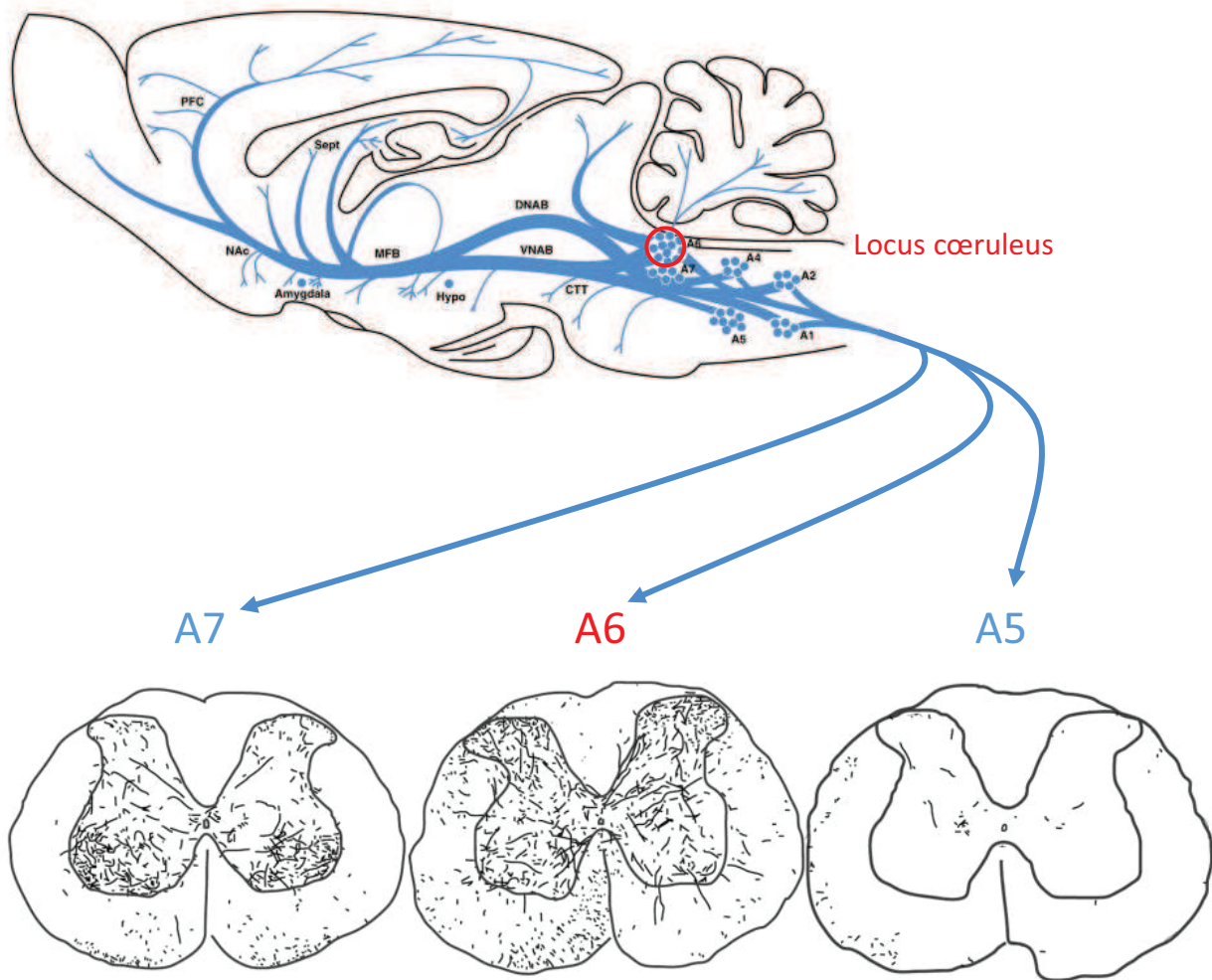


Figure 8. Projections noradrénergiques dans le système nerveux central du rat

En haut : Schéma d'une coupe sagittale de l'encéphale de rat montrant les principaux noyaux noradrénergiques et leurs projections. En bas : Schémas de coupes transversale de moelle épinière lombaire sur lesquelles est indiqué le marquage des fibres positives à la dopamine β -hydroxylase suite à l'injection de traceurs viraux dans les aires noradrénergiques supraspinales A5, A6 ou A7. En rouge: le locus cœruleus ou région A6 (adapté de Koob 2008 et Bruinstroop *et al.* 2012).

II. Le système noradrénergique

John Jacob Abel a été le premier à isoler l'épinéphrine lors de ses travaux réalisés entre 1896 et 1901. La noradrénaline (NA), ou norépinephrine (en anglais), a été découverte en 1940 par Von Euler (Von Euler, 1951) dans des expériences visant à caractériser le système nerveux sympathique et notamment des transmetteurs chimiques appelés les « sympathines » excitatrices et inhibitrices par Canon à partir de 1920 (Perez, 2006). La NA a ensuite été identifiée dans le cerveau du chien grâce aux travaux de Vogt (Vogt, 1954) et de Dahlström et Fuxe (Dahlström et Fuxe, 1964a).

Les neurones noradrénergiques sont regroupés en sept noyaux nommés A1 à A7 (Dahlström et Fuxe, 1964b) et la NA agit dans le système nerveux central via des récepteurs couplés aux protéines G appelés les adrénoccepteurs. La principale source de NA dans le SNC et notamment dans la CDME est le Locus Cœruleus (A6) (Figure 8). En plus de la moelle épinière, le LC innerve également le cortex préfrontal, le noyau accumbens, le septum, l'amygdale, l'hypothalamus, et l'aire tegmentale ventrale (Koob et Koob, 2008; Brosda et al., 2014).

La NA exerce un effet modulateur sur un grand nombre de fonctions du système nerveux central telles que la mémoire, l'apprentissage, la vigilance, l'attention, l'équilibre faim-satiété, les réponses au stress (Gu, 2002). La régulation de ces fonctions par la NA implique des mécanismes de modulation rapide de l'activité des circuits neuronaux et du métabolisme énergétique cellulaire, mais aussi la mise en place de phénomènes à plus long terme de neuroplasticité (O'Donnell et al., 2012). La NA est également impliquée dans des fonctions périphériques telles que la régulation du système cardio-vasculaire (van der Hagen et al., 2014; Wang et al., 2014) par le système nerveux sympathique où elle est co-libérée avec l'ATP (Burnstock, 1995).

Dès 1966, des expériences électrophysiologiques dans la moelle épinière de chat anesthésié avaient suggéré que la NA pouvait avoir un effet inhibiteur sur l'activité électrique des neurones (Engberg et Ryall, 1966). En 1978, Belcher et Headley démontrent clairement que la NA inhibe les neurones qui répondent aux stimulations nociceptives chez le chat (Belcher et al., 1978; Headley et al., 1978).

Noradrénaline

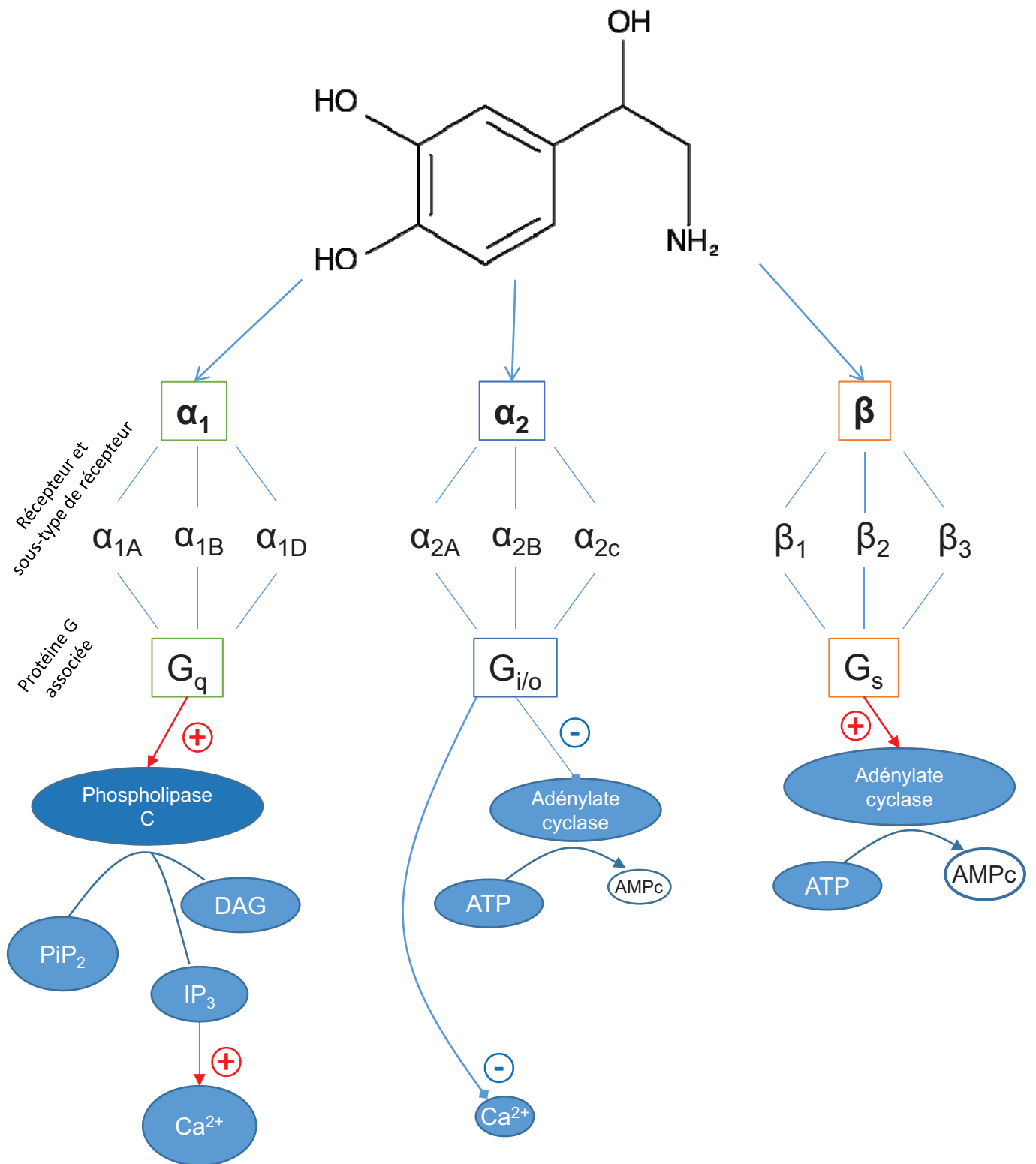


Figure 9. Les récepteurs adrénergiques, leurs sous-types et leurs voies de signalisation intracellulaires respectives

PIP_2 : phosphatidylinositol-4,5-diphosphate ; DAG : diacylglycérol ; IP_3 : inositol trisphosphate ; ATP : adénosine-5'-triphosphate ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique.

Par la suite, d'autres travaux ont confirmé que les contrôles descendants noradrénergiques avaient un effet analgésique et ont pu montrer que l'adrénocepteur α_2 est déterminant dans ce phénomène (Fleetwood-Walker et al., 1985; Budai et al., 1998). L'action analgésique de la NA est, en effet, principalement reproduite par les agonistes (ou antagonistes) des récepteurs α_2 (Yaksh, 1985). La clonidine est par ailleurs utilisée en clinique pour traiter des douleurs cancéreuses ou des patients devenus insensibles aux opiacés (Paris et Tonner, 2005; Fairbanks et al., 2009).

I. Adrénocepteurs

Les récepteurs de la NA sont regroupés sous le terme d'adrénocepteurs. On distingue trois principaux types d'adrénocepteurs : α_1 , α_2 et β .

Chacun de ces types d'adrénocepteurs comporte plusieurs sous-types : les adrénoccepteurs α_{1A} (d'abord appelé $\alpha_{1A/C}$), α_{1B} et α_{1D} (précédemment α_{1A} ou $\alpha_{1A/D}$) pour le type α_1 . Les récepteurs α_{2A} , α_{2B} et α_{2C} pour le type α_2 . Et les récepteurs β_1 , β_2 et β_3 pour le type β .

Ces récepteurs sont tous couplés aux protéines G. Généralement, Les adrénoccepteurs α_1 sont couplés positivement à la phospholipase C via G_q , les adrénoccepteurs α_2 sont couplés négativement à l'adénylate cyclase via G_i , et les récepteurs de type β stimulent l'adénylate cyclase via G_s (Figure 9) (Summers et McMartin, 1993; Bylund et al., 1994; O'Donnell et al., 2012; Szabadi, 2013). Classiquement, les récepteurs α_1 et β ont des effets facilitateurs alors que le récepteur α_2 est inhibiteur (Szabadi, 2013).

Localisation

Des adrénoccepteurs α_1 , α_2 et β sont présents dans le SNC et en dehors du SNC. En périphérie, ils sont notamment retrouvés au niveau postsynaptique sur les muscles lisses et les cellules glandulaires et au niveau présynaptique sur les terminaisons noradrénergiques sympathiques pour les récepteurs α_2 (Kerr et Szabadi, 1985; Morley et al., 1991).

Les neurones préganglionnaires sympathiques de la colonne intermedio-latérale thoracolombaire sont sous contrôle exciteur de projections noradrénergiques des aires

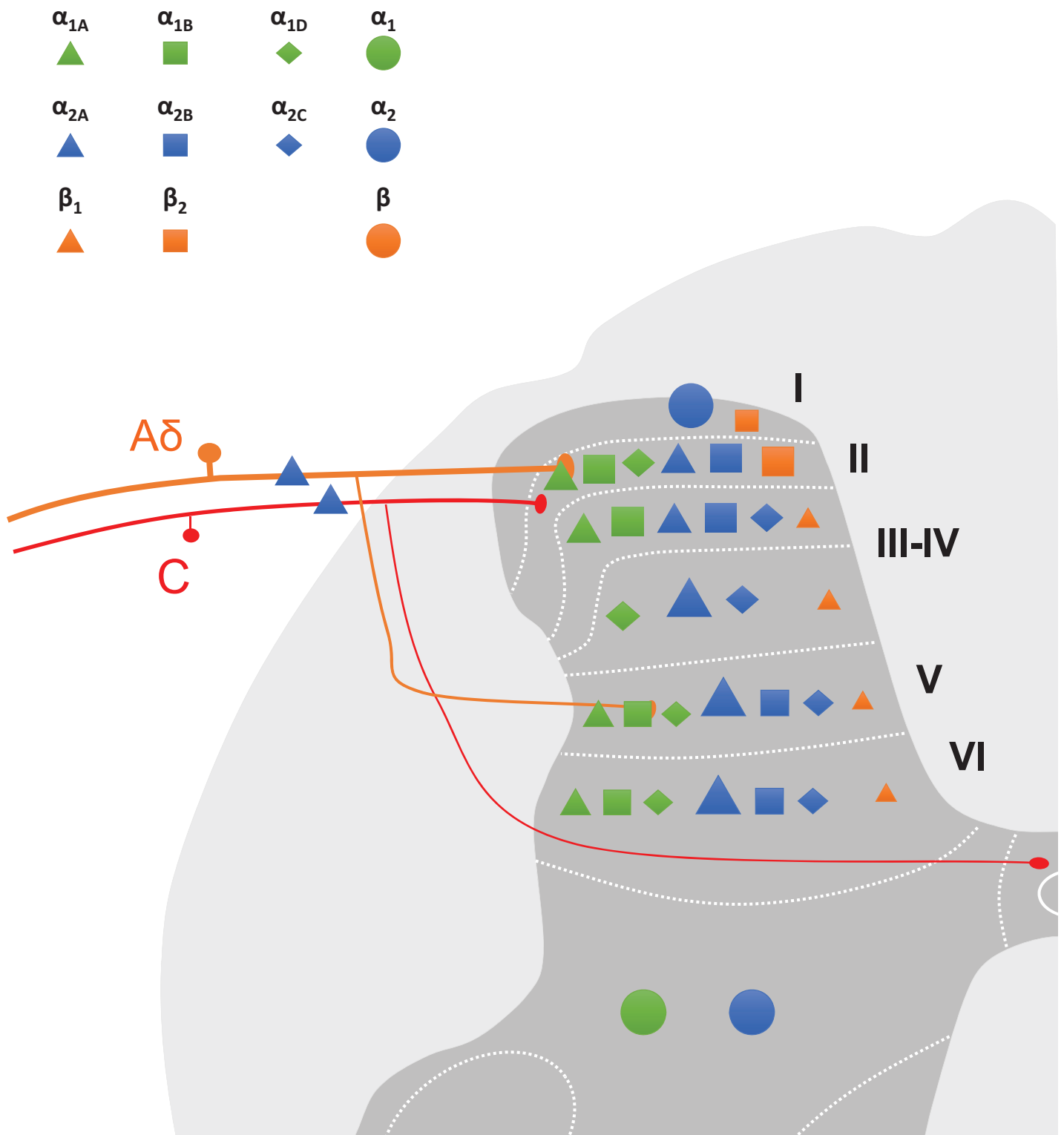


Figure 10. Expression des adrénocéphes dans la moelle épinière

Synthèse graphique non exhaustive de la littérature (Nicholson *et al.* 2005 ; Day *et al.* 1997 ; Shi *et al.* 1999 ; Mizukami 2004 ; Stone *et al.* 1998) traitant de l'expression spinale des adrénocéphes ou de leur ARNm selon des techniques d'immunomarquages, d'hybridations *in situ* et d'enregistrements électrophysiologiques. La taille des symboles indique le niveau relatif d'expression des adrénocéphes (North and Yoshimura, 1984; Sonohata *et al.*, 2004; Ishii *et al.*, 2008; Lu and Perl, 2007; Gassner *et al.*, 2009; Sullivan *et al.*, 1987; Baba *et al.*, 2000).

A5/A7 via l'adrénocepteur α_1 (Jones et Yang, 1985; Takahashi et al., 1987; Lewis et Coote, 1990). Les récepteurs α_1 et α_2 exprimés dans la colonne intermedio-latérale sacrée sont contactés par des terminaisons noradrénergiques en provenance du LC (Westlund et al., 1984; Jones et Yang, 1985; Yoshimura et al., 1990).

Dans l'encéphale, les trois types d'adrénocepteurs sont retrouvés dans le cortex cérébral, autant sur des neurones que sur des cellules gliales (Hertz et al., 2010). Le récepteur α_2 est exprimé au niveau du cortex préfrontal (Aoki et al., 1994, 1998), de l'hippocampe (Scheinin et al., 1994; Uhlén et al., 1997; Fagerholm et al., 2008), du thalamus (Nicholas et al., 1993), et plus faiblement dans le striatum (Nicholas et al., 1996).

Les autorécepteurs α_2 inhibiteurs sont situés soit sur le corps cellulaire et les dendrites de neurones noradrénergiques et inhibent la décharge de potentiels d'action de ces neurones, soit sur les terminaisons axonales de ces neurones où leur activation inhibe la libération de NA. Ces autorécepteurs sont impliqués dans un rétrocontrôle de la libération de NA (Birch et Fillenz, 1985). Des hétérorécepteurs α_2 , c'est-à-dire situés sur des neurones non-noradrénergiques, sont également impliqués dans des mécanismes de régulation d'excitabilité et de libération de neurotransmetteurs et se trouvent notamment sur des terminaisons sérotoninergiques, dopaminergiques et glutamatergiques (Birch et Fillenz, 1985; Starke, 2001).

Localisation des adrénoccepteurs dans la moelle épinière

Les données suivantes sont schématisées dans la figure 10.

Les sous-types de l'adrénocepteur α_1 sont exprimés de manière généralisée dans tout le SNC (Day et al., 1997). L'ARNm de chacun des sous-types est détecté aux niveaux cervical, thoracique, lombaire et sacré de la moelle épinière.

L'expression de α_{1A} est la plus forte dans les laminae profondes VIII et IX, modérée dans les laminae V-VII et X et très faible dans les laminae superficielles I-IV. L'ARNm de α_{1A} est également présent dans les ganglions rachidiens (Nicholson et al., 2005).

Le récepteur α_{1B} se trouve dans les laminae plus profondes de la moelle épinière et les ganglions rachidiens.

L'adrénocepteur α_{1D} est surtout présent dans la corne ventrale de la moelle épinière. L'expression de son ARNm est forte dans la lamina IX, faible dans les laminae VII, VIII, X et très faible dans le reste de la CDME (I-VI).

En résumé, les ARNm des récepteurs α_1 se trouvent essentiellement dans la corne ventrale de la moelle épinière, particulièrement dans les motoneurones, ainsi que dans les ganglions rachidiens, mais existent aussi dans la CDME (Day et al., 1997; Nicholson et al., 2005). Il faut cependant noter que la distribution des récepteurs α_1 semble restreinte chez l'humain. Dans la moelle épinière α_1 ne serait présent que dans la corne ventrale (Smith et al., 1999).

Les adrénocepteurs α_2 sont aussi exprimés dans l'ensemble de la substance grise de la moelle épinière, plus dans les laminae superficielles de la corne dorsale que dans la corne ventrale. Le profil d'expression reste le même sur tout l'axe rostro-caudal de la moelle épinière (Roudet et al., 1994). Le sous-type α_{2A} semble exprimé dans toutes les laminae, mais préférentiellement dans les laminae superficielles et par les fibres afférentes primaires sensibles à la capsaïcine (Stone et al., 1998; Shi et al., 1999; Overland et al., 2009). Ceci expliquerait l'effet inhibiteur des agonistes α_2 sur la transmission synaptique entre fibres C et neurones de la CDME (Sullivan et al., 1987; Ueda et al., 1995; Feng et al., 2002).

L'ARNm d' α_{2B} est trouvé dans toute la CDME (Nicholson et al., 2005) dans une population de petites cellules plus nombreuses dans les laminae superficielles (Shi et al., 1999).

Le sous-type α_{2C} est présent sur les terminaisons d'une sous-population d'interneurones majoritairement excitateurs (+ 80 %) (contenant VGLUT2, un transporteur vésiculaire du glutamate) et inhibiteurs (10 %) de la CDME (Olave et Maxwell, 2002). Par ailleurs, son ARNm a été détecté dans les ganglions rachidiens (Nicholson et al., 2005).

Il faut noter que les sous-types α_{2A} et α_{2C} sont également exprimés par les motoneurones de la corne ventrale (Shi et al., 1999) et qu'il ne semble pas y avoir d'adrénocepteurs α_2 sur les fibres descendantes noradrénergiques (Stone et al., 1998; Olave et Maxwell, 2002).

Pour résumer, des adrénocéphes α_2 sont exprimés dans la CDME, sur des interneurones, mais aussi sur les fibres afférentes primaires et dans les ganglions rachidiens. Les fibres noradrénergiques en provenance du LC et qui projettent vers la CDME ne semblent pas posséder d'adrénocéphes α_2 .

Les récepteurs β_1 se trouvent dans l'ensemble de la CDME (Nicholson et al., 2005). Le sous-type β_2 semble avoir une expression restreinte aux laminae I et II, ainsi qu'au voisinage du canal de l'épendyme (lamina X) (Mizukami, 2004).

Expression gliale des adrénocéphes

Moelle épinière

Dans la moelle épinière quelques études montrent que les adrénocéphes sont exprimés par des cellules non neuronales.

Les astrocytes spinaux expriment les récepteurs α et β (Hösli et Hösli, 1982; Hösli et al., 1993). Certaines études ont suggéré la présence de récepteurs α_{2A} dans la membrane plasmique des astrocytes (Xu et al., 2010b) alors que d'autres études n'ont détecté ni α_{2A} , ni α_{2C} (Stone et al., 1998).

Bien que le détail de l'expression des adrénocéphes dans la glie de la moelle épinière ne soit pas connu, il semble qu'au moins les astrocytes expriment les récepteurs α et β . Les conséquences de leur activation restent cependant mal connues.

Régions supraspinales

Les astrocytes supraspinaux expriment les trois types d'adrénocéphes (Hertz et al., 2014). Ils répondent à une application de NA par une libération d'ATP (Gordon et al., 2009) et de glutamate qui peut moduler la transmission synaptique excitatrice, spontanée et miniature (Gordon et al., 2005), ainsi qu'inhibitrice dans l'hippocampe (Newman, 2003). La NA et les agonistes des récepteurs α_1 , α_2 et β appliqués de manière exogène augmentent la concentration intracellulaire de calcium dans les astrocytes corticaux en culture (Salm et McCarthy, 1990; Hertz et al., 2014). Dans les astrocytes corticaux d'animaux vigiles, la NA endogène libérée par des axones de neurones du LC projetant vers le cortex cérébral, peut induire des vagues d'élévation de calcium intracellulaire suite à l'activation des récepteurs α_1 astrocytaires (Ding et al., 2013).

De plus, des données obtenues sur des cellules gliales corticales de souris montrent que la microglie semble exprimer les adrénocéphes β_1 et β_2 (Prinz et al., 2001). Ces récepteurs permettent à la NA libérée par les projections noradrénergiques du LC de moduler l'activité immunitaire de la microglie (Heneka et al., 2010; O'Donnell et al., 2012). La microglie corticale contient également l'ARNm des récepteurs α_{1A} , α_{2A} , β_1 et β_2 (Mori et al., 2002; Tanaka et al., 2002).

Voies de signalisation des adrénocéphes gliaux

Certains effets de la NA sur les astrocytes sont relativement bien connus. Nous savons notamment que l'application de NA sur les astrocytes augmente la recapture du glutamate, stimule la glycogénolyse (Hertz et al., 2004, 2013) ainsi que la production de lactate et de glutamine (O'Donnell et al., 2012). La NA peut, d'une certaine façon, être vue comme un modulateur qui amplifie les fonctions de soutien des astrocytes sur les neurones.

De plus, dans la glie, la stimulation des adrénocéphes peut induire la libération vésiculaire d'ATP. La libération d'ATP par exocytose à partir des astrocytes corticaux en culture primaire nécessite l'activation de la voie DAG (diacylglycérol), probablement en aval de la signalisation G_q dépendante (Mungenast, 2011).

Cet effet implique en partie une stimulation calcium-dépendante de la glycogénolyse (Xu et al., 2014b). Il a également été observé que la voie de signalisation en aval de l'activation des adrénocéphes β_1 peut basculer du couplage classique à l'adénylate cyclase via G_s à une cascade intracellulaire dépendante de G_i et pouvant être à l'origine de la glycogénolyse calcium-dépendante dans les astrocytes corticaux en culture (Du et al., 2010; Xu et al., 2014a). D'autres études confirment une stimulation calcium-dépendante de la glycogénolyse par les récepteurs β adrénergiques (Hertz et al., 2014). Dans une moindre mesure, l'activation des adrénocéphes α_2 pourrait aussi stimuler la glycogénolyse en culture (Subbarao et Hertz, 1990; Hertz et al., 2014).

Les astrocytes de souris en culture libèrent également un autre messager extracellulaire, l'acide homocystéique, suite à l'activation des adrénocéphes β par l'isoprotérénol (Do et al., 1997).

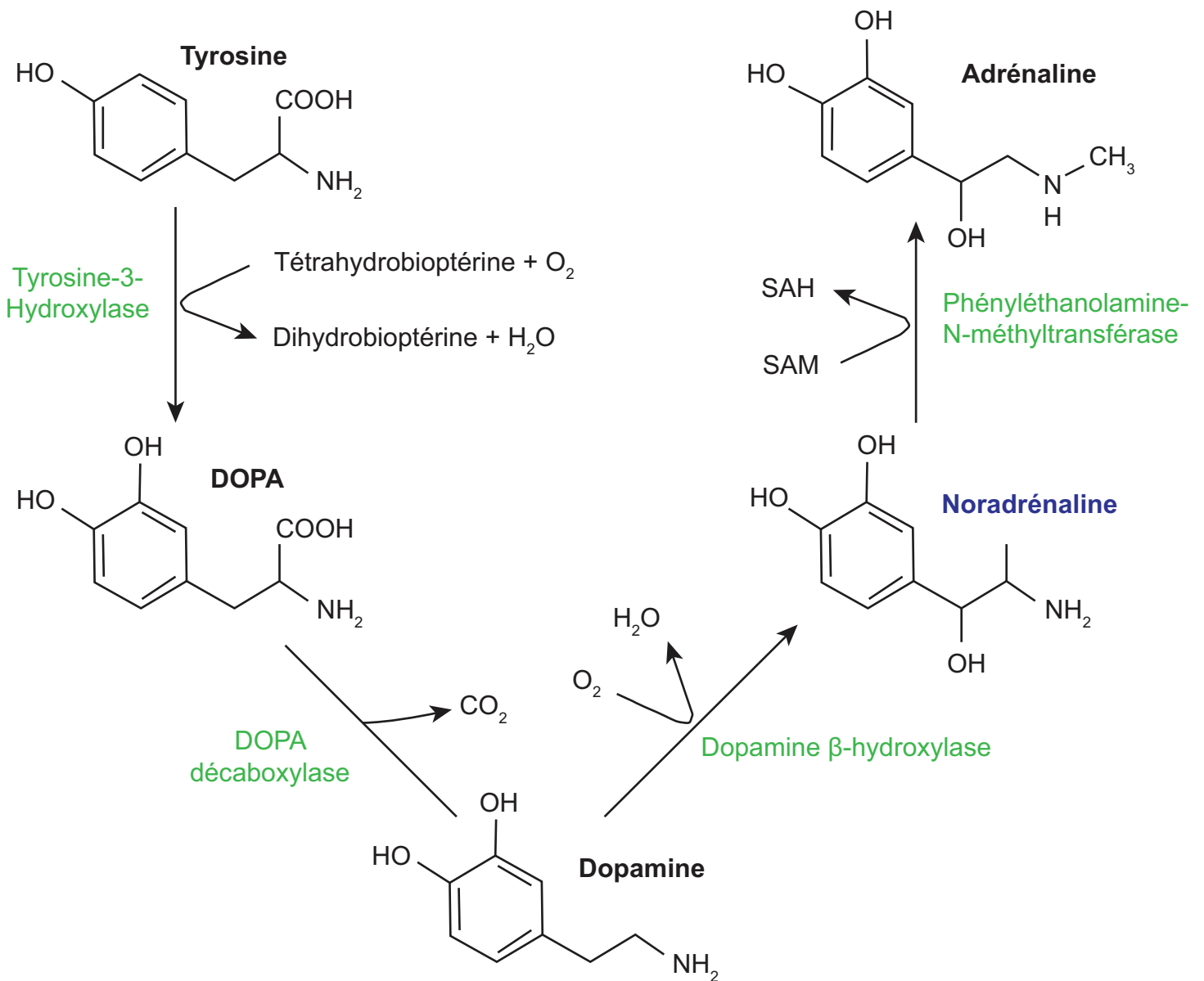


Figure 11. Voie de biosynthèse des cathécholamines

La tyrosine hydroxylase catalyse l'hydroxylation de la tyrosine en L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphénylalanine). Cette étape est limitante dans la biosynthèse. La L-DOPA est décarboxylée en dopamine par la DOPA-décarboxylase. La dopamine est concentrée dans des vésicules (via un transporteur VMAT, vesicular monoamine transporter) avant d'être hydroxylée en noradrénaline par la dopamine β-hydroxylase.

Les astrocytes du cortex en culture semblent donc faire appel à des voies de signalisation intracellulaires qui peuvent être différentes du couplage intracellulaire classique des adrénocéphes qu'ils expriment. Ces mécanismes sont à l'origine de la libération de différents gliotransmetteurs pouvant moduler la transmission synaptique (Newman, 2003; Pougnet et al., 2014). Dans le cas du système noradrénergique cortical, les cellules gliales régulent également la concentration extracellulaire de NA, et de dopamine, via le transporteur de la NA (NAT) qu'elles expriment (Takeda et al., 2002).

2. Contrôles descendants noradrénergiques

La NA exerce un effet analgésique et il a été montré que l'activation des contrôles descendants noradrénergiques en provenance du LC inhibait la transmission nociceptive dans la CDME.

Source de noradrénaline dans la moelle épinière

La NA est une catécholamine, elle a comme précurseur la tyrosine (Figure II) à partir de laquelle la dopamine est synthétisée. La NA est obtenue par hydroxylation de la dopamine grâce à la dopamine β -hydroxylase. Cette enzyme est nécessaire à la synthèse de NA et sa présence est souvent utilisée comme indicateur du phénotype noradrénergique. L'adrénaline est synthétisée par méthylation de la NA.

Dans la moelle épinière, la NA provient exclusivement des neurones bulbo-spinaux. Les corps cellulaires des neurones noradrénergiques projetant vers la moelle épinière se situent dans les aires A5, A6 et A7 (Figure 8). La zone intermédiaire-latérale et la corne ventrale sont innervées par des neurones dont les corps cellulaires se situent dans les aires A5 et A7 respectivement. La CDME est innervée par des axones des neurones du LC (A6) (Fritschy et al., 1987; Lyons et al., 1989; Bruinstroop et al., 2012). Par ailleurs, une étude récente indique que seule la partie la plus ventrale du LC serait impliquée dans l'effet antinociceptif de la NA (Hickey et al., 2014).

Il n'y a pas de dopamine β -hydroxylase dans les ganglions rachidiens ni dans les neurones intrinsèques à la CDME (Price et Mudge, 1983; Vega et al., 1991). Les marquages au moyen d'anticorps dirigés contre cette enzyme mettent en évidence des fibres

provenant du LC dans la substance grise de la moelle. Lorsque les neurones du LC sont détruits, le marquage de la dopamine β -hydroxylase disparaît de la CDME (Sato et al., 1982; Fritschy et Grzanna, 1989), confirmant l'origine exclusivement bulbaire de la NA trouvée dans la CDME.

Les fibres en provenance du LC projettent dans la CDME en passant principalement par le funiculus ventral et la substance blanche superficielle de la CDME (Bruinstroop et al., 2012).

De manière intéressante, il existe des projections directes de certains neurones de la lamina I de la CDME vers le LC (Craig, 1992).

Mode de communication dans le système noradrénergique

Les terminaisons noradrénergiques projetant dans la CDME passent par la partie dorsale du funiculus latéral. Ces axones contactent principalement les cellules de la substance grise superficielle (laminae I à III) (Sato et al., 1982; Fritschy et al., 1987; Hagihira et al., 1990; Rajaofetra et al., 1992). Certaines de ces fibres font des contacts synaptiques « classiques » majoritairement axo-somatiques, avec des neurones de la CDME. Selon les études, ces synapses neuro-neuronales sont majoritaires (Hagihira et al., 1990) ou plutôt rares (Sato et al., 1982; Rajaofetra et al., 1992; Ridet et al., 1993). En effet, les terminaisons noradrénergiques semblent également établir des contacts avec des astrocytes, et ces synapses neuro-gliales semblent plus fréquentes que les synapses neuro-neuronales (Ridet et al., 1993). Cependant, la plupart des fibres noradrénergiques en provenance du LC ne formeraient aucun contact classique de type synaptique dans les laminae superficielles de la CDME (Sato et al., 1982; Rajaofetra et al., 1992; Ridet et al., 1993), suggérant plutôt un mode d'action de la NA par transmission volumique. Des fibres noradrénergiques pouvant être à l'origine d'une transmission volumique sont souvent observées en apposition avec des astrocytes (Ridet et al., 1993).

Une stimulation des fibres afférentes primaires de type C et $A\delta$, mais pas $A\beta$, a pour conséquence une augmentation de la concentration extracellulaire de NA dans la CDME. De plus, cette élévation de NA est absente suite à la lésion du LC (Men et al., 1996; Hitoto et al., 1998). Lorsque les fibres noradrénergiques sont stimulées électriquement dans le tronc cérébral, la concentration extracellulaire de NA mesurée par microdialyse dans la

moelle épinière a été estimée à 23 μM (Abhold et Bowker, 1990). L'IC₅₀ de l'effet hyperpolarisant de la NA appliquée de manière exogène, mesuré lors d'enregistrements intracellulaires sur des tranches de cerveau, est du même ordre de grandeur (17 μM) (Liu et Alreja, 1998).

Effets de la NA dans la corne dorsale de la moelle épinière

La NA libérée dans la moelle épinière y exerce un ensemble d'effets tant sur les neurones que les astrocytes des différentes laminae de la CDME. Ces effets résultent en une analgésie semblant surtout dépendre des adrénocéphes de type α_2 . Ce sont ces effets que nous avons tentés de caractériser plus en détail lors de notre travail de thèse, notamment en nous intéressant aux phénomènes qui ont lieu dans les laminae profondes de la CDME.

Analgésie

L'effet analgésique de la NA au niveau spinal est connu depuis longtemps (Belcher et al., 1978; Headley et al., 1978) et l'on sait l'importance de l'adrénocéphes α_2 dans ce mécanisme chez le chat, le rongeur (Fleetwood-Walker et al., 1985) et les primates (Yaksh et Reddy, 1981). C'est cet effet analgésique qui est également ciblé en anesthésiologie humaine (Paris et Tonner, 2005).

L'administration intrathécale d'agonistes ou d'antagonistes des récepteurs α_2 mime ou bloque l'effet de la NA observé dans divers tests comportementaux nociceptifs thermiques (Fleetwood-Walker et al., 1985; Jones, 1992) ou mécaniques (Walker et al., 2012). Il est à noter que dans la grande majorité de ces travaux, ce sont uniquement les seuils nociceptifs thermiques qui ont été évalués (tail flick, hot plate). L'application d'antagonistes des récepteurs α_2 au niveau spinal inhibe les stimulations des entrées nociceptives vers les neurones de la CDME (Budai et al., 1998). Une étude visant à caractériser l'effet analgésique du venin d'abeille montre que l'activation de récepteurs adrénocéphes de type α_2 a une action sélective sur l'hyperalgésie thermique, et non mécanique, dans des modèles de douleur neuropathique (Roh et al., 2004). Par ailleurs, l'effet analgésique d'agonistes α_2 -adrénocéphes comme la clonidine, utilisée en clinique humaine, est observé suite à une administration périphérique de la substance (systémique, intrapéritonéale) (Asano et al., 2000). Cependant, de nombreux effets secondaires

indésirables tels que la sudation, la bradycardie, l'hypotension s'ajoutent à l'analgésie (Asano et al., 2000; Paris et Tonner, 2005; Funai et al., 2014) et limitent fortement ce type d'administration en clinique humaine.

La plupart des études impliquent un rôle majeur du récepteur α_2 dans l'effet analgésique de la NA, mais certains travaux suggèrent également une contribution des adrénocéphes α_1 et β au niveau central (Ramana Reddy et Yaksh, 1980; Aran et Proudfit, 1990; Peng et al., 1993).

Les agonistes α_2 ont un effet analgésique en situation de douleurs aiguës et chroniques (Hunter et al., 1997), bien que certaines études n'aient pas détecté d'effets analgésiques de ces agonistes sur une douleur survenant juste après une section de nerf mais uniquement sur la partie chronique qui se met en place par la suite (Puke et Wiesenfeld-Hallin, 1993). Une fois la neuropathie installée, les agonistes α_2 restent efficaces pour atténuer la douleur et c'est d'ailleurs dans des conditions de douleurs neuropathiques cancéreuses, lorsque les opioïdes ne sont plus efficaces, que des substances telles que la clonidine ou la dexmédétomidine sont utilisées en clinique humaine par administration intrathécale.

Dans les douleurs neuropathiques, il semble que le récepteur α_{2A} soit important pour l'effet antinociceptif des agonistes α_2 adrénergiques. La neuropathie a aussi pour conséquence une augmentation des concentrations de tyrosine hydroxylase et de dopamine β -hydroxylase dans la CDME et le LC (Ma et Eisenach, 2003). Dans les ganglions rachidiens, suite à une lésion périphérique d'un nerf, une augmentation du taux d'ARNm des trois types d'adrénocéphes (Maruo et al., 2006) ainsi qu'un bourgeonnement de fibres sympathiques noradrénergiques en provenance du rameau communicant gris vers les ganglions rachidiens sont observés (McLachlan et al., 1993; Ramer et Bisby, 1997). Concernant les effets analgésiques périphériques de la NA en situation de douleur neuropathique, une série d'études montre que dans les ganglions rachidiens, c'est l'activation des adrénocéphes de type β_2 exprimés par les cellules satellites non-neuronales qui a un effet antiallodymique. Les adrénocéphes de type α_2 ne semblent pas impliqués (Choucair-Jaafar et al., 2014). Les récepteurs β sont activés par des traitements chroniques aux antidépresseurs tricycliques qui bloquent les transporteurs de la NA et

donc la recapture de NA. Ils impliquent uniquement le système noradrénergique sympathique périphérique, une lésion du système noradrénergique central ne bloquant pas ces effets (Barrot et al., 2009; Bohren et al., 2013).

Les injections intrathécales d'agonistes α_2 soulagent également les douleurs inflammatoires (Xu et al., 2010a).

De manière plus contradictoire, l'injection intrathécale (chez la souris) ou sous-cutanée d'antagonistes des adrénoccepteurs α_2 peut aussi avoir des effets antinociceptifs lors des deux phases du test à la formaline (Kanui et al., 1993; Shannon et Lutz, 2000).

La destruction des fibres noradrénergiques de la moelle n'affecte pas les seuils mécaniques de base testés avec les filaments de Von Frey. Mais après à la mise en place d'une douleur neuropathique (spinal nerve ligation), cette opération exacerbe l'hypersensibilité mécanique des rats ainsi que l'effet analgésique d'une injection intrathécale de clonidine (Hayashida et al., 2012).

Récemment, il a également été montré que la clonidine pouvait inhiber le prurit et que la destruction des fibres cathécholaminergiques facilitait les réponses pruritiques, suggérant un contrôle de cette modalité par le système noradrénergique (Gotoh et al., 2011).

Données fonctionnelles des effets de la noradrénaline dans la CDME

En parallèle à ces études morphologiques et comportementales, les effets électrophysiologiques de la NA dans la CDME ont été étudiés. Dans une étude pionnière, Engberg et Ryall ont appliqué de la NA lors d'enregistrements électrophysiologiques de neurones de la substance grise de la moelle épinière de chat. Ils ont observé des effets inhibiteurs sur la décharge de potentiels d'action des neurones et ont proposé que la NA pouvait hyperpolariser la membrane de certains neurones, ce qui inhiberait la transmission nerveuse au sein des réseaux de neurones de la CDME (Engberg et Ryall, 1966). Par la suite, ces observations initiales ont été largement confirmées.

Effets postsynaptiques

Des enregistrements *in vitro* de neurones de la lamina II révèlent un effet hyperpolarisant (inhibiteur) impliquant une augmentation de conductance membranaire

aux ions potassium dans 80 % des neurones. Cet effet met en jeu les récepteurs α_2 . Les agonistes α_1 induisent des dépolarisations dans une sous-population de neurones et les agonistes des récepteurs β n'ont aucun effet dans la lamina II (North et Yoshimura, 1984; Ishii et al., 2008). Des enregistrements réalisés *in vivo* sont en accord avec les données obtenues *in vitro* sur tranche de moelle épinière et associent une augmentation de conductance membranaire aux ions K^+ à l'effet hyperpolarisant α_2 -dépendant (Howe et Zieglgänsberger, 1987; Sonohata et al., 2004). Une hyperpolarisation induite par l'activation des récepteurs α_2 est également présente dans les neurones du LC (Surprenant et Williams, 1987).

Dans la lamina I, les neurones hyperpolarisés par la NA sont ceux qui répondent à la substance P et expriment les récepteurs NK1, ce qui suggère que la NA aurait un effet postsynaptique inhibiteur sur une partie des neurones de projection de la lamina I (Lu et Perl, 2007).

En utilisant une lignée de souris transgénique permettant d'identifier les neurones GABAergiques dans des tranches de moelle épinière, il a été montré que dans la lamina II, les neurones GABAergiques sont majoritairement dépolarisés (40 %) alors que les neurones non-GABAergiques sont préférentiellement hyperpolarisés (46 %) par la NA via l'activation des récepteurs α_1 et α_2 , respectivement. Dans la lamina III superficielle, les neurones GABAergiques ne sont jamais dépolarisés, mais hyperpolarisés (20 %) ou non affectés (75 %) par la NA. Il semblerait donc que dans la lamina II les récepteurs α_1 soient surtout exprimés par des neurones GABAergiques et les récepteurs α_2 par des neurones non-GABAergiques, alors que dans la lamina III superficielle, un quart des neurones GABAergiques exprimerait les récepteurs α_2 (Gassner et al., 2009).

Effets présynaptiques

Concernant les modulations présynaptiques par la NA, nous avons déjà évoqué l'existence d'adrénocepteurs de type α_2 sur les fibres afférentes primaires de type C et A δ sensibles à la capsaïcine (Stone et al., 1998). Ces récepteurs sont fonctionnels car les réponses synaptiques enregistrées dans les neurones de la CDME après stimulation (électrique ou pharmacologique) des fibres afférentes sont atténuées de manière dose-dépendante par la clonidine (agoniste α_2) (Sullivan et al., 1987; Ueda et al., 1995; Feng et

al., 2002). De plus, la NA semble pouvoir réduire la fréquence des courants postsynaptiques excitateurs miniatures (CPSEm, en présence de tétrodotoxine) enregistrés dans la lamina II (Feng et al., 2002; Pan et al., 2002). Cet effet n'est cependant pas retrouvé dans toutes les études (Baba et al., 2000a). Il est intéressant de noter que des fortes doses de clonidine peuvent aussi avoir un effet inhibiteur sur les courants synaptiques évoqués par la stimulation électrique des fibres A β (Sullivan et al., 1987).

Par contre, la NA augmente la fréquence des courants postsynaptiques inhibiteurs miniatures (CPSIm) dans la lamina II par un phénomène qui met en jeu les récepteur α_1 , la clonidine (agoniste α_2) et l'isoprotérénol (agoniste β) n'ayant pas d'effets. La NA augmente aussi la fréquence et l'amplitude des événements postsynaptiques GABAergiques spontanés. Cet effet est mimé par l'agoniste α_1 et est bloqué par la TTX (Baba et al., 2000a).

En accord avec ces données obtenues *in vitro*, une étude récente de patch-clamp *in vivo* dans la moelle épinière a montré qu'une application systémique d'agonistes des récepteurs α_2 augmentait la fréquence des CPSIs dans les laminae superficielles de la CDME sans avoir d'effet sur les CPSEs (Funai et al., 2014).

De plus, la NA semble moduler directement l'activité des récepteurs de la glycine. En effet, des enregistrements réalisés dans la partie sacrée de la moelle épinière montrent que la NA et la clonidine potentialisent le courant Cl⁻ glycinergique en inhibant la PKA (Nabekura et al., 1999). Un effet similaire a été retrouvé sur des neurones de la CDME en culture (Lang et al., 2003).

Ces données fonctionnelles peuvent être comparées aux données anatomiques concernant la localisation des adrénocéphes dans la CDME. Les adrénocéphes α_1 et α_2 sont présents et fonctionnels dans la lamina II. Le récepteur α_2 est aussi exprimé dans les laminae I et III, ainsi que sur les fibres afférentes primaires nociceptives. L'adrénocéphes β ne semble avoir aucun effet sur les transmissions synaptiques excitatrices et inhibitrices dans la lamina II, bien que sa présence soit suggérée par une approche immunohistochimique (Mizukami, 2004).

L'ensemble de ces résultats indique que la NA a globalement un effet inhibiteur dans les laminae superficielles de la CDME, en particulier via l'adrénocepteur α_2 . Ainsi une inhibition des informations nociceptives en provenance de la périphérie, une inhibition postsynaptique des interneurons de la lamina II, et une inhibition des neurones de projection de la lamina I, pourraient expliquer l'analgésie α_2 -dépendante observée lors de tests comportementaux.

Ces conclusions se limitent cependant aux laminae les plus superficielles de la CDME. Pourtant, les laminae plus profondes (III à V) jouent également un rôle important dans la transmission et la modulation des informations nociceptives dans la moelle épinière (Petitjean et al., 2012), mais à ce jour les effets de la NA sur la transmission synaptique dans ces laminae n'ont pas été étudiés.

Conclusion sur le système noradrénergique spinal

Les projections noradrénergiques du LC vers la CDME constituent un contrôle descendant analgésique. Des études comportementales ont montré que l'effet analgésique de ce système dépendrait principalement de l'activation des adrénocepteurs α_2 dans la CDME. Les études électrophysiologiques visant à comprendre les mécanismes d'action de ce système se sont focalisées sur les laminae superficielles de la CDME où l'activation de l'adrénocepteur α_1 a un effet excitateur sur une majorité de neurones GABAergiques et l'activation de l'adrénocepteur α_2 a un effet inhibiteur sur les neurones non-GABAergiques, potentiellement glutamatergiques de la lamina II.

L'expression d'adrénocepteurs dans les laminae profondes de la CDME et par les astrocytes spinaux contactés par des fibres noradrénergiques en provenance du LC suggère leur participation à la mise en place de l'analgésie spinale noradrénergique.

Objectifs de la thèse

Les principaux objectifs de ce travail de thèse ont été :

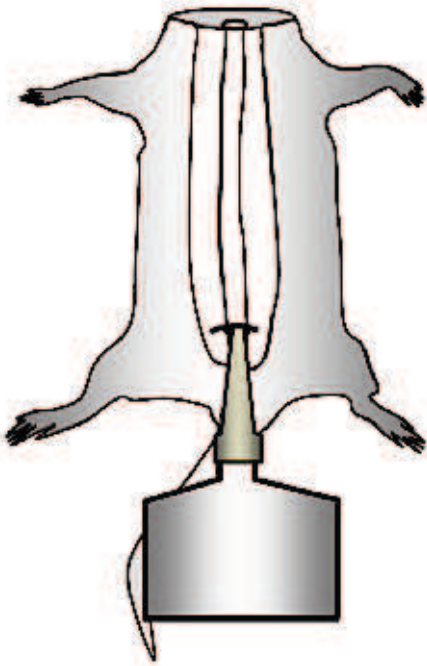
- De rechercher et de caractériser les effets de la NA sur la transmission synaptique dans les laminae profondes de la CDME.
- D'identifier les récepteurs impliqués dans ces effets.
- De mettre en évidence le rôle des communications interlaminaires et des cellules gliales dans ces effets.

Au cours de ces travaux, des résultats complémentaires ont été obtenus. Ainsi nous avons pu montrer :

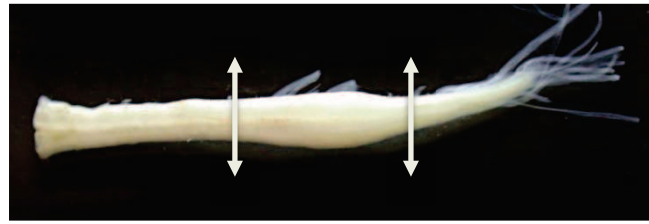
- La participation de la glie spinale à l'effet de la capsaïcine dans les laminae profondes de la corne dorsale sur la transmission synaptique inhibitrice.
- Un effet de la dopamine passant par les récepteurs à la NA dans les laminae III-IV de la corne dorsale.

Ces résultats préliminaires seront mentionnés dans le chapitre des résultats.

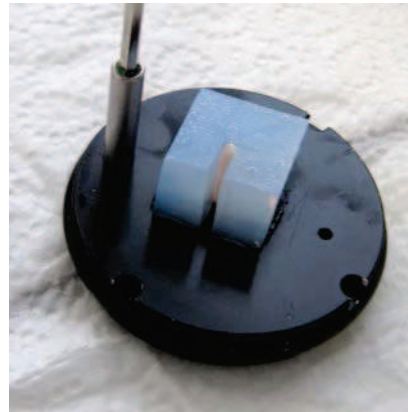
1. Prélèvement de la moelle épinière



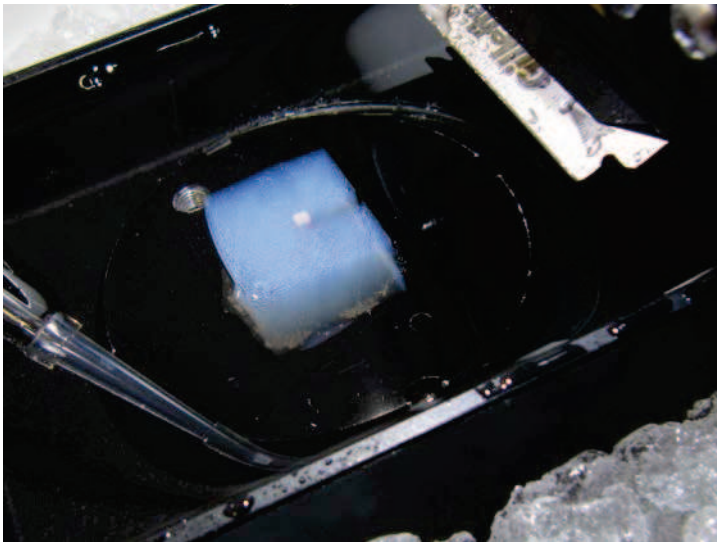
2. Section du segment lombaire



3. Inclusion dans un bloc d'agarose



4. Coupe au vibratome



5. Conservation des tranches



Figure 12. Prélèvement de la moelle épinière de rat par extrusion hydraulique et réalisation de tranches transversales

(1) La moelle est d'abord prélevée par extrusion hydraulique, puis **(2)** le renflement lombaire est isolé avec deux sections au scalpel. **(3)** Cette partie de la moelle épinière est alors placée dans un bloc d'agarose sculpté à la bonne taille et collé sur la platine du vibratome. **(4)** Le bloc d'agarose est plongé dans du saccharose-ACSF froid (1-4 °C) équilibré avec un mélange (95 % O₂ / 5 % CO₂), et des tranches de 600 µm sont réalisées. **(5)** Ces tranches sont ensuite conservées dans une chambre d'incubation remplie d'ACSF constamment bullé.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Animaux utilisés

L'ensemble de nos expériences a été réalisé avec des rats Sprague-Dawley ou Wistar âgés de 3 à 4 semaines (P17-P25). Des mâles ont été utilisés en priorité. Ces animaux sont nés et ont été élevés dans l'animalerie de notre laboratoire à l'Institut de Physiologie et de Chimie Biologique (jusqu'en juin 2014) puis dans l'animalerie du Chronobiotron du Centre de Neurochimie (après juin 2014). Les animaux disposaient de nourriture et d'eau à volonté et étaient soumis à une photopériode jour/nuit de 12h/12h. Toutes les expérimentations ont été effectuées en conformité avec la législation européenne directive 86/609/CCE du conseil de l'Europe du 24 novembre 1986 en ce qui concerne notre animalerie et avec l'autorisation de ministère français de l'agriculture (Licence numéro 67-107, R. Schlichter).

2. Dissection et réalisation des tranches de moelle épinière

Les rats sont anesthésiés par injection intra-péritonéale de kétamine (75 mg/kg, Imalgène 1000, Merial). La moelle épinière est prélevée par extrusion hydraulique comme décrit précédemment (Chéry et de Koninck, 1999). Pour réaliser ce prélèvement, une incision longitudinale de la peau du dos de l'animal est pratiquée, puis celui-ci est décapité. La colonne vertébrale est alors sectionnée aux niveaux sacré et cervical. Une pointe d'un cône de Pipetman de 200 μ L adaptée sur une seringue de 20 mL remplie de saccharose-ACSF froid est ensuite insérée dans le canal rachidien du côté sacré. L'injection de saccharose-ACSF dans le canal rachidien au niveau sacré permet d'expulser la moelle épinière du côté cervical (Figure 12.1). La moelle épinière ainsi extraite est rapidement transférée dans une boîte de Pétri remplie de saccharose-ACSF froid où les méninges sont retirées grâce à des pinces fines.

La dissection est réalisée dans une solution appelée saccharose-ACSF (Artificial CerebroSpinal Fluid), dont la composition en mM est : KCl 2 ; KH_2PO_4 1,25 ; CaCl_2 2 ; MgSO_4 1,3 ; saccharose 248 ; glucose 11 ; NaHCO_3 26. Cette solution est réfrigérée à 1-4°C

et constamment équilibrée avec du carbogène (95 % O₂ / 5 % CO₂). Dans cette solution, le NaCl est remplacé par du saccharose afin d'empêcher la genèse de potentiels d'action. Cette condition expérimentale minimise la libération synaptique massive de glutamate lors de la section du tissu et par conséquent permet de limiter les phénomènes d'excitotoxicité liés notamment à l'activation des récepteurs NMDA.

Le renflement lombaire de la moelle épinière est ensuite prélevé en pratiquant des sections au scalpel de part et d'autre de la région d'intérêt (Figure 12.2). La portion de moelle épinière ainsi isolée est alors disposée dans une gouttière taillée dans un bloc d'agarose à 5 %. La taille de la gouttière est adaptée de façon à permettre un bon maintien de la moelle lors de la préparation des tranches. Le cube contenant la moelle est collé sur la platine d'un vibratome (Leica VT1200S) avec de la colle au cyanoacrylate (Loctite, Henkel France) (Figure 12.3). La platine est rapidement placée dans la cuve, qui a été préalablement remplie de saccharose-ACSF froid (1-4°C). Des tranches transversales de 600 µm sont réalisées à une vitesse de coupe de 0,2 mm/s et une amplitude de vibration de 3 mm (Figure 12.4), puis conservées à température ambiante sur un filet de nylon dans une chambre de stockage remplie avec de l'ACSF (c.f composition ci-dessous) constamment équilibré avec un mélange de 95 % O₂ / 5 % CO₂ (Figure 12.5) pendant au moins 1 heure avant de commencer les enregistrements.

3. Enregistrements électrophysiologiques

Les enregistrements ont été effectués en utilisant la configuration « cellule entière » de la technique de patch-clamp. Soit en mode potentiel-imposé, soit en mode courant-imposé.

a) Pipettes

Les pipettes sont obtenues à partir de capillaires de borosilicate (modèle CC120F-10 ; diamètre externe : 1,2 mm ; diamètre interne : 0,69 mm ; Harvard Apparatus). Ces capillaires sont étirés avec une étireuse horizontale à laser P-2000 ou à filament P-1000 (Sutter Instrument Co, Novato, California, USA). Les paramètres d'étirement ont été choisis pour que la résistance électrique finale des pipettes remplies avec du milieu intracellulaire (cf composition ci-dessous) soit comprise entre 3,5 et 5,5 MΩ.

b) Solutions

-Milieu extracellulaire

Lors des enregistrements électrophysiologiques, les tranches sont immergées dans une solution d'ACSF (Artificial CerebroSpinal Fluid), dont la composition est la suivante (en mM) : NaCl 126 ; NaHCO₃ 26 ; glucose 10 ; KCl 2,5 ; CaCl₂ 2 ; MgCl₂ 2 ; NaH₂PO₄ 1,25. Lorsque ce milieu est saturé avec un mélange de 95 % d'O₂ / 5 % de CO₂, son pH est de 7,3.

-Milieu intracellulaire

Les pipettes sont remplies avec une solution contenant (en mM) : CsSO₄ 80 ; HEPES 10 ; MgCl₂ 2 ; biocytine 10 ; pour les enregistrements en configuration potentiel imposé. La biocytine diffuse dans le neurone pendant l'enregistrement et permettra de réaliser des marquages immunohistochimiques postérieurs à l'expérience d'électrophysiologie. Le pH de la solution intracellulaire est ajusté à 7,3 avec une solution d'hydroxyde de césium (CsOH) et l'osmolarité est mesurée avec un osmomètre et ajustée à 300 ± 10 mOsm par l'ajout de saccharose. Ce milieu intrapipette a été choisi de manière à pouvoir facilement distinguer les courants synaptiques inhibiteurs des courants synaptiques excitateurs. En effet, avec les milieux extracellulaire et intracellulaire utilisés, le potentiel d'équilibre des cations (E_{cat}) est de 0 mV et celui des ions chlorure (E_{Cl}) est de -90 mV. Pour enregistrer les courants excitateurs, le potentiel de maintien (V_h) a été fixé à -60 mV. Dans ces conditions expérimentales les courants synaptiques excitateurs sont visualisés sous forme de déflexions négatives de la trace du courant (courants entrants). Pour les courants inhibiteurs, le V_h est fixé à 0 mV. Dans ce cas, les courants synaptiques inhibiteurs sont enregistrés sous forme de déflexions positives de la trace du courant (courants sortants).

c) Dispositif expérimental et déroulement des enregistrements électrophysiologiques

Le dispositif expérimental comprend la chambre d'enregistrement contenant la tranche de moelle épinière qui est constamment perfusée avec du milieu extracellulaire (ACSF) par un système de perfusion par gravité. L'application des différentes substances à tester se fait grâce à un système de robinets multivoies. Pour procéder à un enregistrement, une tranche aiguë de moelle épinière est tout d'abord transférée de la chambre d'incubation vers la

chambre d'enregistrement dans laquelle sont placées les électrodes d'enregistrement et de référence.

Les enregistrements électrophysiologiques sont effectués sur un poste de « blind-patch » où la tranche de moelle épinière est visualisée avec une loupe binoculaire.

L'électrode d'enregistrement est positionnée verticalement au-dessus de la lamina dans laquelle un neurone va être enregistré. La lamina II est facilement identifiable dans la tranche épaisse, sous la forme d'un croissant translucide car elle renferme peu d'axones myélinisés. La lamina V est repérée à l'aide d'indices morphologiques comme la position du canal de l'épendyme et celle de la zone où la substance blanche du cordon latérale s'invagine dans la substance grise de la zone centrale. Pour certaines expériences, une section mécanique a été réalisée entre les laminae IV et V afin d'interrompre la communication cellulaire entre les laminae superficielles et profondes de la corne dorsale. Cette procédure est réalisée sous une loupe binoculaire dans la chambre d'enregistrement à l'aide d'un morceau de lame de rasoir monté sur un micromanipulateur. La section est réalisée à la base de l'invagination permettant de localiser la lamina V.

Au moment de la descente de l'électrode, une légère surpression est appliquée à l'intérieur de la pipette afin d'éviter son obturation, et des créneaux de potentiel de 5 mV (20 ms) sont appliqués à l'intérieur la pointe de la pipette à une fréquence de 50 Hz. Ce protocole permet de mesurer en permanence la résistance électrique de l'électrode lors de sa descente dans la tranche. En effet, l'amplitude du courant que le système doit injecter pour réaliser ce saut de potentiel est directement proportionnelle à la résistance de l'électrode. Lorsque la pointe de l'électrode entre en contact avec une membrane cellulaire, la valeur de la résistance électrique de l'électrode augmente et par conséquent l'intensité du courant qui est nécessaire pour réaliser ce saut de potentiel diminue. Quand la résistance de l'électrode augmente d'environ 0,5 M Ω on relâche la surpression initialement imposée afin d'aspirer la partie de la membrane de la cellule située sous la pointe de l'électrode. On obtient ainsi entre la pointe de la pipette et la membrane cellulaire une jonction à forte résistance dont la valeur est de l'ordre du giga ohm ($10^9 \Omega$). On appelle cette jonction le « gigaseal » et la configuration obtenue est dite « cellule attachée ».

Tableau 1. Substances pharmacologiques utilisées.

Abréviation	Nom complet	Fournisseur	Concentration finale utilisée	Propriété pharmacologique	Solvant du stock de la solution	Stockage
NA	Noradrénaline	Sigma, St. Louis, USA	20 μ M	Agoniste endogène des récepteurs adrénergiques	H ₂ O	- 20°C
Phe	Phényléphrine	Sigma, St. Louis, USA	20 μ M	Agoniste des récepteurs α 1	H ₂ O	- 20°C
Clo	Clonidine	Sigma, St. Louis, USA	10 μ M	Agoniste des récepteurs α 2	H ₂ O	- 20°C
Iso	Isoprotérénol	Sigma, St. Louis, USA	20 μ M	Agoniste des récepteurs β	H ₂ O	- 20°C
Phento	phentolamine	Sigma, St. Louis, USA	10 μ M	Antagoniste des récepteurs α -adrénergiques	H ₂ O	- 20°C
Propra	propranolol	Sigma, St. Louis, USA	50 μ M	Antagoniste des récepteurs β -adrénergiques	H ₂ O	- 20°C
FC	Acide fluorocitrique - fluorocitrate	Sigma, St. Louis, USA	100 μ M	Inhibiteur de l'aconitase gliale	ACSF	Préparé le jour même
PPADS	Pyridoxalphosphate-6-azophényl-2',4'-disulfonic acid	Sigma, St. Louis, USA	10 μ M	Antagoniste des récepteurs P2X	H ₂ O	- 20°C
BBG	Brillant blue G	Sigma, St. Louis, USA	1 μ M	Antagoniste des récepteurs P2X ₇	H ₂ O	- 20°C
Bicuculline	Bicuculline	Sigma, St. Louis, USA	10 μ M	Antagoniste des récepteurs GABA _A	H ₂ O	- 20°C
PMBA	phenylbenzene ω -phosphono- α -amino acid	Sigma, St. Louis, USA	10 μ M	Antagoniste des récepteurs de la glycine	H ₂ O	- 20°C
TTX	Tétradotoxine	Latoxan, Valence, France	0,5 μ M	bloquant des canaux Na ⁺ voltage dépendants	H ₂ O	- 20°C
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione	Tocris, Bristol, UK	10 μ M	antagoniste des récepteurs AMPA/kainate	DMSO	- 20°C
APV	D-2-amino-5-phosphonovalérate	Abcam, Cambridge, UK	50 μ M	antagoniste des récepteurs NMDA	H ₂ O	- 20°C
Capsaïcine	Capsaïcine	Sigma, St. Louis, USA	5 μ M	Agoniste des récepteurs TRPV1	éthanol	4°C
DA	Dopamine	Sigma, St. Louis, USA	50 μ M	Agoniste endogène des récepteurs dopaminergiques	H ₂ O	- 20°C
Sulpiride	Sulpiride	Sigma, St. Louis, USA	2 μ M	Antagoniste des récepteurs D ₂	éthanol	- 20°C
Quinpirole	Quinpirole	Sigma, St. Louis, USA	1 μ M	Agoniste des récepteurs D ₂	H ₂ O	- 20°C
SCH 23390	SCh 23390	Sigma, St. Louis, USA	1 μ M	Antagoniste des récepteurs D ₁	H ₂ O	- 20°C
SKF 38393	SKF 38393	Sigma, St. Louis, USA	1 et 10 μ M	Agoniste des récepteurs D ₁	H ₂ O	- 20°C

Configuration « cellule entière »

Cette configuration nécessite la rupture du fragment de membrane isolé sous la pointe de la pipette une fois que le gigaseal est établi. Pour cela, une aspiration légère et soutenue est appliquée à l'intérieur de la pipette. Lorsque le fragment de membrane se rompt, des grands courants capacitifs apparaissent sous forme de deux pics transitoires au début et à la fin de l'application du saut de potentiel de 5 mV. Ils sont dus à la capacité électrique de la membrane cellulaire et sont compensés par un dispositif interne à l'amplificateur. Les enregistrements peuvent alors débiter.

Substances pharmacologiques

Les différentes substances utilisées sont appliquées par perfusion générale dans le bain où se trouve la tranche aiguë de moelle épinière. Le débit est de 3 mL/min pour un volume total de la chambre de perfusion de 1,5 mL. Des stocks des substances pharmacologiques utilisées sont préparés à l'avance à une concentration mille fois supérieure à celle utilisée pour les applications. Les substances ont été préparées à leur concentration finale d'utilisation dans le milieu extracellulaire juste avant les expériences électrophysiologiques. Les différentes substances et leurs conditions de préparation et d'utilisation sont résumées dans le tableau 1.

Acquisition des données

Les enregistrements sont effectués avec un amplificateur Axopatch 200A (Axon Instruments) en condition de potentiel-imposé. La trace du courant est filtrée à 5 kHz, puis digitalisée par une interface analogique/digitale (National Instruments, BNC-2110) à une fréquence d'échantillonnage de 20 kHz et stockée sous forme numérique sur le disque dur d'un ordinateur. Les signaux sont par ailleurs visualisés grâce au logiciel WinEDR (Strathclyde Electrophysiology Software, John Dempster, University of Strathclyde, Glasgow, UK) et un oscilloscope.

Analyse des données

La détection des événements synaptiques est réalisée par une méthode de seuillage avec le logiciel WinEDR. Pour l'analyse de CPSEs et des CPSEm tous les événements d'une amplitude ≥ 2 pA et d'une durée $\geq 1,25$ ms sont détectés. Pour l'analyse des CPSIs et des

CPSIm les seuils de 3 pA et de 1,75 ms sont utilisés. Suite à l'étape de détection par le logiciel, une inspection visuelle de chaque événement détecté est réalisée afin de vérifier qu'il s'agit bien de courants synaptiques. En effet, seuls les événements avec un temps de montée rapide (de l'ordre de la milliseconde) et présentant une décroissance exponentielle sont retenus pour la suite de l'analyse.

Pour chaque neurone analysé, le nombre cumulé N des événements synaptiques est exprimé en fonction du temps. Cette distribution est ajustée par deux droites selon les équations suivantes :

$$N = f_0 \times t + a \quad \text{pour } t < t_c \text{ et}$$

$$N = f_c \times t + (f_0 - f_c) \times t_c + a \quad \text{pour } t \geq t_c$$

où la pente f_0 représente la fréquence dans les conditions contrôle et f_c de la fréquence moyenne suite à l'application de la substance. t_c est la valeur de temps correspondant au point d'intersection des deux droites et indique la valeur de temps à laquelle se produit le changement de fréquence. "a" est une constante. Une illustration de ce type d'ajustement est représentée dans la figure 1 de l'article de la partie résultat. Nous considérons que les substances appliquées ont un effet quand t_c se situe pendant la période d'application de la substance et que le changement de fréquence observé est supérieur à 20 % de la fréquence contrôle du neurone enregistré. Le pourcentage d'augmentation de la fréquence des courants postsynaptiques est calculé de la manière suivante :

$$\text{Changement de fréquence (\%)} = [(f_c - f_0)/f_0] \times 100$$

Les 5 minutes d'enregistrement qui précèdent l'application d'une substance sont définies comme la période témoin. Pour mettre en évidence un éventuel changement de la fréquence des courants synaptiques, nous avons comparé les distributions cumulées des intervalles entre les événements synaptiques avant et après l'application de la substance. Chaque distribution représente la somme de tous les événements en fonction du temps. La pente de cette relation représente la fréquence moyenne des événements synaptiques et un changement de pente correspond à un changement de la fréquence des événements synaptiques (augmentation ou baisse de pente/fréquence).

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

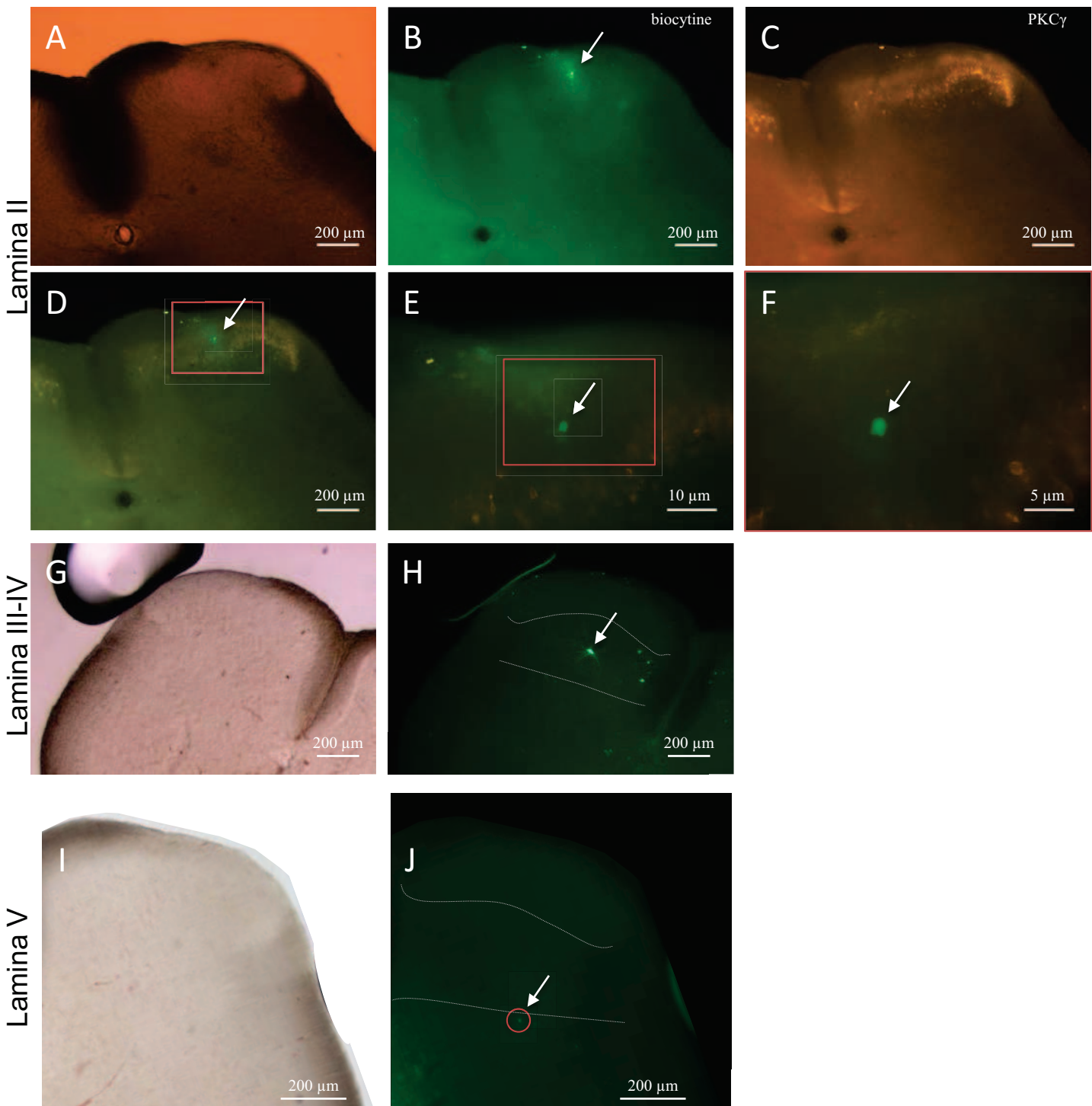


Figure 13. Exemples de localisations de neurones enregistrés dans les laminae II, III-IV et V

A Image en fond clair d'une tranche épaisse (600 μm) de moelle épinière fixée au paraformaldéhyde après une expérience de patch-clamp. L'image est centrée sur la corne dorsale. **B** Révélation immunohistochimique de la biocytine (injectée dans le neurone lors de l'enregistrement) grâce à de l'extravidine couplée à la FITC (vert). **C** Marquage de la PKC γ révélée avec un anticorps secondaire couplé au CY3 (rouge). Le profil de marquage de la PKC γ permet de visualiser les limites entre la couche II interne et la couche III externe. Les photos A,B et C proviennent de la même tranche. **D** Superposition des images B et C. **E** et **F** Visualisation à plus forts grossissements du neurone contenant de la biocytine. **G** et **H** Image en fond clair et en fluorescence d'un neurone enregistré dans les couches III-IV. **I** et **J** Images en fond clair et en fluorescence d'un neurone enregistré dans la couche V.

« endplate current » qui permet, entre autre, de déterminer l'amplitude maximale (A) et la constante de désactivation (τ_D) de chaque courant synaptique.

d) Révélation immunohistochimique des neurones enregistrés

À la fin de l'enregistrement, la tranche est transférée dans du paraformaldéhyde 4 % dilué dans du tampon phosphate (0,1 M) pour fixer le tissu avant les marquages immunohistochimiques. Ces marquages ont été dirigés contre la biocytine et éventuellement contre la protéine kinase C de type γ (PKC γ) afin de vérifier la position laminaire du neurone enregistré (Figure 13).

Après 3 lavages de 10 minutes au tampon phosphate saccharose (PBS) les sites spécifiques sont saturés avec du sérum d'âne à 10 % (Dutscher SAS, Brumath, France) dans du PBS complété avec du triton à 0,5 % durant 1 h. Ensuite, la tranche est incubée pendant une nuit en chambre froide, sous agitation permanente, avec l'anticorps primaire anti PKC γ produit chez le lapin (1/5000, Santa Cruz) et de la FITC couplée à de l'extravidine (1/400, Sigma, St. Louis, USA). Le lendemain, 3 rinçages de 10 minutes avec du PBS sont réalisés, puis la tranche est incubée pendant 1 h avec anticorps secondaire d'âne anti-lapin couplé au CY3 (1/400, Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk, UK). Pour finir, 3 rinçages de 10 minutes avec du PBS sont réalisés et la tranche est montée entre lame et lamelle avec du milieu de montage Dako (Dako France, Trappes, France). L'observation se fait ensuite au microscope à fluorescence (DMR, Leica, Nanterre France).

4. Tests comportementaux

Test nociceptifs

Le seuil mécanique de retrait de pattes postérieures a été évalué avec des filaments de von Frey (Bioseb, Chaville, France). Les rats étaient placés dans des boîtes de plexiglass transparentes (17 x 17 x 35 cm) sur une grille surélevée 15 minutes avant le test pour leur permettre de s'habituer. Les filaments étaient appliqués sur la surface plantaire de chaque patte postérieure selon une série croissante de forces (4 à 180 grammes). Chaque filament est testé cinq fois par patte en étant appliqué jusqu'à qu'il se courbe et le seuil de réponse est défini pour la valeur de filament la plus faible qui déclenche trois retraits ou plus sur les cinq essais. La sensibilité nociceptive thermique au chaud a été estimée avec la méthode de la plaque chaude. Les rats étaient placés sur la plaque chaude ajustée à une température de $50^{\circ} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$. La latence du premier léchage ou retrait d'une patte postérieure est compté comme indice du seuil nociceptif, suite à cette observation l'animal est immédiatement retiré de la plaque chaude. Chaque animal a été testé avant et après les injections : 45 min après l'injection intrathécale du FC et 15 min après injection intraplantaire de capsaïcine.

Injections intrathécales

Des injections intrathécales (i.t.) d'un volume de 10 μL étaient réalisées sous anesthésie gazeuse (isoflurane 3 %). Une aiguille de 27-gauge connectée à une seringue Hamilton de 50 μL était insérée entre les vertèbres L5 et L6 dans l'espace sous-arachnoïdien. Le placement de l'aiguille était vérifié par le déclenchement d'un mouvement réflexe de la queue du rat. Les tests nociceptifs ont été réalisés 45 min après l'injection intrathécale de fluorocitrate.

Injections intraplantaires

Sous anesthésie gazeuse (isoflurane 3 %), 10 μL de capsaïcine (1 mM, solubilisée dans 20 % d'éthanol avec 0,9 % de NaCl) ou de solution saline ont été injectés dans la voûte plantaire des deux pattes postérieures des rats avec une aiguille de 27-gauge connectée à une seringue Hamilton de 50 μL . Les tests nociceptifs ont été réalisés 15 min après ces injections.

5. Statistiques

Pour comparer les distributions des paramètres analysés et les proportions de réponse des neurones dans différentes conditions, nous avons utilisé les tests statistiques suivants : test de Kolmogorov-Smirnov, test exact de Fisher et test de Student pour données appariées. Les fréquences moyennes des différentes conditions ont été comparées avec le test de Wilcoxon-Mann-Whitney. Pour comparer les seuils et les latences de réponses comportementales nous avons utilisé les tests de Wilcoxon-Mann-Whitney et de Kruskal-Wallis.

Les données sont exprimées en tant que moyenne \pm s.e.m. Les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel Kyplot (KyPlot 2.15, KyensLab, Tokyo, Japan) et les proportions des tableaux de contingence ont été comparées avec le test exact de Fisher (<http://quantpsy.org/fisher/fisher.htm>). Les seuils de significativité (p) sont fixés à 0,05 sauf pour le test de Kolmogorov-Smirnov où il est fixé à 0,01.

Les symboles utilisés dans les figures pour indiquer les p-valeurs sont les suivants :

*** < 0,001 < ** < 0,01 < * < 0,05 < n.s. (non significatif).

RÉSULTATS

Les résultats présentés dans cette thèse concernent essentiellement la caractérisation des effets de la NA sur la transmission synaptique dans les couches profondes de la CDME. Ils ont donné lieu à un manuscrit actuellement soumis pour publication. Celui-ci s'intitule « *Glia to neuron communication underlies Noradrenaline-induced facilitation of inhibitory synaptic transmission in the dorsal horn of the spinal cord* ». Les résultats de cet article sont complétés par des données supplémentaires concernant les effets de la NA dans la lamina II de la CDME (non inclus dans l'article). Ces données sont présentées sous forme d'annexe qui suit directement l'article.

Par ailleurs, nous présentons des données préliminaires de travaux en cours. Celles-ci concernent deux thèmes :

1) l'interaction entre la dopamine (DA) et la NA dans les couches profondes de la CDME

En effet, au cours des travaux visant à caractériser l'impact de la NA et des agonistes des adrénocéphes sur les transmissions synaptiques des laminae III-IV nous nous sommes rendu compte que la DA, une autre catécholamine impliquée dans les contrôles descendants analgésiques, avait des effets similaires aux effets de la NA sur la transmission synaptique inhibitrice. Nous avons alors entrepris la caractérisation de ces effets de la DA et nous sommes aperçu qu'ils pourraient impliquer l'activation des récepteurs de la NA par la DA dans les laminae III-IV de la CDME.

2) le rôle des cellules gliales dans l'intégration des messages nociceptifs dans la CDME

Les données concernant l'effet de la NA sur la transmission synaptique inhibitrice (c.f article) montrent l'importance des cellules gliales de la CDME dans le fonctionnement du système noradrénergique spinal. Nous avons voulu voir si la glie spinale était également impliquée d'une manière plus générale dans le traitement des informations nociceptives. Pour cela nous avons travaillé sur le réseau spinal recruté par la stimulation des fibres afférentes nociceptives exprimant TRPV1 qui a été bien caractérisé au cours des travaux

récents de notre laboratoire (Petitjean et al., 2012). Nous avons étudié les caractéristiques fonctionnelles de ce réseau lorsque les cellules gliales sont inhibées par le FC et avons évalué l'impact de cette inhibition gliale sur la sensibilité nociceptive en utilisant des tests comportements nociceptifs mécaniques et thermiques au chaud.

I. Glia to neuron communication underlies Noradrenaline-induced facilitation of inhibitory synaptic transmission in the dorsal horn of the spinal cord

Abbreviated title: Noradrenaline controls glia to neuron signaling

Authors: Frederik Seibt^{1,2} and Rémy Schlichter^{1,2}

Authors address:

¹ Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives - Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS UPR 3212), Strasbourg, France

² Université de Strasbourg, Strasbourg, France

5 rue Blaise Pascal, F-67084 Strasbourg, France

Corresponding author:

Prof Rémy Schlichter at the above address

E-mail: schlichter@inci-cnrs.unistra.fr

Phone: (+33) 3 88 45 66 65 Fax: (+33) 3 88 60 16 64

Main points: Noradrenaline facilitates inhibitory but not excitatory synaptic transmission in the dorsal horn of the spinal cord. This effect is blocked by the glial metabolism inhibitor fluorocitrate indicating an important role of glia to neuron communications.

Keywords : adrenoceptor, inhibitory postsynaptic current, astrocyte, GABA, glycine.

Abstract

In the dorsal horn (DH) of the spinal cord, Noradrenaline (NA) is released by axons originating from the Locus Coeruleus and induces spinal analgesia, the mechanisms of which are poorly understood. Here we investigated the types of adrenoceptors (ARs) involved in the actions of NA in the DH and checked for a possible contribution of glial cells to these effects. We show that exogenously applied as well as endogenously released NA facilitated inhibitory (GABAergic and glycinergic) synaptic transmission in laminae III-IV of the DH by activating α 1-, α 2- and β -ARs. In contrast, NA was without effect on excitatory (glutamatergic) synaptic transmission. Short term pretreatment of the spinal cord slices with fluorocitrate (FC, 100 μ M for 1h), that is known to inhibit glial cell metabolism, in particular the glial glutamate/glutamine cycle and the production of adenosine triphosphate (ATP), blocked or strongly reduced the modulatory effects of NA and AR agonists on inhibitory synaptic transmission without impairing synaptic release of GABA or glycine from neurons. Pharmacological blockade of ionotropic glutamate and ATP receptors had quantitatively the same effect as pretreatment of the spinal cord slices with FC. Moreover, physical interruption of communications between deep and more superficial laminae also mimicked the effect of FC. Taken together, our results indicate that the facilitation of inhibitory synaptic transmission in the DH by NA requires an obligatory step involving glia to neuron communication. These glial networks and/or glia to neuron interactions might represent interesting targets for analgesic strategies.

Introduction

Noradrenaline (NA) plays an important role in the modulation of a variety of functions of the central nervous system (CNS) via long distance and widespread projections from brainstem nuclei to numerous brain and spinal cord regions (O'Donnell et al., 2012; Szabadi 2013). NA is released at local junctions with neurons and glial cells that do not necessarily have the classical structures of synapses (Ridet et al., 1993) and may act through both volume transmission and classical wired transmission (Bekar et al., 2008; Hirase et al., 2014; O'Donnell et al. 2012; Satoh et al., 1982). NA also controls energy metabolism and the release of gliotransmitters such as glutamate or adenosine-5'-triphosphate (ATP) from astrocytes (Gordon et al., 2005; Hertz et al., 2015; Salm and McCarthy 1992).

The actions of NA in the CNS are mediated by several types of G-protein coupled receptors (adrenoceptors, AR): α_1 -ARs that stimulate the phosphatidyl inositol metabolism/intracellular calcium pathway via Gq, and α_2 -ARs and β -ARs that are negatively and positively coupled to the synthesis of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) through $G_{i/o}$ and G_s proteins, respectively (Bylund et al., 1994; O'Donnell et al. 2012). In the CNS, α_1 - and β -ARs have facilitatory actions whereas α_2 -ARs mediate the inhibitory effects of NA (Szabadi 2013). Interestingly, all three receptor types are expressed by neurons as well as by glial cells (Hertz et al. 2015; Hosli et al., 1982; Salm and McCarthy 1992).

The dorsal horn (DH) of the spinal cord is a major structure for the integration and the modulation of nociceptive somatosensory information (Millan 1999) and is innervated by noradrenergic neurons having their cell bodies in the Locus coeruleus (LC) (Bruinstroop et al., 2012; Lyons et al., 1989). Activation of this coeruleo-spinal descending noradrenergic

projections inhibits nociception (Budai et al., 1998; Headley et al., 1978; Pertovaara 2006) and intrathecal (i.th.) injections of AR agonists induce analgesia (Jones 1992; Reddy et al., 1980). Although both α_1 and α_2 -ARs appear to mediate the effects of exogenously administered AR agonists (Pertovaara 2006; Reddy et al. 1980), endogenously released NA seems to target mainly α_2 -ARs (Budai et al. 1998; Yaksh 1985). So far, the cellular mechanisms of action of NA in the modulation of nociception have been studied mainly in lamina II of the DH where most C-type and some A δ -type nociceptive primary afferents terminate (Braz and Basbaum 2009; Brown 1982; Millan 1999) and the involvement of glial cells in the observed effects has not been addressed. NA hyperpolarizes a large fraction of DH neurons by activating α_2 -ARs whereas a smaller fraction of inhibitory interneurons are depolarized by NA via the activation of α_1 -ARs (Gassner et al., 2009; North and Yoshimura 1984). NA also inhibits the release of glutamate from the central terminals of A δ nociceptive primary afferents by a α_2 -AR-mediated effect (Kawasaki et al., 2003). Interestingly, stimulation of A δ -type nociceptive primary afferents or induction of a peripheral inflammation trigger a rapid release of NA in the DH via the excitation of the LC (Hitoto et al., 1998; Men et al., 1996). Moreover, i.th. administration of α_2 -AR agonists efficiently reduce mechanical allodynia (Yaksh et al., 1995), a situation in which a normally innocuous mechanical stimulus becomes painful, that is characteristic of inflammatory and neuropathic pain (Sandkuhler 2009). This potent analgesic effect of α_2 -AR agonists is also observed in humans and currently used in anesthetic procedures (Paris and Tonner 2005). It is also efficient in chronic pain patients but is only rarely used because it requires i.th. administration of the α_2 -AR agonists, their systemic administration inducing unwanted adverse effects such as sedation or hypotension (Smith et al., 2008).

Here, we show that NA or AR agonists did not affect excitatory transmission but increased inhibitory GABAergic and glycinergic transmission in laminae III-V of the DH via the activation of α_1 -, α_2 -, and β -ARs. Moreover, our results indicate that glial cells play a fundamental role in this effect of NA and suggest that this glia to neuron communication might be of importance in the analgesic effects of NA.

Materials and Methods

Animal procedures.

All experiments were performed on transverse lumbar spinal cord slices obtained from 18-24 days old rats born in the animal house of the laboratory. All procedures were conducted in conformity with the rules of the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) and had the approval of the French Department of Agriculture (license no. 67-107 to R.S.).

Preparation of slices.

Rats were anesthetized with a ketamine/xylazine solution (75mg/kg, i.p.) and decapitated. The spinal cord was removed by hydraulic extrusion and immediately immersed in ice cold (0–4°C) sucrose-based artificial cerebrospinal fluid (sACSF) containing (in mM): 248 sucrose, 11 glucose, 26 NaHCO₃, 2 KCl, 1.25 KH₂PO₄, 2 CaCl₂ and 1.3 MgSO₄; oxygenated with 95% O₂ and 5% CO₂. The lumbar segment was isolated and embedded in a 5% agarose block. Transverse 600 μ m thick slices were cut with a vibratome (VT1200S, Leica, Nussloch, Germany). Slices were stored at room temperature in a chamber filled with artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM): 126 NaCl, 26 NaHCO₃, 2.5 KCl,

1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂ and 10 glucose; oxygenated with 95% O₂ and 5% CO₂ (pH 7.3; 310 mOsm).

Electrophysiological recordings.

Slices were transferred to a recording chamber and continuously superfused with oxygenated ACSF. In some experiments, a mechanical transection was performed between laminae IV and V in order to interrupt cellular communications between deep and more superficial laminae (Petitjean et al., 2012). This procedure was achieved under visual control (stereomicroscope) directly in the recording chamber using a razor blade mounted on a micromanipulator. Neurons from laminae III–IV and V were recorded in the whole-cell configuration using the blind-patch technique. Patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries (1.2mm o.d, 0.69mm i.d, Harvard Apparatus, Edenbridge, UK) using a P-2000 or a P-1000 puller (Sutter Instruments, Novato, CA, USA). Pipettes were filled with a solution containing (in mM): 80 Cs₂SO₄, 10 HEPES and 2 MgCl₂ (pH 7.3, adjusted with CsOH; osmolarity 310 mOsm adjusted with sucrose) and had final tip resistances between 3.5 and 4.5 MΩ. In our experimental conditions, the theoretical equilibrium potential for Cl⁻ ions was -90 mV. Voltage-clamp recordings were performed with an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, Union City, CA, USA) at a holding potential fixed at -60 mV for excitatory postsynaptic currents (EPSC) or at 0 mV for inhibitory postsynaptic currents (IPSC). Recordings were low-pass filtered (5 kHz) and acquired with WinEDR (Strathclyde Electrophysiology software, John Dempster, University of Strathclyde, Glasgow, UK). Current traces were digitized (20 kHz) and stored

on the hard drive of a personal computer. All experiments were performed at room temperature (22–24 °C).

Pharmacological substances.

In our experiments, following drugs were used: DL-noradrenaline hydrochloride (NA), phenylephrine hydrochloride (Phe), isoproterenol hydrochloride (Iso), 1(S),9(R)-(-)-Bicuculline methiodide, phenylbenzene ω -phosphono- α -amino acid (PMBA), phentolamine hydrochloride, propranolol hydrochloride, DL-fluorocitric acid barium salt (FC), brilliant blue G (BBG) (all from Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Clonidine hydrochloride, 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), Pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid (PPADS) tetrasodium salt (from Tocris, Bristol, UK), Tetrodotoxin (from Latoxan, Valence, France) and D-2-amino-5-phosphonovalerate (APV) (from Abcam, Cambridge, UK).

Drugs were prepared as 1000 times concentrated stock solutions in dimethylsulfoxide (CNQX) or water (all others). The stocks were stored at -20°C. All substances were diluted to their final concentration in ACSF at the beginning of each experiment and applied by general perfusion. FC was prepared as described by Paulsen et al. (1987) in order to remove the barium ions.

Data analysis.

Synaptic events were analyzed offline using WinEDR and WinWCP (Strathclyde Electrophysiology Software, John Dempster, University of Strathclyde, Glasgow, UK). Events were detected using an amplitude threshold detection algorithm and visually

inspected for validity. For each accepted event, the peak amplitude, rise time and decay time were determined by fitting the trace with the product of an error function and an exponential decay (EPC endplate current-fitting function of WinWCP). For each neuron analyzed, the cumulative number, N , of synaptic events was plotted as a function of time. A two-linear-segment curve was fitted by non-linear regression (KyPlot 2.15, KyensLab, Tokyo, Japan) using the following equation:

$$N = f_0 \times t + a \quad \text{for } t < t_c \text{ and}$$

$$N = f_c \times t + (f_0 - f_c) \times t_c + a \quad \text{for } t \geq t_c$$

where the slope f_0 provides another estimation of the average frequency under control conditions and f_c of the mean frequency following the application of the drug. t_c is the time at which the change in frequency occurs, and “a” the zero intercept (usually 0). For an illustration of this analysis procedure, see Fig. 2A. Drugs were considered to have an effect when t_c occurred during the application period of the substance and when the observed change in frequency exceeded 20% of the recorded basal frequency of spontaneously occurring excitatory postsynaptic currents (sEPSCs) or inhibitory postsynaptic currents (sIPSCs). The percentage of increase in frequency was calculated as follows:

$$\text{Change in frequency (\%)} = [(f_c - f_0)/f_0] \times 100$$

The distributions of inter-event intervals or amplitudes of sEPSCs or sIPSCs before and after application of a substance were compared using a Kolmogorov-Smirnov test with a confidence interval set at $p=0.001$ (Petitjean et al., 2014; Petitjean et al. 2012).

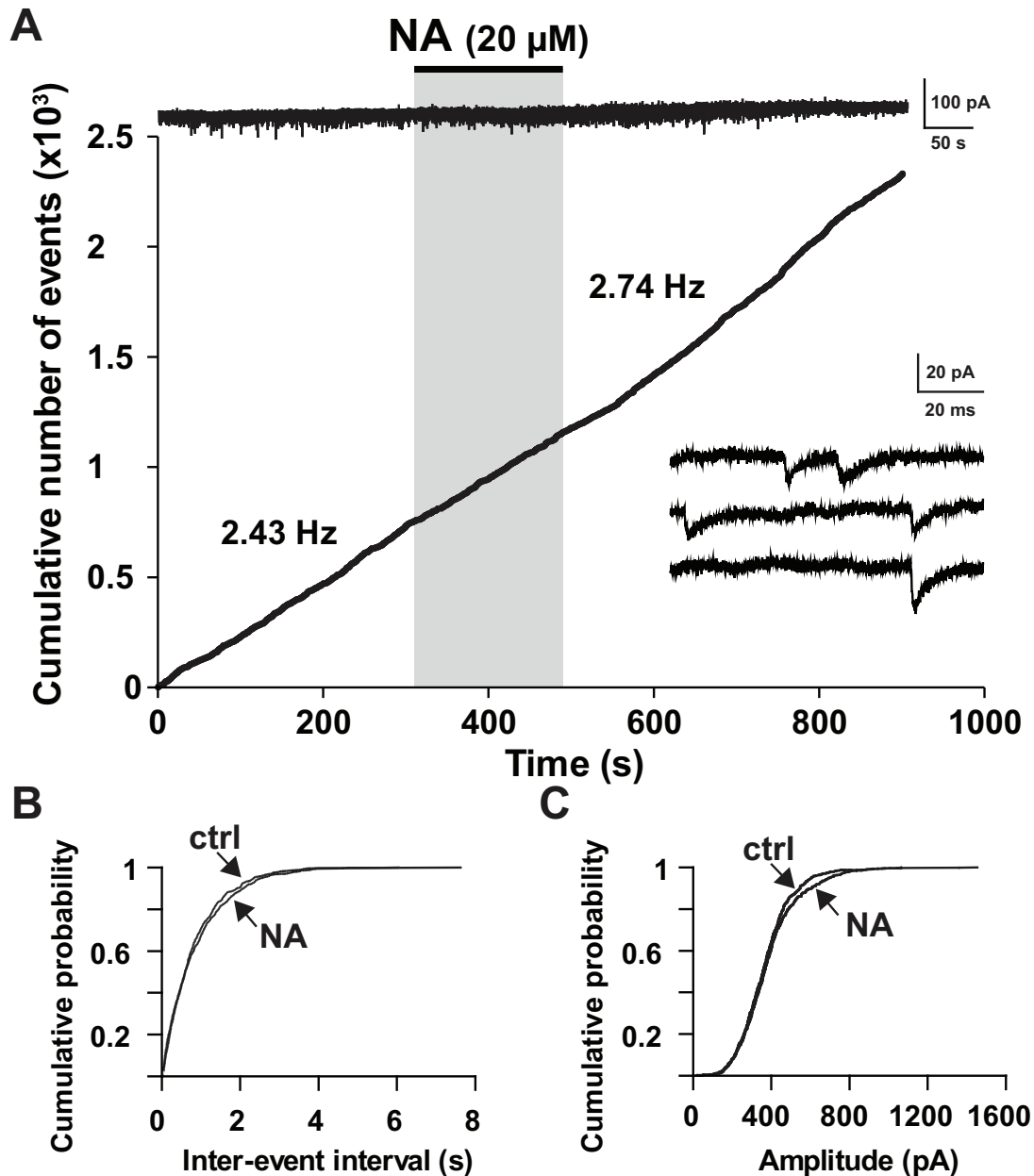


FIGURE 1: NA did not affect sEPSCs in laminae III-IV of the DH. (A) NA (20 μM) applied for 3 min via bath perfusion (black bar and gray area) had no effect on the frequency of sEPSCs recorded at a holding potential of -60mV in a laminae III-IV neuron. The upper panel shows the raw current trace and the lower panel represents the cumulative frequency histogram of sEPSCs. The gray shaded area represents the duration of NA application. Inset illustrates examples of sEPSCs displayed at higher time resolution. (B, C) Cumulative probability distribution of inter-event interval duration (B) and amplitudes (C) of sEPSCs before and after NA application in the same neuron. NA had no effect on these parameters (Kolmogorov-Smirnov (K-S) test, $p > 0.01$).

Statistics.

Data are expressed as the mean value \pm s.e.m. Statistical analyses were performed with KyPlot 2.15 (KyensLab, Tokyo, Japan). Proportions in contingency tables were compared with Fisher's exact test (<http://quantpsy.org>). Comparison of mean values of basal frequencies of sIPSCs recorded under different conditions (e.g. under control conditions and in the steady state presence of various glutamate or ATP (P2X) receptors antagonists) were compared using a Wilcoxon-Mann-Whitney test. The significance level for statistical tests was set at $p=0.05$ (except for for the Kolmogorov-Smirnov test where it was set at $p=0.01$ (see above)). Symbols used in figures to indicate p values are as follows: *** < 0.001 $< ** < 0.01$ $< * < 0.05$ $< \text{n.s.}$ (not significant).

Results

Effect of NA on excitatory synaptic transmission in laminae III-IV

When NA (20 μM) was bath applied for 3 minutes, no change in the frequency of sEPSCs was detected (0/12) during or following the application (Fig. 1) (control: 5.3 ± 2.1 Hz; NA: 5.0 ± 2.2 Hz, $n=12$). NA did not modify the amplitude distribution of sEPSCs in the cells examined ($n=9$). The mean amplitudes of sEPSCs were of -17.1 ± 10.1 pA ($n=9$) under control conditions and of -13.0 ± 9.0 pA ($n=9$) in the presence of NA.

Effect of NA on inhibitory transmission in laminae III-IV

Presynaptic effect of NA. NA (20 μM) reversibly increased the frequency of sIPSCs in the vast majority (93%; 25/27) of laminae III-IV neurons (Fig. 2A). The main characteristics of

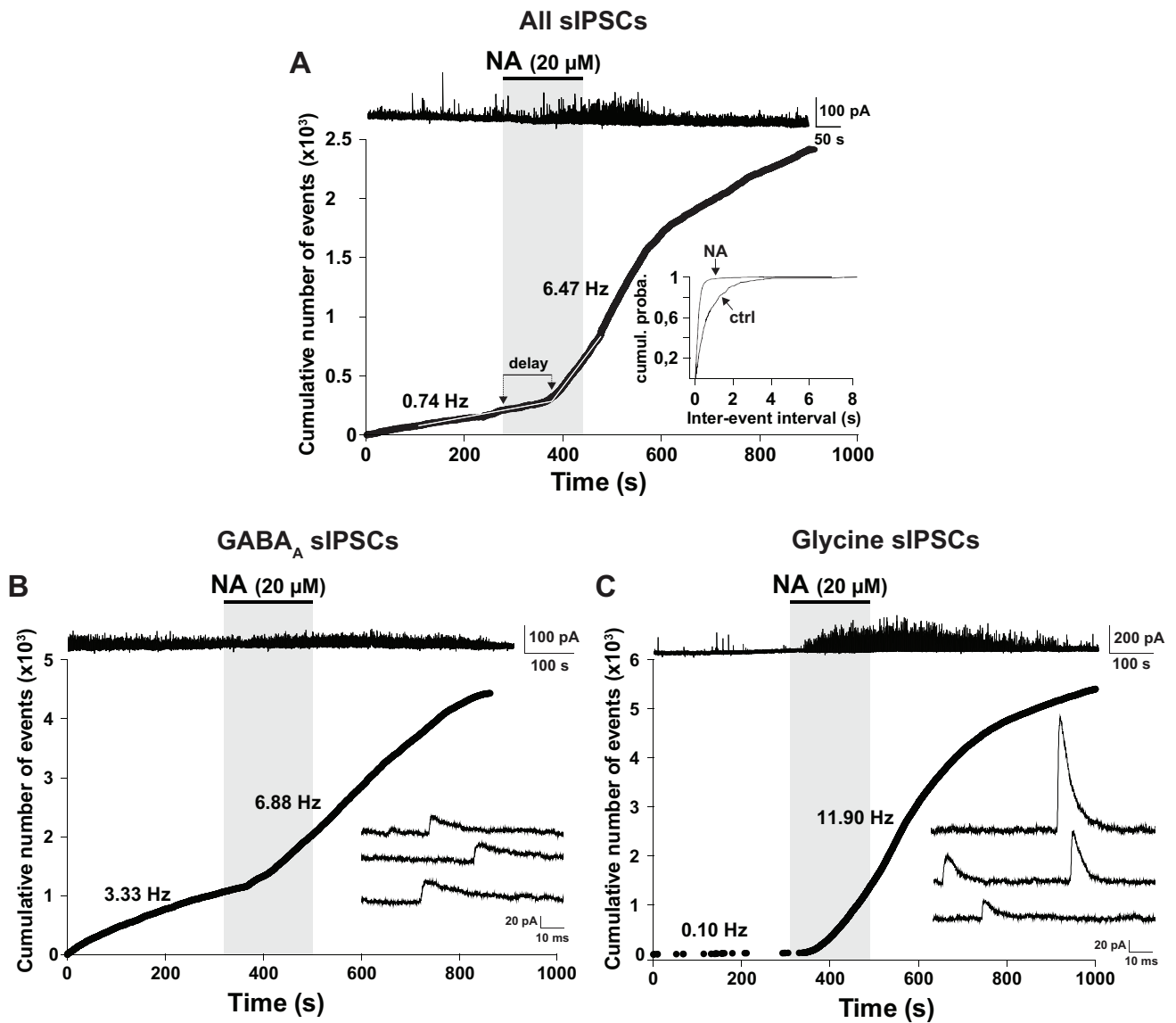


FIGURE 2: NA reversibly increased the frequency of GABAergic and glycinergic sIPSCs in laminae III-IV of the DH. (A) NA (20 μ M) applied for 3 min via bath perfusion (black bar and gray area) increased the frequency of sIPSCs (mixture of GABAergic and glycinergic sIPSCs) recorded at a holding potential of 0mV in a laminae III-IV neuron. The two white lines are the two linear segments fitted to the cumulative sIPSC distribution, and allow determining the mean values of the sIPSC frequencies before and during the application of NA. These values are indicated on the graph close to the cumulative probability distribution curve. The time elapsed between the beginning of drug application (beginning of the gray shaded area) and the intersection point between the two fitted line segments is taken as an index of the delay for the onset of the effect of the substance applied (here NA). In this neuron, NA increased the sIPSC frequency from 0.74 Hz to 6.47 Hz. Inset : NA significantly shifted the cumulative probability distribution of the inter-event intervals to the left indicating an increase in the frequency of sIPSCs (K-S test, $p = 1.8 \cdot 10^{-64}$). (B, C) NA (20 μ M) also increased the frequency of pharmacologically isolated GABAergic sIPSCs (recorded in the presence of 10 μ M PMBA) (B) and of pharmacologically isolated glycinergic sIPSCs (recorded in the presence of 10 μ M bicuculline) (C). Insets show representative traces of individual GABAergic and glycinergic sIPSCs displayed on a faster time scale.

these responses are summarized in Table 1. Decreases in sIPSC frequency were never observed. Since sIPSCs are composed of a mixed population of GlyR- and GABA_AR-mediated synaptic events (Inquimbert et al., 2007; Petitjean et al. 2012), we next isolated these two types of synaptic currents pharmacologically. GABA_AR-mediated sIPSCs were recorded in the presence of PMBA (10 μM), a selective GlyR antagonist (Saitoh et al., 1994). NA (20 μM) increased the frequency of GABA_AR-mediated sIPSCs in 43% (3/7) of the neurons (Fig. 2B). The mean basal frequency of these sIPSCs was of 1.1 ± 0.6 Hz (n=7) and NA increased this frequency by $265 \pm 251\%$ (n=3). GlyR-mediated sIPSCs were isolated in the presence of the GABA_AR antagonist bicuculline (10 μM). The basal frequency of GlyR-mediated sIPSCs was of 1.1 ± 0.2 Hz (n=7) and NA (20 μM) increased this frequency by $255 \pm 51\%$ (n=6) in 86% (6/7) of the neurons (Fig. 2C). There was no statistically significant difference in the proportions of neurons in which NA increased the frequency of GABA_AR sIPSCs (Fisher's exact test, p=0.26) or GlyR sIPSCs (Fisher's exact test, p=0.51).

In the presence of TTX (0.5 μM) to block action potential generation and propagation, NA (20 μM) never increased the frequency of sIPSCs (0/12), indicating that the site of action of NA was not close to the synaptic terminals of inhibitory neurons. The control frequency of mIPSCs was of 1.0 ± 1.3 Hz (n=12) and of 1.1 ± 1.6 Hz (n=12) in the presence of NA.

Postsynaptic effect of NA. In the presence of TTX (0.5 μM), NA (20 μM) had no significant effect on the amplitude of GABA_AR-mediated mIPSCs (0/5) (control: 21.6 ± 3.7 pA (n=5); NA: 22.7 ± 3.3 pA (n=5)). However, NA (20 μM) increased the amplitude of GlyR-mediated mIPSCs in 33% (3/9) of the neurons (mean increase in amplitude: $34.2 \pm 7.0\%$; n=3).

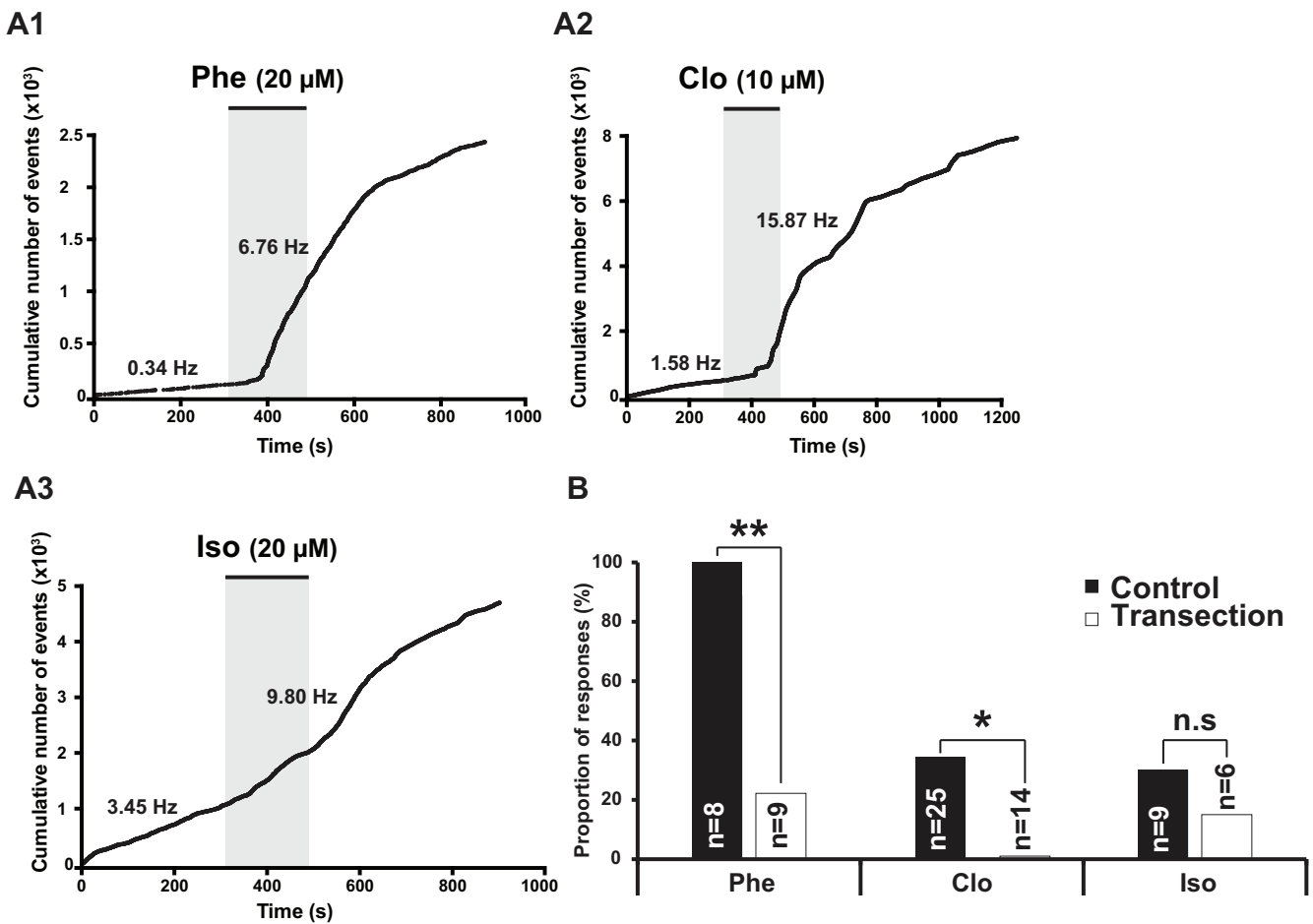


FIGURE 3: Effect of selective adrenoceptor agonists on inhibitory synaptic transmission in laminae III-IV of the DH in intact slices and in slices in which a mechanical section was performed between laminae IV and V. (A) Effects of selective AR agonists on the cumulative distributions of sIPSCs in laminae III-IV. Phenylephrine (Phe, α 1-AR agonist, 20 μ M, A1), clonidine (Clo, α 2-AR agonist, 10 μ M, A2) and isoproterenol (Iso, β -AR agonist, 20 μ M, A3) were bath applied for 3 minutes and increased the frequencies of sIPSCs in a reversible manner in the neurons illustrated. (B) Histogram showing the proportions of neurons recorded in laminae III-IV displaying an increase in sIPSC frequency following the application of Phe, Clo and Iso in intact slices (black bars) or in slices carrying a mechanical section between laminae IV and V (mechanical transection, white bars). In this and following figures, the numbers in the bars indicate the number of neurons tested. (Fisher's exact test, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, n.s. not significant)

Adrenoceptor subtypes involved in the presynaptic modulation of inhibitory synaptic transmission in laminae III-IV

Application of Phenylephrine (Phe, 20 μM), a selective agonist of NA at α_1 -ARs, reversibly increased the frequency of sIPSCs in all neurons tested (100%; 8/8) (Fig. 3A1, Table 1). Surprisingly, Clonidine (Clo, 10 μM), an agonist at α_2 -ARs, which is classically reported to inhibit excitatory synaptic transmission (Szabadi 2013), also increased the frequency of sIPSCs in 36% (9/25) of the neurons (Fig. 3A2, Table 1). The effects of Phe were never observed (0/6) in the presence of phentolamine (10 μM) or prazosin (0.5 μM) that block α_1 -ARs and Clo (10 μM) had no effect in the presence of the α_2 -AR antagonist yohimbine (2 μM) (0%; 0/17). These results confirmed that the effects of Phe and Clo were due to the activation of α_1 - and α_2 -AR, respectively. The β -AR agonist isoproterenol (Iso, 20 μM) also increased the frequency of sIPSCs in 33% (3/9) of the neurons (Fig. 3A3, Table 1).

In the steady presence of the general α -AR antagonist phentolamine (10 μM), NA (20 μM) increased the frequency of sIPSCs in 43% (3/7) of the neurons. This proportion was significantly lower than that observed in the absence of the antagonist (Fisher's exact test, $p=0.01$). In the presence of both phentolamine (10 μM) and the general β -AR antagonist propranolol (50 μM), NA failed to induce any change in the frequency of sIPSCs (0%, 0/9; Fisher's exact test, $p=5.8 \cdot 10^{-7}$).

Role of interlaminar connections in the effects of AR agonists on inhibitory transmission in laminae III-IV

As illustrated in Fig. 3B, in slices carrying a mechanical section between laminae IV and V (Petitjean et al. 2012), the proportion of neurons in laminae III-IV in which Phe (20 μM)

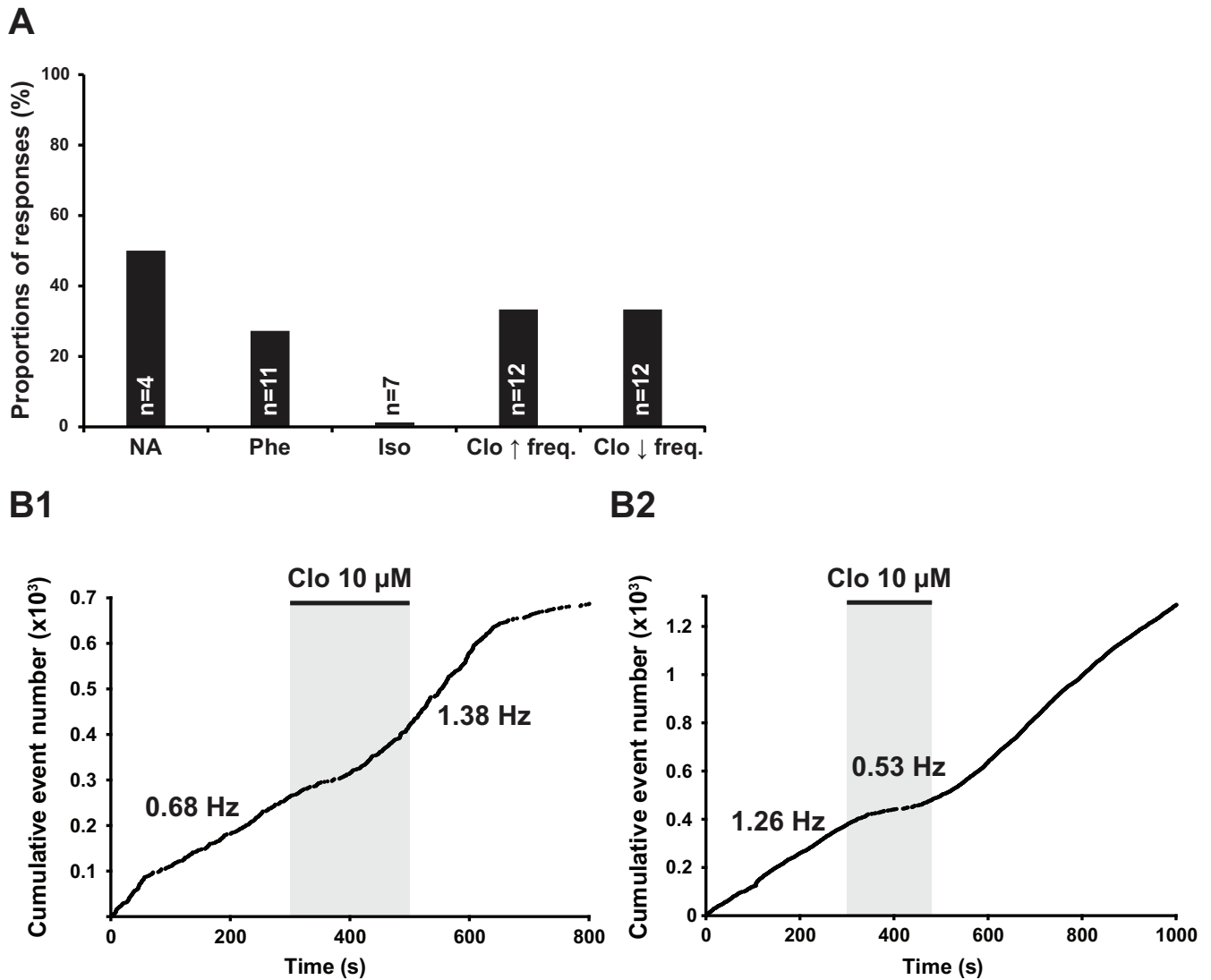


FIGURE 4: Effect of NA and AR agonists on the frequency of sIPSCs recorded in lamina V neurons. (A) Histogram of the proportion of lamina V neurons responding to NA and AR agonists with an increase in the frequency of sIPSCs (NA, Phe, Iso, Clo \uparrow Freq) or a decrease in sIPSC frequency (Clo \downarrow Freq). (B1) Cumulative distribution of sIPSCs in a lamina V neuron showing an increase in the frequency of sIPSCs following the application of Clo (10 μM). (B2) Cumulative distribution of sIPSCs in a lamina V neuron displaying a decrease in sIPSC frequency following Clo (10 μM) application.

increased the frequency of sIPSCs was significantly reduced (22%, 2/9; Fisher's exact test, $p=0.002$) and Clo (10 μM) had no effect (0%, 0/14; Fisher's exact test, $p=0.01$). By contrast, the proportion on neurons in which Iso (20 μM) facilitated inhibitory transmission was not affected by the transection (17%, 1/6; Fisher's exact test, $p=0.6$). The decrease in proportion of neurons responding to Phe or Clo was not due to an impairment of inhibitory transmission because in all cells tested (100%, 8/8) application of a high (50 mM) K^+ solution elicited a large increase in sIPSC frequency. The basal frequency of sIPSCs in laminae III-IV was not significantly affected by the transection (Control: 3.1 ± 0.6 Hz, $n=26$; transected: 3.3 ± 0.8 Hz, $n=17$; Wilcoxon-Mann-Whitney test, $p = 0.94$).

Effects of α - and β -AR agonists on synaptic transmission in lamina V of the DH

Phe (20 μM) increased the frequency of sIPSCs in only 27% (3/11) of the neurons in lamina V (Fig. 4A). This proportion was significantly smaller than in laminae III-IV (Fisher's exact test, $p=0.003$). Iso (20 μM) did not induce detectable changes in sIPSC frequency (0%, 0/7) (Fig. 4A). This proportion did however not significantly differ from that in laminae III-IV (Fisher's exact test, $p=0.21$). Interestingly, Clo (10 μM) triggered two types of effects (Fig. 4). In 33% of the neurons (4/12) Clo increased the frequency sIPSCs (Fig. 4A, B1). This proportion was not different from that in laminae III-IV (Fisher's exact test, $p=1$). In another 33% (4/12) of the neurons tested, Clo decreased the frequency of sIPSCs (Fig. 4A, B2). This was in marked contrast with the situation in laminae III-IV where such a decrease was never observed (0%, 0/25; Fisher's exact test, $p=0.007$).

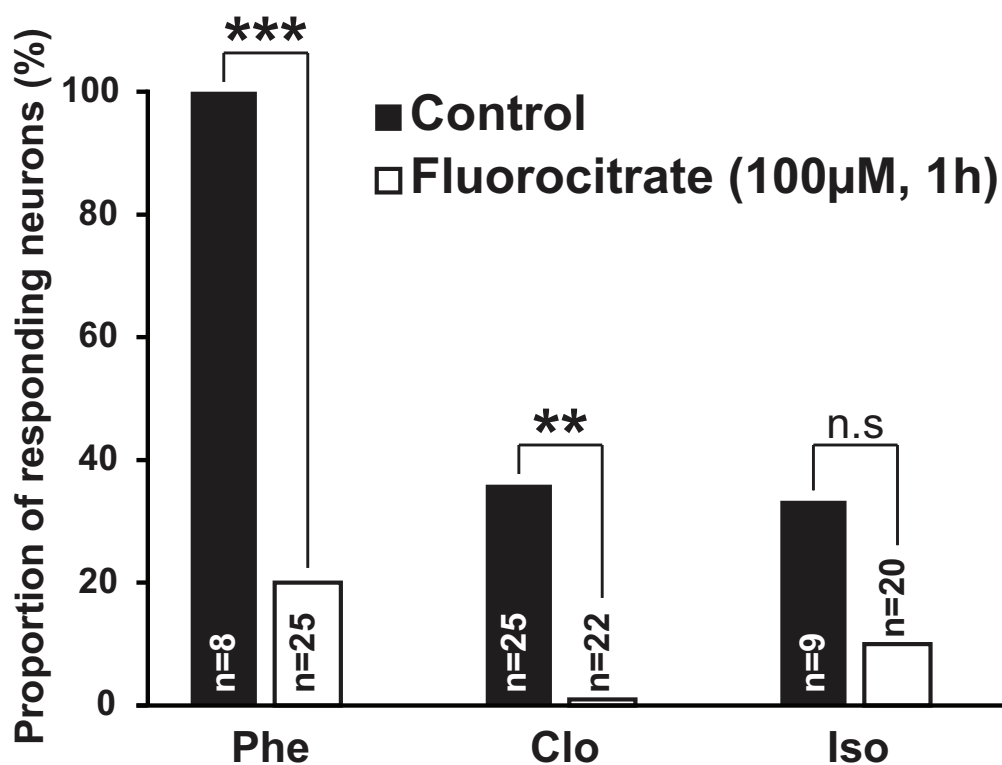


FIGURE 5: Inhibition of glial cell metabolism with fluorocitrate (FC) reduced the proportion of laminae III-IV neurons displaying an increase in sIPSC frequency following the application of AR agonists. In these experiments, slices were incubated for 1h in regular ACSF containing FC (100 µM) before starting electrophysiological recordings. The histogram summarizes the consequences of blocking glial cell metabolism with FC on the proportion of neurons recorded in lamina III-IV responding to AR agonists by an increase in the frequency of sIPSCs. Black bars represent the situation under control conditions (absence of FC) and white bars the situation after incubation with FC. (Fisher's exact test, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, n.s. not significant).

Implication of glia to neuron communication in the effect of NA on inhibitory synaptic transmission

To address this issue, we incubated the spinal cord slices for 1h with fluorocitrate (FC, 100 μ M), a substance that is preferentially taken up by glial cells and inhibits glial cell metabolism (Hassel et al., 1992; Hertz et al. 2015). Under these conditions, it was shown that FC has no major effect on neuronal excitability and synaptic transmission in hippocampal slices while effectively inhibiting glial cell function (Martin et al., 2007; Nakanishi et al., 1996; Schurr et al., 1997).

The basal frequency of sIPSCs in laminae III-IV was not significantly affected by incubation with FC (Control: 3.1 ± 0.6 Hz, n=26; FC: 2.7 ± 0.8 Hz, n=23; Wilcoxon-Mann-Whitney test, p=0.18). However, in the presence of FC (100 μ M, Fig. 5), the proportion of neurons in which Phe (20 μ M) or Clo (10 μ M) increased the frequency of sIPSCs were significantly reduced (Phe: 32%, 8/25; Fisher's exact test, p=0.001; Clo: 0%, 0/22; Fisher's exact test, p=0.002). In contrast, the proportion of neurons responding to Iso was similar to that in control conditions (10%, 2/20; Fisher's exact test, p=0.287). The reduction in the proportion of cells responding to Phe and Clo was not due to a decrease in the capacity of transmitter release from inhibitory neurons because in all cases in which it was tested (100%, 13/13), application of a high K^+ solution induced a robust increase in sIPSC frequency in the recorded neurons.

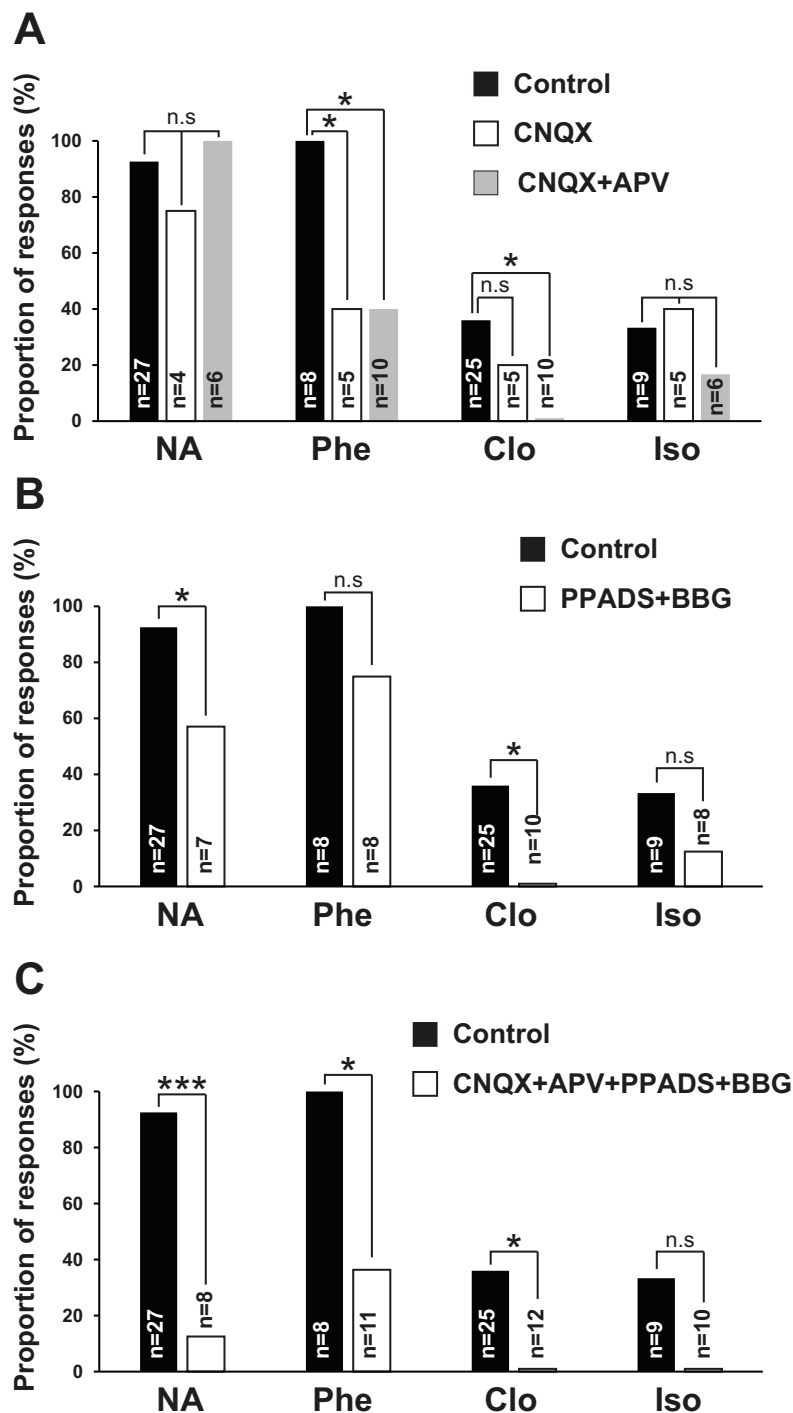


FIGURE 6: Effect of inotropic glutamate and ATP (P2X) receptor antagonists on the NA- and AR agonists-induced increase in sIPSC frequency in laminae III-IV neurons. (A) Histogram showing the proportion of neurons recorded in laminae III-IV responding to NA or AR agonists by an increase in sIPSC frequency under control conditions (black bars) or in the steady state presence of the AMPA receptor antagonist CNQX (10 μ M, white bars) or of both AMPA receptor- and NMDA receptor- antagonists (CNQX 10 μ M + APV 50 μ M, gray bars) in the extracellular solution. (B) Histogram of the proportion of neurons responding to NA or AR agonists in control conditions (black bars) or in the presence of ionotropic ATP receptor (P2X receptor) antagonists (PPADS 10 μ M + brilliant blue G (BBG) 1 μ M, white bars). (C) Proportion on neurons responding to NA or AR agonists in control conditions (black bars) or after combined blockade of ionotropic glutamate and P2X receptors (CNQX + APV + PPADS + BBG, white bars). (Fisher's exact test, *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$, n.s. not significant).

Implication of the gliotransmitters glutamate and ATP in the effects of NA

Effects of AMPA/KA and NMDA receptor antagonists.

In the first part of the results section we have shown that NA did not affect excitatory glutamatergic transmission in our preparation. However, glutamate might be released from glial cells (Volterra and Meldolesi 2005) and glial cells are known to express ARs (Hertz et al. 2015; Hosli et al. 1982; Salm and McCarthy 1992). We therefore tested the impact of blocking ionotropic glutamate receptors on the effects of AR agonists. In the presence of CNQX (10 μ M) which blocks ionotropic AMPA and Kainate (KA) glutamate receptors, we observed a significant reduction in the proportion of neurons in which Phe (20 μ M) increased the frequency of sIPSCs (40%, 2/5; Fisher's exact test, $p=0.004$). CNQX did not affect the proportion of neurons displaying a response to Clo (10 μ M) (20%, 1/5; Fisher's exact test, $p=0.64$), to Iso (20 μ M) (40%, 2/5; Fisher's exact test, $p=1$) or to NA (20 μ M) (75%, 3/4; Fisher's exact test, $p=0.34$) (Fig. 6A).

Interestingly, in the presence of both CNQX (10 μ M) and APV (50 μ M), an antagonist of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, we still observed the aforementioned reduction in the proportion of responses to Phe (20 μ M) (40%, 4/10; Fisher's exact test, $p=0.012$) but responses to Clo (10 μ M) were no longer detected (0%; 0/10; Fisher's exact test, $p=0.03$). In contrast, there was no significant effect on the proportion of responses to Iso (20 μ M) (17%, 1/6; Fisher's exact test, $p=0.6$) or to NA (20 μ M) (100%, 6/6; Fisher's exact test, $p=1$) (Fig. 6A).

Effects of P2X receptor antagonists.

In the presence of PPADS (10 μ M), an antagonist of most P2X receptors occurring in the CNS (North and Surprenant 2000), and of BBG (1 μ M) an antagonist of P2X7 receptors (Jiang et al., 2000; North and Surprenant 2000), there was no significant change in the proportion of neurons responding to Phe (20 μ M) (75%, 6/8; Fisher's exact test, $p=0.47$) or to Iso (20 μ M) (13%, 1/8; Fisher's exact test, $p=0.57$) (Fig. 6B). However, there was a significant decrease in the proportion of neurons responding to Clo (10 μ M) (0%, 0/10; Fisher's exact test, $p=0.036$) or to NA (20 μ M) (57%, 4/7; Fisher's exact test, $p=0.047$) (Fig. 6B).

Consequences of blocking both ionotropic glutamate and ATP receptors

We next tested the effect of AR agonists during combined blockade of ionotropic glutamate and ATP receptors using a cocktail of the antagonists mentioned above, i.e. CNQX (10 μ M), APV (50 μ M), PPADS (10 μ M) and BBG (1 μ M) (Fig. 6C). In the steady state presence of these antagonists, the basal frequency of sIPSCs in laminae III-IV was not significantly affected (Control: 3.1 ± 0.6 Hz, $n=26$; Cocktail of blockers: 5.5 ± 1.6 Hz, $n=12$; Wilcoxon-Mann-Whitney test, $p = 0.25$). However, we observed a reduction in the proportion of neurons responding to Phe (20 μ M) (36%, 4/11; Fisher's exact test, $p=0.012$) and to Clo (10 μ M) (0%, 0/12; Fisher's exact test, $p=0.018$). Although we failed to record a single response to Iso in the 9 cells tested (0%, 0/9), there was no statistically significant difference compared to control (0%, 0/9; Fisher's exact test, $p=0.205$). We noticed however a dramatic reduction in the proportion of neurons in which NA (20 μ M) induced an increase in sIPSC frequency (12.5%, 1/8; Fisher's exact test, $p=4 \cdot 10^{-5}$) (Fig 6c). This

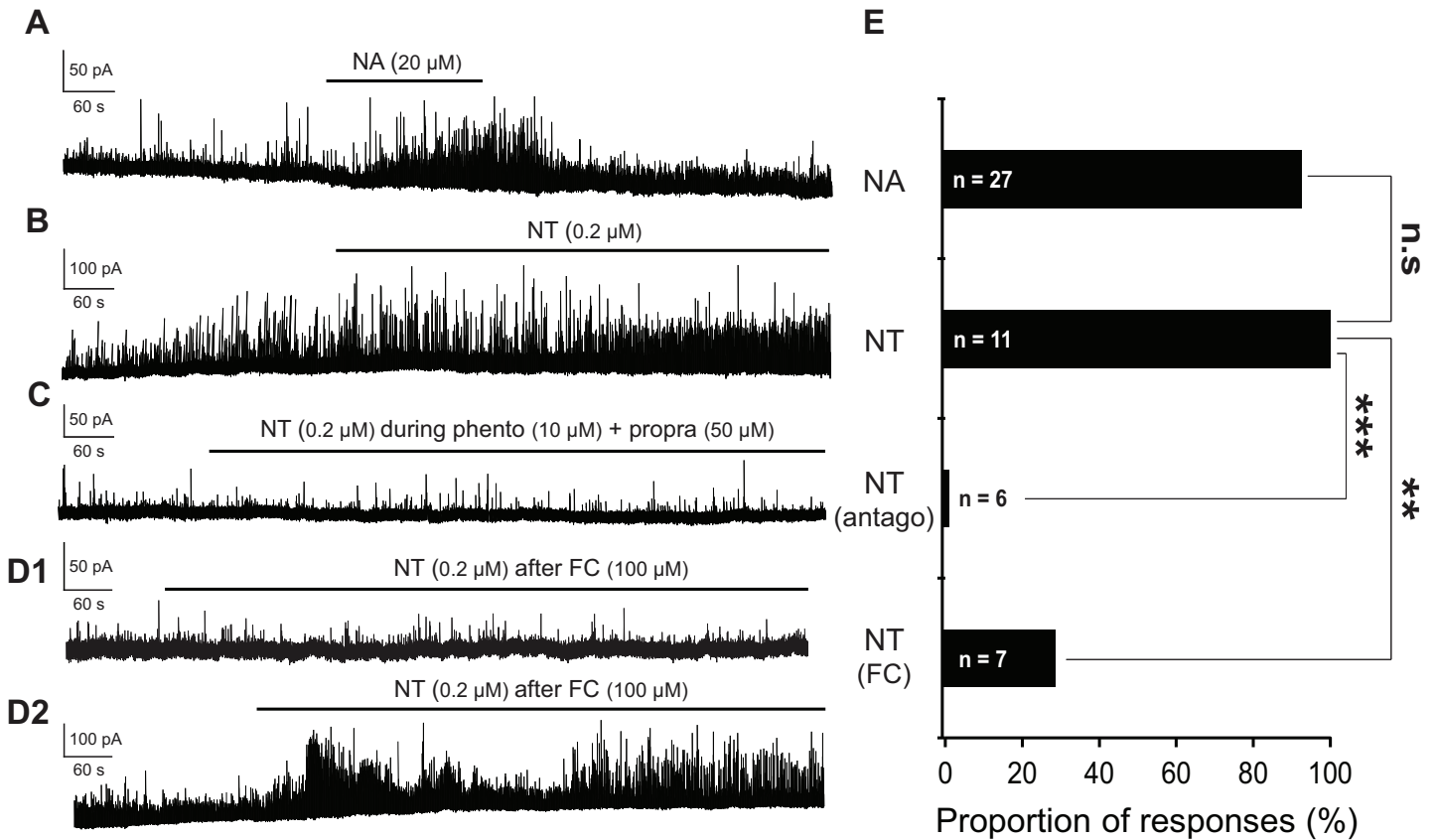


FIGURE 7: Endogenously released NA increased the frequency of sIPSCs in laminae III-IV neurons by acting on glial cells. (A) Typical increase induced by exogenous NA (20 μM) application in a laminae III-IV neuron. (B) Superfusion of the spinal cord slices with the NA transporter inhibitor nortriptyline (NT, 0.2 μM) increased the frequency of sIPSCs. (C) The effect of NT was not detected when α- and β-ARs were blocked with phentolamine (phento, 10 μM) and propranolol (propra, 50 μM). (D1, D2) Example of a neuron in which NT (0.2 μM) failed to increase (D1) or induced an increase (D2) in sIPSC frequency in slices pretreated with the glial inhibitor fluorocitrate (FC, 100 μM) for 1 h. (E) Summary of the effects of NA and NT under the different conditions illustrated in panels A to D2. NT (antago) refers to NT tested in the steady state presence of the antagonists phentolamine (10 μM) and propranolol (50 μM). (Fisher's exact test, *** p<0.001, ** p<0.01, n.s. not significant)

situation was strikingly different from those in which either the glutamate antagonists or ATP antagonists were tested separately. The decrease in proportion of neurons responding to Phe, Clo or NA was not due, to an impairment of inhibitory synaptic transmission because in all cells tested (100%, 9/9), application of a high K⁺ solution elicited a large increase in sIPSC frequency.

Effect of endogenously released NA

In order to address the possible effect of endogenously released NA, we applied nortriptyline (NT, 200 nM) a blocker of the noradrenaline transporter (Giros et al., 1994) that should allow the extracellular accumulation of spontaneously released NA.

Application of NT (200 nM) mimicked the effect of NA (Fig. 7A, B) and increased the frequency of sIPSCs in all cells tested (100%, 11/11) (Fig 7E). In the presence of phentolamine (10 μM) and propranolol (50 μM), NT had no effect of the frequency of sIPSCs in any of the neurons tested (0%, 0/6) (Fig. 7C, E). When the slices were preincubated with FC (100 μM, 1h), the fraction of neurons displaying an increase in sIPSC frequency during application of NT (200 nM) was significantly reduced with respect to control (FC: 29%, 2/7; Fisher's exact test p=0.002) (Fig. 7D1, D2, E). The effect of NT remaining in FC probably reflected the activation of α₁- and/or β-ARs present on inhibitory interneurons by endogenously released NA.

Discussion

Our study shows that NA facilitated GABAergic and glycinergic inhibitory synaptic transmission but not excitatory glutamatergic transmission in the DH of the spinal cord. This effect implicated glia to neuron interactions and interlaminar communications.

NA increased the frequency of inhibitory GABAergic and glycinergic sIPSCs in virtually all laminae III-IV neurons tested. In addition, we noticed that NA also increased the amplitude of glycinergic mIPSCs in about 33% of the cells while having no effect on the amplitude of GABAergic mIPSCs recorded in the presence of TTX. This postsynaptic action of NA was not further investigated but is consistent with a reported α_2 -AR-mediated potentiation of glycine-induced membrane currents in DH neurons (Lang et al., 2003).

The increase in sIPSC frequency was reproduced by the α_1 -AR agonist Phe and, in about one third of neurons, by the α_2 -AR agonist Clo or the β -AR agonist Iso and involved the activation of adrenoceptors, because the effects were blocked by the classical α - and β -AR antagonists phentolamine and propranolol. The observed increase in sIPSC frequency induced by NA and the AR agonists indicated an action on inhibitory neurons that were presynaptic to (i.e. project to) the recorded neuron. However, in the presence of TTX, NA or AR agonists never increased the frequency of mIPSCs indicating that the presynaptic ARs involved in the modulatory effect of NA were not located close to the synaptic terminals of inhibitory interneurons. The fact that NA and Phe still increased the frequency of sIPSCs in the absence of TTX but in the presence of CNQX and APV, a situation that allows the generation of action potentials but blocks polysynaptic glutamatergic excitation, suggested that some inhibitory interneurons possess functional

“excitatory”/depolarizing α_1 -ARs on their soma and/or dendrites rather than on their terminals. The activation of these receptors will trigger a depolarization and subsequently the generation of action potentials that will propagate to the synaptic terminals where they evoke the synaptic release of GABA or glycine. A depolarization of lamina II inhibitory interneurons by a α_1 -AR-mediated mechanism has been documented in lamina II (Gassner et al. 2009) but was not observed in lamina III (Gassner et al. 2009) and has not been investigated in laminae IV or V. In fact, the large majority of lamina II neurons are hyperpolarized by NA via the activation of α_2 -ARs both *in vitro* (Gassner et al. 2009; North and Yoshimura 1984) and *in vivo* (Funai et al., 2014; Sonohata et al., 2004). This seems also to be the case for lamina III neurons (Gassner et al. 2009). In this context, an increase in sIPSC frequency could be due to a mechanism of disinhibition triggered by the activation of inhibitory/hyperpolarizing α_2 -ARs. However, such a mechanism implies to find some neurons in which the α_2 -AR agonist would induce a decrease in sIPSC frequency, a phenomenon that could in turn disinhibit an inhibitory target neuron. A decrease in sIPSC frequency was never observed in laminae III-IV with Clo, but was present in 33% of lamina V neurons, whereas in another 33% of lamina V neurons Clo induced an increase in sIPSC frequency. One could therefore speculate that at least part of the increase in sIPSC frequency observed in laminae III-IV might be due a synaptic disinhibition mechanism taking place in lamina V and engaging interlaminar connections between deep and more superficial laminae of the DH (Petitjean et al. 2012). This hypothesis will however need further work to be clarified.

The results from experiments using a physical transection between laminae IV and V indicated that the totality of α_2 -AR-mediated effects and a significant proportion (>70%)

of α_1 -AR-mediated effects were entirely dependent on inputs from lamina V or deeper laminae to laminae III-IV. In contrast, the effect β -AR agonist Iso was independent of deep laminae.

Interestingly, a quantitatively similar situation was found in intact (non-transected) slices in which glial metabolism was inhibited with FC, indicating that this interaction between deep and superficial laminae also required an intact glial cell network. The α_1 -AR-mediated effects (~20%) remaining after transection or FC treatment were most probably due to α_1 -ARs present on laminae III-IV inhibitory interneurons. Activation of β -AR has no effect on inhibitory synaptic transmission in lamina II (Baba et al., 2000) or in lamina V (our results). Thus, the effects of Iso on the frequency of sIPSCs that persisted after transection or FC treatment indicate that the β -AR involved are most likely present on III-IV neurons. The implication of glial cells in the effects of NA or AR agonists was assessed by testing the effects of FC. This requires that FC specifically inhibits glial cell metabolism without affecting neuronal function. Under our experimental conditions, we used incubations of FC at a concentration of 100 μ M for 1 h. At this concentration and with this time of incubation, it has been shown by others that FC inhibits glial metabolism without having significant effects on neuronal excitability or synaptic transmission in brain slices (Martin et al. 2007; Nakanishi et al. 1996; Schurr et al. 1997). Moreover, our results showing that the basal frequencies of sIPSCs were not affected after 1h of FC incubation or that application of a high K^+ solution can still induce robust and sustained increases in sIPSC frequency are in line with the studies cited above and suggest that FC selectively affected glial metabolism in our experimental conditions without impairing synaptic transmission.

The results discussed in the preceding sections were obtained after exogenous application of NA or AR agonists. It was therefore important to determine whether endogenously synthesized and released NA would have similar effects. When nortriptyline (NT), a relatively selective inhibitor of the neuronal NA transporter (Giros et al. 1994; Vaishnavi et al., 2004), was applied to the spinal cord slices, we observed an increase in the frequency of sIPSCs in all neurons tested. This effect of NT was totally blocked by a cocktail of α - and β -AR antagonists. These observations also suggested that a spontaneous release of NA occurred within our spinal cord slices and that blocking uptake of NA allowed to reach within the slice a concentration of NA that was sufficient to induce an increase in inhibitory transmission in laminae III-IV. Interestingly the proportion of neurons in which NT increased the frequency of sIPSCs was significantly reduced when glial metabolism was inhibited with FC. These results suggested that, similar to what we observed following exogenous application of NA or AR agonists, endogenously released NA modulated inhibitory transmission by a mechanism involving a glial element. This is also consistent with morphological studies reporting numerous contacts of noradrenergic fibers with glial cells in the DH of the spinal cord (Ridet et al. 1993).

Our study identifies a novel action of NA in deep laminae (III-V) of the DH that had not been described previously. The involvement of glial cells in the effects of NA are of particular interest. Astrocytes, including spinal cord astrocytes, are known to express functional α_1 -, α_2 - and β -AR (Hertz et al. 2015; Hosli et al. 1982; Salm and McCarthy 1992) and to release various gliotransmitters such as glutamate or ATP that can act on nearby astrocytes or neurons (Newman 2003). In the hippocampus, glial release of glutamate or

ATP can modulate both excitatory and inhibitory synaptic transmission by acting at presynaptic receptors (Newman 2003). NA does neither affect the frequency of sEPSC in lamina II (Baba et al. 2000; Kawasaki et al. 2003) nor in laminae III-V (our study) indicating that NA does not modulate neuronal release of glutamate under our experimental conditions. However, the increase in frequency of sIPSCs induced by NA and AR agonists were reduced in a quantitatively similar manner by FC or pharmacological blockade of ionotropic glutamate and ATP receptors. This could indicate that the glial cells involved in the effects of NA might release ATP and/or glutamate that in turn act to modulate inhibitory synaptic transmission. Moreover, α_1 -AR-mediated effects depended mainly on the activation of AMPA/KA receptors (blocked by CNQX), whereas those mediated by α_2 -ARs involved both NMDA and P2X receptors indicating a possible convergent action of glutamate and ATP. Indeed, the fraction of neurons in which the natural AR ligand NA increased the frequency of sIPSCs was not significantly affected after selective blockade of ionotropic glutamate receptors and only slightly affected by P2X receptors blockade. However, the combined blockade of both receptor categories led to a dramatic reduction in the proportion of responsive neurons, thereby indicating a synergistic action of glutamate and ATP on the control of inhibitory synaptic transmission.

In conclusion, our study provides novel insights in the mechanisms of action of NA in the DH of the spinal cord. We show that modulation of inhibitory transmission in laminae III-V of the DH involves not only α_1 -AR as reported in lamina II, but also β -AR and, most importantly, α_2 -AR that are known to be predominantly implicated in the analgesic effects of NA and clonidine in the spinal cord (Budai et al. 1998; Fairbanks et al., 2009; Reddy et

al. 1980). Our results clearly indicate that glial cells play a fundamental role in the effects of exogenously-applied as well as in endogenously-released NA. This is in line with the suggested prominent role of glial networks in the modulation and the integration of electrical activity in neuronal networks (Bekar et al. 2008; Ding et al., 2013; Kang et al., 1998; Paukert et al., 2014). In the DH of the spinal cord, these glial cell-mediated effects might represent novel and promising therapeutic targets for analgesic strategies and, in a more general context, the mechanisms described here might also operate in other regions of the CNS in which NA has a modulatory action.

Acknowledgements

We thank Iris Umlauff and Isabel Bravo-Ferrer for help with some of the experiments and Sylvain Hugel and Jean-Luc Rodeau for discussion. We are also grateful to Catherine Moreau and Chantal Fitterer for excellent technical assistance. This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), University of Strasbourg and the French Ministry for Education and Research.

References

- Baba H, Shimoji K, Yoshimura M. 2000. Norepinephrine facilitates inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord (part 1): effects on axon terminals of GABAergic and glycinergic neurons. *Anesthesiology* 92:473-84.
- Bekar LK, He W, Nedergaard M. 2008. Locus coeruleus alpha-adrenergic-mediated activation of cortical astrocytes in vivo. *Cereb Cortex* 18:2789-95.
- Braz JM, Basbaum AI. 2009. Triggering genetically-expressed transneuronal tracers by peripheral axotomy reveals convergent and segregated sensory neuron-spinal cord connectivity. *Neuroscience* 163:1220-32.
- Brown AG. 1982. The dorsal horn of the spinal cord. *Q J Exp Physiol* 67:193-212.
- Bruinstroop E, Cano G, Vanderhorst VG, Cavalcante JC, Wirth J, Sena-Esteves M, Saper CB. 2012. Spinal projections of the A5, A6 (locus coeruleus), and A7 noradrenergic cell groups in rats. *J Comp Neurol* 520:1985-2001.
- Budai D, Harasawa I, Fields HL. 1998. Midbrain periaqueductal gray (PAG) inhibits nociceptive inputs to sacral dorsal horn nociceptive neurons through alpha2-adrenergic receptors. *J Neurophysiol* 80:2244-54.
- Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR, Jr., Trendelenburg U. 1994. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev* 46:121-36.
- Ding F, O'Donnell J, Thrane AS, Zeppenfeld D, Kang H, Xie L, Wang F, Nedergaard M. 2013. alpha-Adrenergic receptors mediate coordinated Ca²⁺ signaling of cortical astrocytes in awake, behaving mice. *Cell Calcium* 54:387-94.
- Fairbanks CA, Stone LS, Wilcox GL. 2009. Pharmacological profiles of alpha 2 adrenergic receptor agonists identified using genetically altered mice and isobolographic analysis. *Pharmacol Ther* 123:224-38.
- Funai Y, Pickering AE, Uta D, Nishikawa K, Mori T, Asada A, Imoto K, Furue H. 2014. Systemic dexmedetomidine augments inhibitory synaptic transmission in the superficial dorsal horn through activation of descending noradrenergic control: an in vivo patch-clamp analysis of analgesic mechanisms. *Pain* 155:617-28.
- Gassner M, Ruscheweyh R, Sandkuhler J. 2009. Direct excitation of spinal GABAergic interneurons by noradrenaline. *Pain* 145:204-10.

- Giros B, Wang YM, Suter S, McLeskey SB, Pifl C, Caron MG. 1994. Delineation of discrete domains for substrate, cocaine, and tricyclic antidepressant interactions using chimeric dopamine-norepinephrine transporters. *J Biol Chem* 269:15985-8.
- Gordon GR, Baimoukhametova DV, Hewitt SA, Rajapaksha WR, Fisher TE, Bains JS. 2005. Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. *Nat Neurosci* 8:1078-86.
- Hassel B, Paulsen RE, Johnsen A, Fonnum F. 1992. Selective inhibition of glial cell metabolism in vivo by fluorocitrate. *Brain Res* 576:120-4.
- Headley PM, Duggan AW, Griersmith BT. 1978. Selective reduction by noradrenaline and 5-hydroxytryptamine of nociceptive responses of cat dorsal horn neurones. *Brain Res* 145:185-9.
- Hertz L, Xu J, Song D, Du T, Li B, Yan E, Peng L. 2015. Astrocytic glycogenolysis: mechanisms and functions. *Metab Brain Dis* 30:317-33.
- Hirase H, Iwai Y, Takata N, Shinohara Y, Mishima T. 2014. Volume transmission signalling via astrocytes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369:20130604.
- Hitoto T, Tsuruoka M, Hiruma Y, Matsui Y. 1998. A delta afferent fiber stimulation activates descending noradrenergic system from the locus coeruleus. *Neurochem Res* 23:1461-5.
- Hosli L, Hosli E, Zehntner C, Lehmann R, Lutz TW. 1982. Evidence for the existence of alpha- and beta-adrenoceptors on cultured glial cells--an electrophysiological study. *Neuroscience* 7:2867-72.
- Inquimbert P, Rodeau JL, Schlichter R. 2007. Differential contribution of GABAergic and glycinergic components to inhibitory synaptic transmission in lamina II and laminae III-IV of the young rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 26:2940-9.
- Jiang LH, Mackenzie AB, North RA, Surprenant A. 2000. Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors. *Mol Pharmacol* 58:82-8.
- Jones SL. 1992. Noradrenergic modulation of noxious heat-evoked fos-like immunoreactivity in the dorsal horn of the rat sacral spinal cord. *J Comp Neurol* 325:435-45.
- Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M. 1998. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* 1:683-92.

- Kawasaki Y, Kumamoto E, Furue H, Yoshimura M. 2003. Alpha 2 adrenoceptor-mediated presynaptic inhibition of primary afferent glutamatergic transmission in rat substantia gelatinosa neurons. *Anesthesiology* 98:682-9.
- Lang B, Li H, Kang JF, Li YQ. 2003. Alpha-2 adrenoceptor mediating the facilitatory effect of norepinephrine on the glycine response in the spinal dorsal horn neuron of the rat. *Life Sci* 73:893-905.
- Lyons WE, Fritschy JM, Grzanna R. 1989. The noradrenergic neurotoxin DSP-4 eliminates the coeruleospinal projection but spares projections of the A5 and A7 groups to the ventral horn of the rat spinal cord. *J Neurosci* 9:1481-9.
- Martin ED, Fernandez M, Perea G, Pascual O, Haydon PG, Araque A, Cena V. 2007. Adenosine released by astrocytes contributes to hypoxia-induced modulation of synaptic transmission. *Glia* 55:36-45.
- Men D, Matsui A, Matsui Y. 1996. Somatosensory afferent inputs release 5-HT and NA from the spinal cord. *Neurochem Res* 21:1515-9.
- Millan MJ. 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57:1-164.
- Nakanishi H, Kawachi A, Okada M, Fujiwara M, Yamamoto K. 1996. Protective effect of MK-801 on the anoxia-aglycemia induced damage in the fluorocitrate-treated hippocampal slice of the rat. *Brain Res* 732:232-6.
- Newman EA. 2003. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci* 26:536-42.
- North RA, Surprenant A. 2000. Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:563-80.
- North RA, Yoshimura M. 1984. The actions of noradrenaline on neurones of the rat substantia gelatinosa in vitro. *J Physiol* 349:43-55.
- O'Donnell J, Zeppenfeld D, McConnell E, Pena S, Nedergaard M. 2012. Norepinephrine: a neuromodulator that boosts the function of multiple cell types to optimize CNS performance. *Neurochem Res* 37:2496-512.
- Paris A, Tonner PH. 2005. Dexmedetomidine in anaesthesia. *Curr Opin Anaesthesiol* 18:412-8.
- Paukert M, Agarwal A, Cha J, Doze VA, Kang JU, Bergles DE. 2014. Norepinephrine controls astroglial responsiveness to local circuit activity. *Neuron* 82:1263-70.

- Paulsen RE, Contestabile A, Villani L, Fonnum F. 1987. An in vivo model for studying function of brain tissue temporarily devoid of glial cell metabolism: the use of fluorocitrate. *J Neurochem* 48:1377-85.
- Pertovaara A. 2006. Noradrenergic pain modulation. *Prog Neurobiol* 80:53-83.
- 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* 40:3189-201.
- 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* 36:3500-8.
- Reddy SV, Maderdrut JL, Yaksh TL. 1980. Spinal cord pharmacology of adrenergic agonist-mediated antinociception. *J Pharmacol Exp Ther* 213:525-33.
- Ridet JL, Rajaofetra N, Teilhac JR, Geffard M, Privat A. 1993. Evidence for nonsynaptic serotonergic and noradrenergic innervation of the rat dorsal horn and possible involvement of neuron-glia interactions. *Neuroscience* 52:143-57.
- Saitoh T, Ishida M, Maruyama M, Shinozaki H. 1994. A novel antagonist, phenylbenzene omega-phosphono-alpha-amino acid, for strychnine-sensitive glycine receptors in the rat spinal cord. *Br J Pharmacol* 113:165-70.
- Salm AK, McCarthy KD. 1992. The evidence for astrocytes as a target for central noradrenergic activity: expression of adrenergic receptors. *Brain Res Bull* 29:265-75.
- Sandkuhler J. 2009. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev* 89:707-58.
- Satoh K, Kashiba A, Kimura H, Maeda T. 1982. Noradrenergic axon terminals in the substantia gelatinosa of the rat spinal cord: an electron-microscopic study using glyoxylic acid-potassium permanganate fixation. *Cell Tissue Res* 222:359-78.
- Schurr A, Payne RS, Miller JJ, Rigor BM. 1997. Glia are the main source of lactate utilized by neurons for recovery of function posthypoxia. *Brain Res* 774:221-4.
- Smith HS, Deer TR, Staats PS, Singh V, Sehgal N, Corder H. 2008. Intrathecal drug delivery. *Pain Physician* 11:S89-S104.

- Sonohata M, Furue H, Katafuchi T, Yasaka T, Doi A, Kumamoto E, Yoshimura M. 2004. Actions of noradrenaline on substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord revealed by in vivo patch recording. *J Physiol* 555:515-26.
- Szabadi E. 2013. Functional neuroanatomy of the central noradrenergic system. *J Psychopharmacol* 27:659-93.
- Vaishnavi SN, Nemeroff CB, Plott SJ, Rao SG, Kranzler J, Owens MJ. 2004. Milnacipran: a comparative analysis of human monoamine uptake and transporter binding affinity. *Biol Psychiatry* 55:320-2.
- Volterra A, Meldolesi J. 2005. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6:626-40.
- Yaksh TL. 1985. Pharmacology of spinal adrenergic systems which modulate spinal nociceptive processing. *Pharmacol Biochem Behav* 22:845-58.
- Yaksh TL, Pogrel JW, Lee YW, Chaplan SR. 1995. Reversal of nerve ligation-induced allodynia by spinal alpha-2 adrenoceptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 272:207-14.

II. Effet de la NA sur la transmission synaptique dans la lamina II de la CDME

En parallèle avec l'étude des effets de la NA sur les laminae profondes de la CDME, nous avons caractérisé ses effets dans la lamina II, et ceci avec un double objectif :

- 1) comparer les résultats obtenus dans nos conditions expérimentales avec ceux de la littérature, puisque les effets de la NA aux niveaux cellulaires et de la transmission synaptique ont été principalement étudiés dans la lamina II.
- 2) permettre une comparaison optimale entre les effets de la NA dans les couches superficielles et profondes dans la CDME et ceci dans les mêmes conditions expérimentales afin de mieux cerner la localisation des adrénoccepteurs et la façon dont ces récepteurs modulent les réseaux de neurones et les réseaux de cellules gliales dans la CDME.

Les enregistrements ont été effectués dans les mêmes conditions que dans les couches profondes (voir partie Matériels et Méthodes) sur des tranches de moelle épinière épaisses (600 μm) afin de bien préserver les réseaux neuronaux et gliaux locaux.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 14 et le tableau 2.

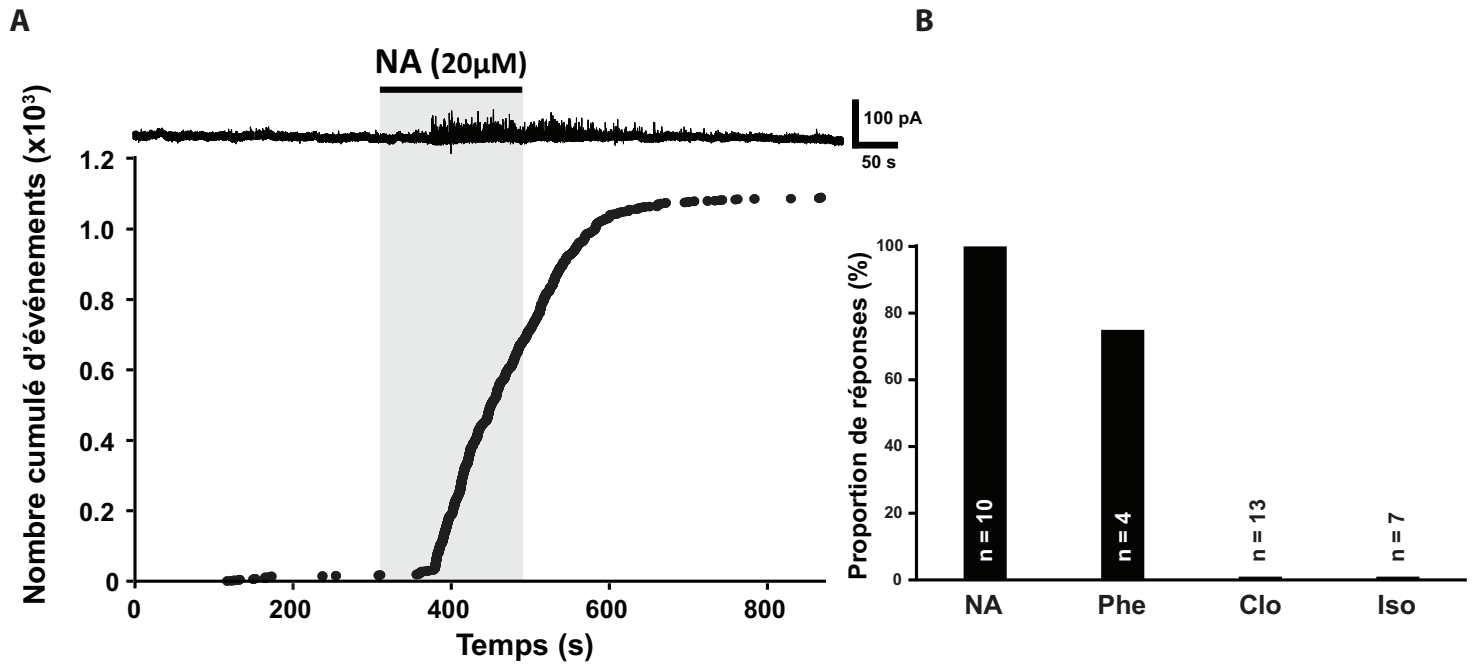


Figure 14. La NA facilite la transmission synaptique inhibitrice dans la lamina II

A. L'application de NA (20 μ M, 3 min) augmente la fréquence des CPSIs de manière réversible. Le graphique représente les événements cumulés en fonction du temps. La pente de la courbe reflète la fréquence des CPSIs. La durée d'application de la NA est représentée par la barre horizontale noire.

B. Histogramme des proportions de réponse à la NA et à ses agonistes dans les neurones enregistrés dans la lamina II.

Tableau 2. Résumé des effets de la NA sur les CPSIs enregistrés dans la lamina II de la CDME

Une réponse représente une cellule qui a répondu par une augmentation de fréquence des événements synaptiques.

	Substance	Proportion de Réponses	Fréquence de base (Hz)	Délai de réponse (s)	Changement de fréquence (%)	Durée de la réponse (s)	n
CPSIs	Noradrénaline (20 μ M)	10/10	0,28 \pm 0,17	65,30 \pm 8,06	1203,39 \pm 528,28	296,91 \pm 30,75	5
	Phényléphrine (20 μ M)	3/4	0,75 \pm 0,57	102,09 \pm 19,06	830,48 \pm 255,79	316,46 \pm 116,46	4
	Clonidine (10 μ M)	0/14					
	Isoprotérénol (20 μ M)	0/9					
CPSIm	Noradrénaline (20 μ M)	3/8					
CPSEs	Noradrénaline (20 μ M)	0/9					

Effets de la NA et des agonistes noradrénergiques sur la transmission synaptique inhibitrice dans la lamina II

L'application de NA par perfusion générale (20 μ M, 3 min) augmente la fréquence des CPSIs enregistrés dans la lamina II de $1203,39 \pm 528,28$ % dans 100 % (10/10) des neurones enregistrés (Figure 14 et tableau 2).

Effets des agonistes des adrénoccepteurs

La phényléphrine (agoniste des récepteurs α_1) a facilité la fréquence des CPSIs de $830,48 \pm 255,79$ % dans 75 % (3/4) des neurones enregistrés (Figure 14.B et tableau 2)

Ni la clonidine (agoniste des récepteurs α_2 , 10 μ M, 3 min), ni l'isoprotérénol (agoniste des récepteurs β , 20 μ M, 3 min,) ont eu un effet sur la fréquence des CPSIs enregistrés dans la lamina II. Les proportions de réponses observées étaient de 0/13 pour la clonidine et de 0/7 pour l'isoprotérénol.

III. Comparaison des effets de la dopamine et de la noradrénaline sur la transmission synaptique inhibitrice dans les couches III-IV de la CDME

La dopamine (DA) contrôle un grand nombre de fonctions physiologiques dans le système nerveux central. En effet, le système dopaminergique est impliqué dans la cognition, le renforcement positif, les émotions, la prise alimentaire, l'activité locomotrice et la modulation des informations somatosensorielles nociceptives (Missale et al., 1998). Dans l'encéphale, la DA a fait l'objet de nombreuses études en relation avec son implication dans les pathologies neurologiques et psychiatriques majeures. Comparativement, peu de recherches ont été consacrées aux fonctions de la DA dans la moelle épinière. Les effets de la DA passent par cinq récepteurs métabotropiques subdivisés en deux groupes : les récepteurs D1-like (D1 et D5) et les récepteurs D2-like (D2, D3 et D4). Les récepteurs D1-like sont couplés positivement à l'adénylate cyclase ($G_{\alpha s}$), alors que les récepteurs D2-like y sont couplés négativement ($G_{\alpha i}$) (Missale et al., 1998).

La CDME est un site important d'intégration et de modulation des informations nociceptives. Des projections dopaminergiques de la région dorsale-postérieure de l'hypothalamus (All) projettent principalement dans les laminae I et III-IV de la corne dorsale et libèrent de la DA dans ces régions (Mouchet et al., 1992; Ridet et al., 1992). Les récepteurs dopaminergiques D1-like et D2-like sont exprimés dans la corne dorsale de la moelle épinière (Dubois et al., 1986; Yokoyama et al., 1994; van Dijken et al., 1996; Levant et McCarron, 2001). Des études comportementales montrent que des injections intrathécales de DA produisent des effets antinociceptifs via l'activation des récepteurs D2-like (Jensen et Yaksh, 1984; Barasi et Duggal, 1985; Tamae et al., 2005). Dans les couches superficielles de la corne dorsale, l'activation des récepteurs D2 inhibe (hyperpolarise) les neurones de la lamina II par un mécanisme dépendant des canaux du potassium (Tamae et al., 2005). La DA inhibe également l'émission de potentiels d'action dans des neurones de la lamina II suite à la stimulation électrique des fibres afférentes primaires (Tamae et al., 2005; García-Ramírez et al., 2014). L'activation des récepteurs D1 augmente l'amplitude

des courants AMPA induits par application locale de glutamate dans les motoneurons de souris (Han et Whelan, 2009) et inhibe l'amplitude du potentiel de racine ventrale chez le rat (Kawamoto et al., 2012).

Les fibres dopaminergiques supraspinales projettent en partie dans les mêmes régions de la moelle épinière que les fibres noradrénergiques du LC (notamment les laminae III-IV) (Fritschy et al., 1987; Mouchet et al., 1992; Bruinstroop et al., 2012). Les transporteurs de la dopamine ne sont apparemment pas exprimés dans la moelle épinière y compris sur les fibres dopaminergiques s'y projetant (Barraud et al., 2010). De plus la DA est un précurseur de la NA (voir Figure 11) et il est donc possible que ces deux catécholamines soient colibérées au niveau spinal.

Par conséquent, étant donné la superposition partielle des innervations dopaminergique et noradrénergique dans la CDME et la similarité d'action de la DA et de la NA sur les neurones de la lamina II de la moelle épinière décrite dans la littérature, nous avons voulu déterminer si les effets de la DA et de la NA sur la transmission synaptique inhibitrice dans les laminae III-IV de la CDME étaient également comparables.

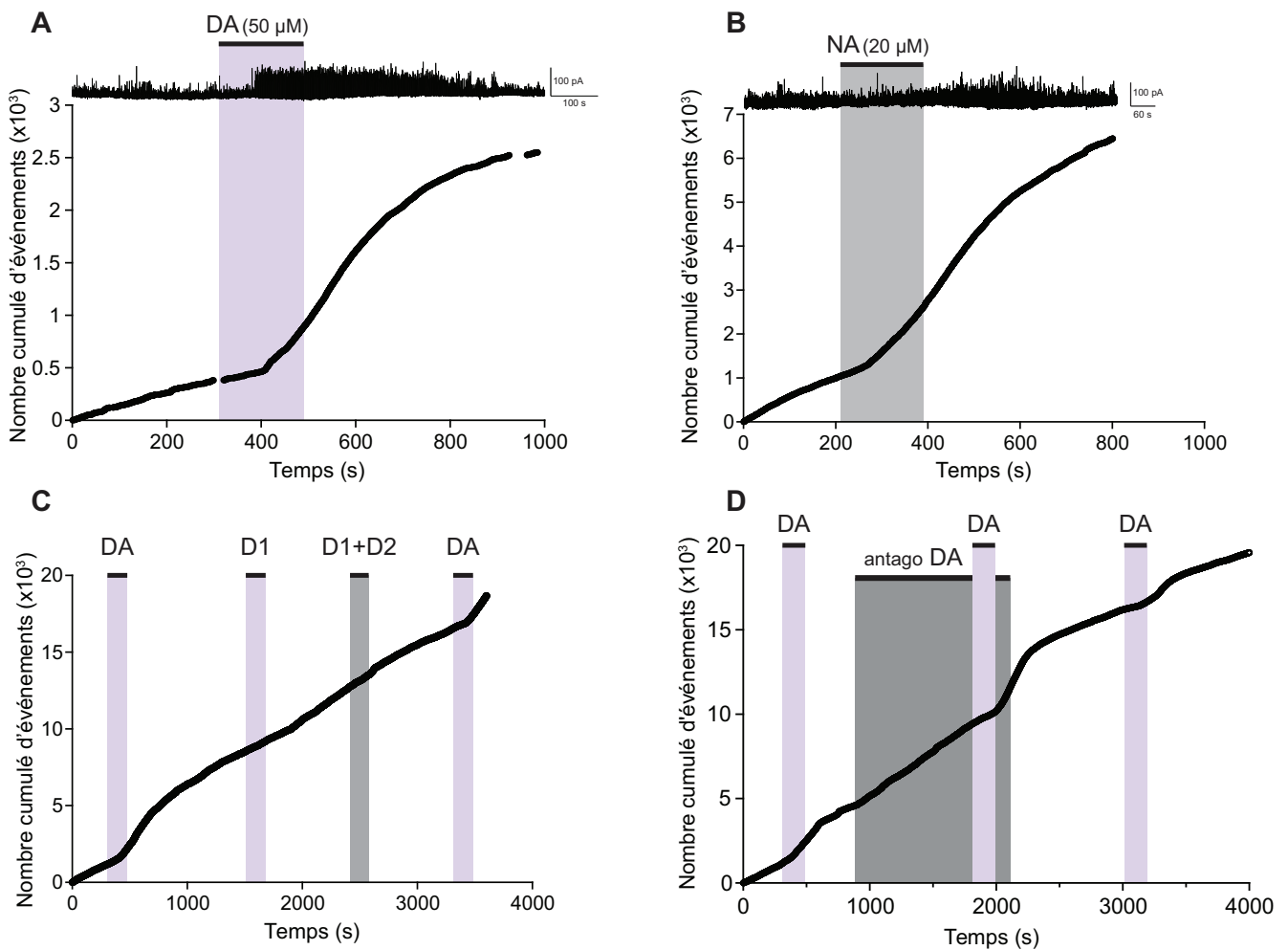


Figure 15. Effets de la DA sur la transmission synaptique inhibitrice dans les laminae III-IV de la CDME

A. Exemple d'un neurone dans les laminae III-IV dans lequel une application de DA (50 μM , 3 min) a facilité la transmission synaptique inhibitrice. En haut : trace de l'enregistrement électrophysiologique des CPSIs. Le graphique du bas représente les événements cumulés en fonctions du temps. La pente de la courbe reflète la fréquence des CPSIs. L'application de la DA est représentée par la barre horizontale noire. **B.** Illustration de l'effet de la NA sur la transmission synaptique inhibitrice dans un neurone des laminae III-IV. La représentation est la même qu'en A. **C.** Application de DA (50 μM , 3 min) et d'agonistes des récepteurs D1 (SKF 38393 10 μM , 3 min) et D2 (quinpirole 1 μM , 3 min) de la DA sur un neurone des laminae III-IV. La DA augmente la fréquence de CPSIs (augmentation de la pente de la relation) avant et après l'application des agonistes dopaminergiques qui n'ont pas eu d'effet sur la fréquence des CPSIs. **D.** La DA augmente la fréquence des CPSIs avant, après et pendant la perfusion d'antagoniste des récepteurs de la dopamine (SCH 23390 1 μM , sulpiride 2 μM , 15 min).

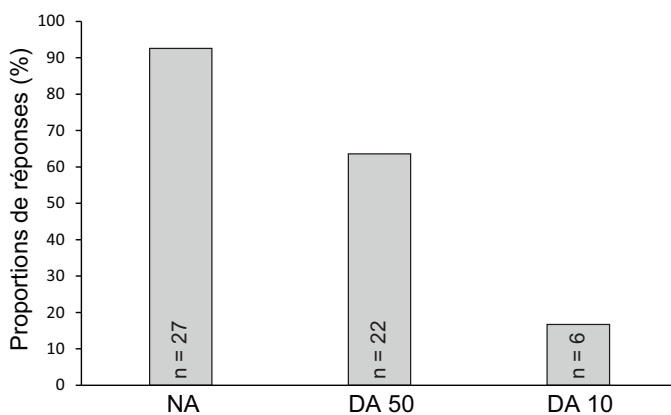


Figure 16. Pourcentage de neurones enregistrés dans les laminae III-IV présentant une réponse à la NA ou à la DA

La réponse évaluée est une augmentation de fréquence des CPSIs suite à l'application de la NA (20 μM , 3 min), ou la DA (50 ou 10 μM , 3 min).

1) Effet de la dopamine sur la transmission synaptique inhibitrice

La DA (50 μM) appliquée pendant 3 min a augmenté de manière réversible la fréquence des CPSIs de $378,17 \pm 61,26$ % dans 64 % (14/22) des neurones enregistrés dans les laminae III-IV (Figures 15 et 16). À une concentration plus faible de 10 μM la DA a augmenté la fréquence des CPSIs dans seulement 17 % (1/6) des neurones enregistrés dans les laminae III-IV. En présence de TTX (0,5 μM) qui bloque la genèse et la propagation des potentiels d'actions, la DA n'a pas eu d'effet sur les fréquences des CPSIs dans les 4 neurones que nous avons testés. Les caractéristiques des réponses de la DA sur la fréquence des CPSIs sont résumés dans le tableau 3. Ces caractéristiques sont proches de celles que nous avons observées lors des applications de NA dans ces mêmes laminae (III-IV) de la CDME.

Tableau 3. Caractéristiques des effets de la DA et de la NA sur la transmission synaptique inhibitrice dans les laminae III-IV de la CDME.

Agonistes	Cellules présentant une réponse (%)	n	Fréquence de base des CPSIs (Hz)	Délai d'apparition de la réponse (s)	Changement de fréquence des CPSIs (%)
Noradrenaline (20 μM)	92.6	27	$2,42 \pm 0,46$	$83,44 \pm 8,06$	$460,96 \pm 82,49$
Dopamine (50 μM)	63.6	14	$2,18 \pm 0,55$	$155,11 \pm 17$	$378,17 \pm 61,26$

2) Effet des antagonistes des adrénoccepteurs

En présence de phentolamine (10 μM) et de propranolol (50 μM), la DA (50 μM) n'a pas augmenté la fréquence des CPSIs dans 6 cellules testés (0/6) (Figure 15). Ce résultat est statistiquement différent de la condition contrôle ($p = 0,016$) et soulève la possibilité d'un effet de la DA impliquant au moins en partie l'activation des récepteurs à la NA dans les laminae III-IV de la CDME.

3) Effet du fluorocitrate

Nous avons voulu savoir si l'effet de la DA partageait d'autres propriétés de l'effet de la NA. Ainsi, nous avons appliqué de la DA sur des tranches de moelle épinière prétraitées au FC pour déterminer une éventuelle implication des cellules gliales de la moelle épinière dans l'effet facilitateur de la DA sur la transmission synaptique inhibitrice des laminae III-IV.

Lorsque les tranches de moelle épinière ont été incubées avec du FC (100 μM) pendant 1 h, l'application de DA (50 μM) n'a augmenté la fréquence des CPSIs dans aucun des neurones testés (0/5). Ce résultat est statistiquement différent de la condition contrôle ($p = 0,016$) et montre que l'effet de la DA dans les laminae III-IV est également susceptible de dépendre d'une interaction glie-neurone dans la CDME.

A ce stade nous avons réalisé que l'effet de la DA sur la transmission synaptique inhibitrice dans les laminae III-IV de la CDME ressemblait à celui de la NA et dépendait potentiellement de l'activation des récepteurs de la NA. Nous avons néanmoins voulu déterminer si une partie des effets pouvait impliquer des récepteurs de la DA en utilisant une approche pharmacologique. Nous présentons ci-dessous les résultats préliminaires obtenus.

4) Effet des agonistes et antagonistes des récepteurs de la dopamine sur la transmission synaptique inhibitrice (données préliminaires)

Le SKF 38393 (agoniste des récepteurs D1, 1-10 μM) n'a jamais augmenté la fréquence des CPSIs sur les 7 cellules testées. Le quinpirole (agoniste des récepteurs D2) n'a pas eu d'effet sur la fréquence des CPSIs dans 2 cellules testées (0/2). Ne parvenant pas à reproduire les effets de la DA avec ses agonistes, nous avons alors essayé de bloquer les effets de la DA avec les antagonistes des récepteurs D1 et D2.

La DA (50 μM) a augmenté la fréquence des CPSIs en présence de SCH 23390 (1 μM) et de sulpiride (2 μM) (antagonistes des récepteurs D1 et D2, respectivement) dans 33 % (1/3) des neurones testés. Bien que le nombre de cellules enregistrés ne permet pour le moment pas de conclure, nous avons vu que la DA pouvait avoir un effet en présence d'antagonistes de ses récepteurs et que ses effets ne sont pas reproduits par des agonistes.

IV. Contribution des cellules gliales à la modulation des réseaux nerveux contrôlant la sensibilité nociceptive

La caractérisation des effets de la NA dans les laminae profondes de la CDME nous a permis de montrer que les cellules gliales de la moelle épinière jouent un rôle fondamental dans la modulation de la transmission synaptique inhibitrice.

Dans ce contexte, nous avons voulu déterminer si d'une manière plus générale des interactions glie-neurone participaient aux propriétés d'autres réseaux nerveux spinaux. Pour cela nous avons évalué l'impact de l'inhibition du métabolisme glial sur les réseaux de la CDME activés par la capsaïcine en travaillant *in vitro* sur des tranches de moelle épinière et *in vivo* sur des rats dont nous avons quantifié les réponses comportementales à des stimulations nociceptives mécaniques ou thermiques au chaud.

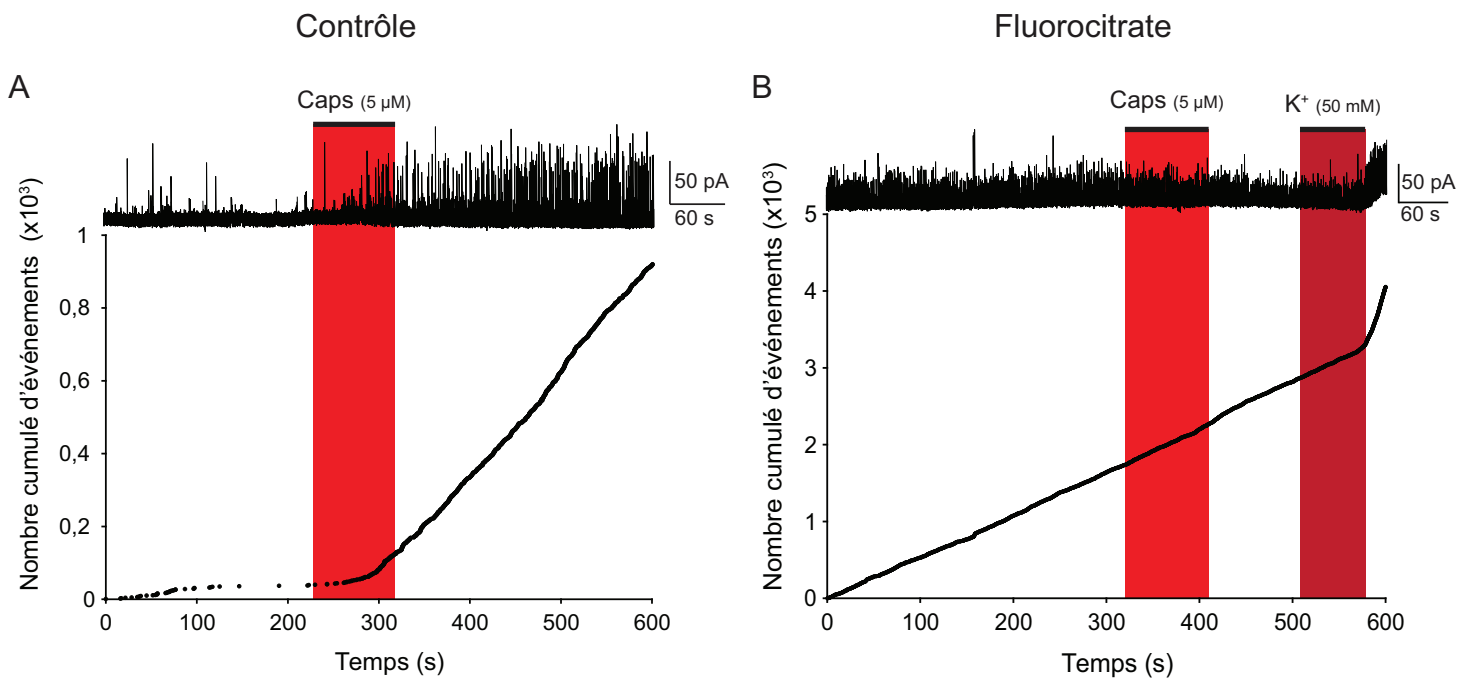


Figure 17. L'effet de la capsaïcine sur la transmission synaptique inhibitrice est bloqué par le FC dans les laminae III-IV

A. Trace de l'enregistrement électrophysiologique des CPSIs dans les laminae III-IV de la CDME avec le graphique de la fréquence cumulée des CPSIs de cette cellule illustrant l'augmentation de fréquence des CPSIs induite par l'application de capsaïcine (5 μ M, 90 s). **B.** Enregistrement des CPSIs dans un neurone des laminae III-IV d'une tranche préalablement traitée au FC (100 μ M, 1 h). La capsaïcine n'a pas d'effet. L'application d'une solution de haut potassium (50 mM dans de l'ACSF, 70 s) augmente la fréquence des CPSIs indiquant qu'une facilitation de la transmission synaptique est possible.

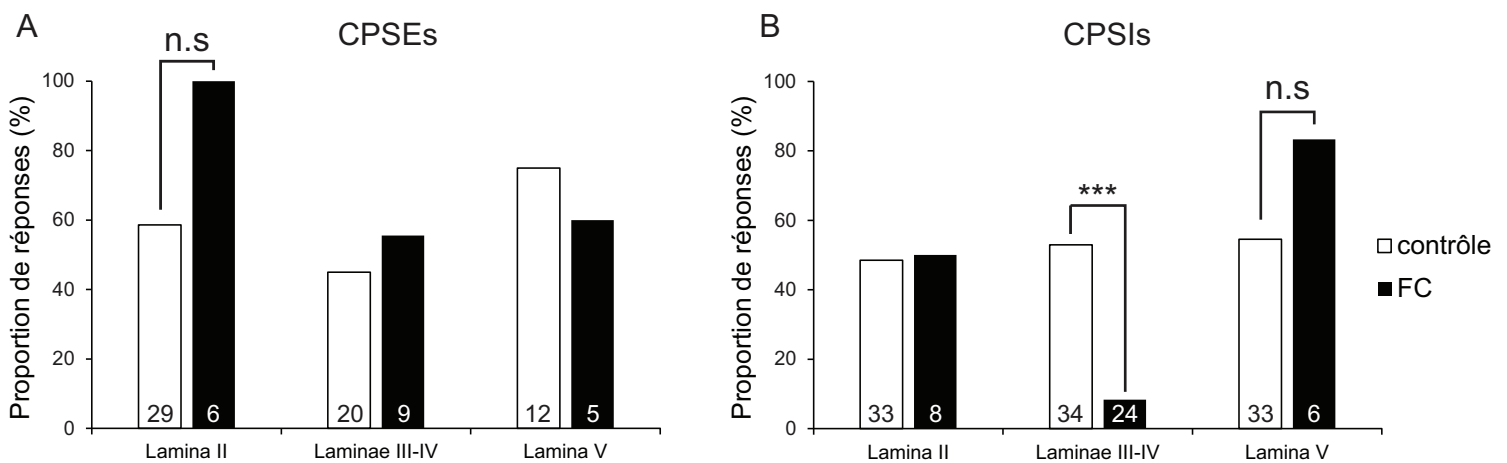


Figure 18. Le FC inhibe sélectivement la réponse à la capsaïcine sur la transmission synaptique inhibitrice dans les laminae III-IV de la CDME

Histogrammes des proportions de neurones montrant une augmentation de fréquence des CPSEs (glutamatergiques) **(A)** ou des CPSIs (GABAergiques et/ou glycinergiques) **(B)** suite à l'application de capsaïcine (5 μ M, 90 s) dans les laminae II, III-IV et V. Noter que seule la proportion de neurones présentant une augmentation de fréquence des CPSIs dans les laminae III-IV est affectée significativement (n.s non significatif, *** $p < 0.001$).

1) Effets du FC sur la facilitation de la transmission synaptique par la capsaïcine dans la CDME

Transmission synaptique excitatrice

Lamina II

La capsaïcine (5 μ M) appliquée pendant 90 s a augmenté la fréquence des CPSEs de manière réversible dans 59 % (17/29) des neurones de la lamina II. Après incubation préalable des tranches de moelle épinière avec du FC (100 μ M) pendant 1 h, la totalité des 6 neurones enregistrés a répondu à la capsaïcine par une augmentation de fréquence des CPSEs (Figure 18). Ces proportions de réponse à la capsaïcine ne sont pas différentes d'une condition à l'autre ($p = 0,074$; test exact de Fisher).

Laminae III-IV

Dans les laminae III-IV la capsaïcine a augmenté la fréquence des CPSEs dans 45 % (9/20) des cellules enregistrées. Après incubation avec le FC, 56 % (5/9) des neurones répondaient encore à la capsaïcine. Ces proportions de réponse ne sont pas différentes ($p = 0,7$; test exact de Fisher).

Lamina V

Dans la lamina V, 75 % (9/12) des neurones ont répondu à l'application de capsaïcine par une augmentation des CPSEs en condition contrôle. Après incubation des tranches avec le FC, 60 % (3/5) répondent à la capsaïcine. Ces proportions de réponse ne sont pas différentes ($p = 0,6$; test exact de Fisher).

Transmission synaptique inhibitrice

Lamina II

Dans la lamina II, l'application de capsaïcine (5 μ M, 90 s) a augmenté la fréquence des CPSIs dans 48 % (16/33) des neurones enregistrés. Après incubation des tranches avec le FC, 50 % (4/8) des neurones répondent encore à la capsaïcine. Ces proportions ne sont pas différentes ($p = 0,43$; test exact de Fisher).

Laminae III-IV

Dans les laminae III-IV, 53 % (18/34) des neurones répondent à la capsaïcine par une augmentation de la fréquence des CPSIs en condition contrôle. Après incubation des

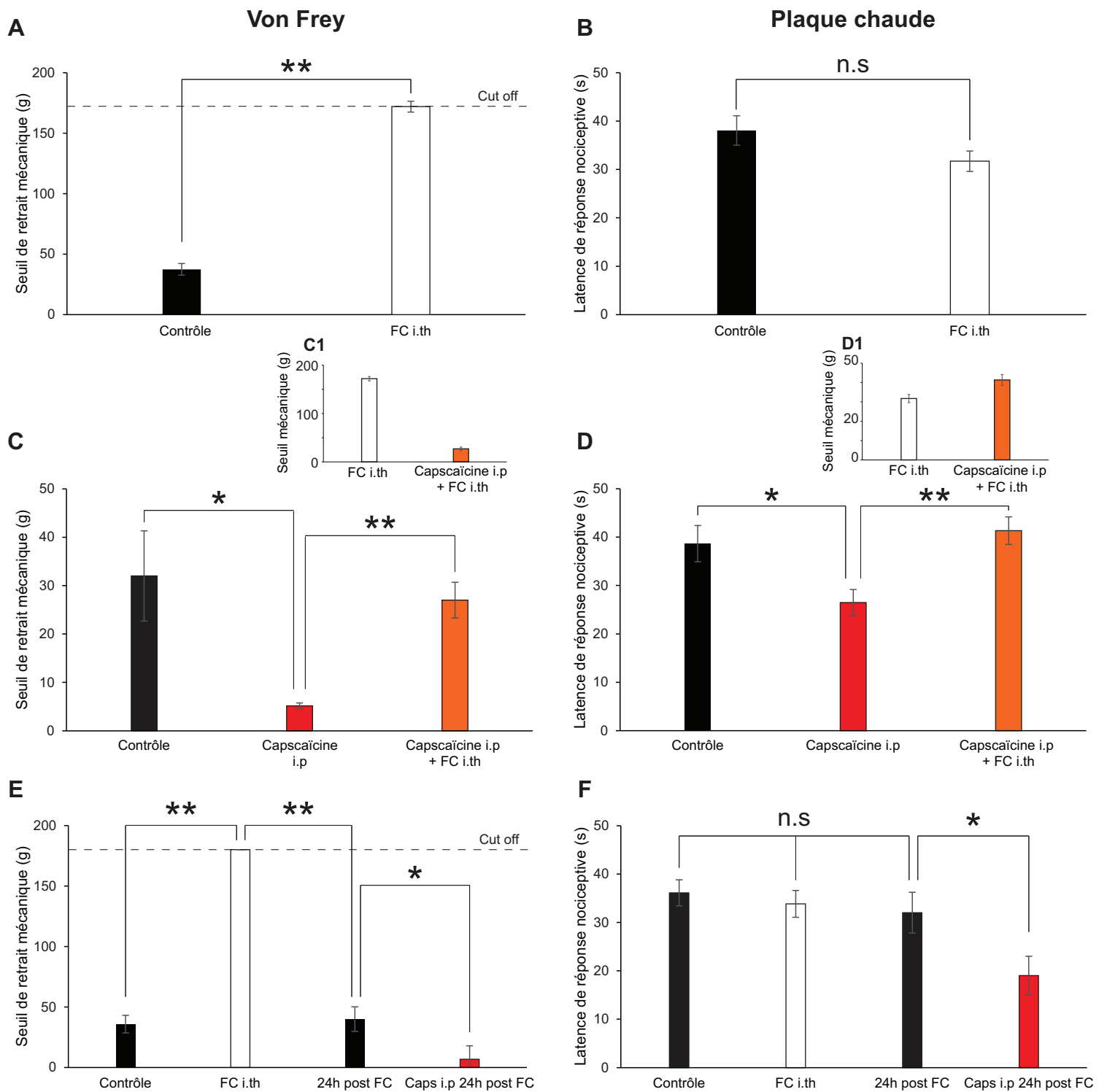


Figure 19. Effets d'une injection intrathécale de FC sur la sensibilité nociceptive mécanique et thermique au chaud en situation basale et après injection intraplantaire de capsaïcine

A, B. Effet d'une injection intrathécale (i.th) de FC (1 nmol) sur les seuils de retrait mécaniques (filaments de Von Frey) et de réflexe nociceptif à la chaleur (test de la plaque chaude). Les tests comportementaux sont réalisés 45 min après l'injection du FC. **C, D.** Effet de l'injection intrathécale de FC sur l'allodynie mécanique et l'hyperalgesie thermique provoquées par une injection intraplantaire (i.p) de capsaïcine (injection bilatérale, 1 mM, 20 µL). **C1, D1** comparent les effets du FC seul et de la capsaïcine 45 min après injection de FC sur les sensibilités mécanique (C1) et thermique (D1). **E, F.** Récupération 24 h après l'injection de FC. (n.s non significatif, ** p<0.01, * p<0.05).

tranches avec le FC, il n'y a plus que 8 % (2/24) des neurones qui présentent une augmentation de fréquence des CPSIs suite à l'application de capsaïcine (Figure 17). Cette différence est statistiquement significative ($p = 0,0006$; test exact de Fisher).

Lamina V

Dans la couche V, la capsaïcine a induit une augmentation de fréquence des CPSIs dans 55 % (18/33) des neurones dans des tranches contrôles non traitées au FC. Après préincubation avec le FC, 83 % (5/6) des cellules répondent à la capsaïcine. Ces proportions de réponses à la capsaïcine en condition contrôle et après traitement des tranches de moelle épinière au FC ne sont pas statistiquement différentes ($p = 0,370$; test exact de Fisher).

2) Effets du FC sur la sensibilité nociceptive mécanique et thermique

Effet propre du FC

45 min après l'injection intrathécale d'1 nmol de FC, le seuil de retrait mécanique mesuré avec les filaments de von Frey était passé de $37,4 \pm 4,77$ g à $172 \pm 4,5$ g ($n = 10$; $p = 0,00515$; test de Wilcoxon). Cet effet analgésique du FC était réversible puisque 24 h après l'injection de FC, le seuil mesuré était de $39,92 \pm 10,19$ g ($n=6$) (Figure 19).

À la suite du test de sensibilité mécanique avec les filaments de von Frey, les animaux ont passé le test de la plaque chaude. Avant l'injection de FC le temps de latence de déclenchement d'une réponse nociceptive thermique était de $38,07 \pm 3,03$ s. Après l'injection intrathécale de FC ces valeurs étaient de $31,7 \pm 2,12$ s ($n = 10$; $p = 0,108$; test de Wilcoxon). 24h après l'injection les valeurs mesurées étaient de $32 \pm 4,21$ s ($n = 6$) (Figure 19).

Effet du FC sur la nociception aiguë

Après injection intraplantaire bilatérale de capsaïcine (1 mM) les seuils de retrait de pattes aux filaments de von Frey sont passés de $32 \pm 9,3$ g à $5,17 \pm 0,6$ g ($n = 6$; $p = 0,0350$; test de Wilcoxon). Si une injection intrathécale de FC est réalisée 45 min avant l'injection intraplantaire de capsaïcine, les valeurs des seuils mécaniques passent de $39,25 \pm 7,25$ à $27 \pm 3,6$ g ($n = 6$). La variation de seuil induite par la capsaïcine après prétraitement au FC n'est pas statistiquement significative ($p = 0,369$; test de Wilcoxon) (Figure 19).

Dans le test de la plaque chaude réalisé après l'injection intraplantaire de capsaïcine le temps moyen d'apparition d'une réaction nociceptive passe de $38,67 \pm 3,74$ s à $26,50 \pm 2,68$ s ($n = 6$; $p = 0,0312$; test de Wilcoxon). Lorsque l'injection intrathécale de FC est réalisée avant l'injection intraplantaire de capsaïcine, les valeurs de latence d'apparition du réflexe de retrait nociceptif passent de $36,67 \pm 3,40$ s à $41,33 \pm 2,85$ s ($n = 6$; $p = 0,186$; test de Wilcoxon) (Figure 19).

DISCUSSION

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons décrit une facilitation par la NA des transmissions GABAergique et glycinergique dans les laminae III-V de la CDME qui met en jeu l'activation des adrénoccepteurs α_1 , β et de manière surprenante, α_2 . Cet effet nécessite une communication interlaminaire intacte entre les laminae III-IV et V pour la majorité de sa composante dépendante des adrénoccepteurs α_1 et la totalité de la composante impliquant les adrénoccepteurs α_2 . De plus, il semblerait que cet effet repose en grande partie sur une interaction entre les cellules gliales et les neurones de la CD, probablement par l'intermédiaire d'une gliotransmission glutamatergique et purinergique dans la lamina V (ou des laminae plus profondes). Nous avons également observé un effet de facilitation postsynaptique de la NA sur les récepteurs de la glycine des laminae III-IV.

D'après la littérature scientifique, l'effet analgésique de la NA, lorsqu'il implique la libération endogène de NA, semble essentiellement dépendre de l'activation des adrénoccepteurs α_2 . Dans ce contexte, nos résultats sont nouveaux car ils révèlent l'existence d'un maillon glial essentiel situé dans les laminae profondes et contrôlé notamment par les adrénoccepteurs α_2 . Il se pourrait donc que l'analgésie noradrénergique dépendante des récepteurs α_2 résulte en partie d'une interaction glie-neurone.

I. Aspects méthodologiques

Conditions d'enregistrement et application des substances

Les enregistrements présentés dans ces travaux de thèse ont été réalisés avec une approche expérimentale de blind-patch. Cette technique permet de travailler sur des tranches épaisses (600 μm) de moelle épinière dans lesquelles nous pouvons enregistrer des neurones au centre de la tranche et dont les réseaux synaptiques sont mieux conservés que dans des tranches plus fines classiquement utilisées.

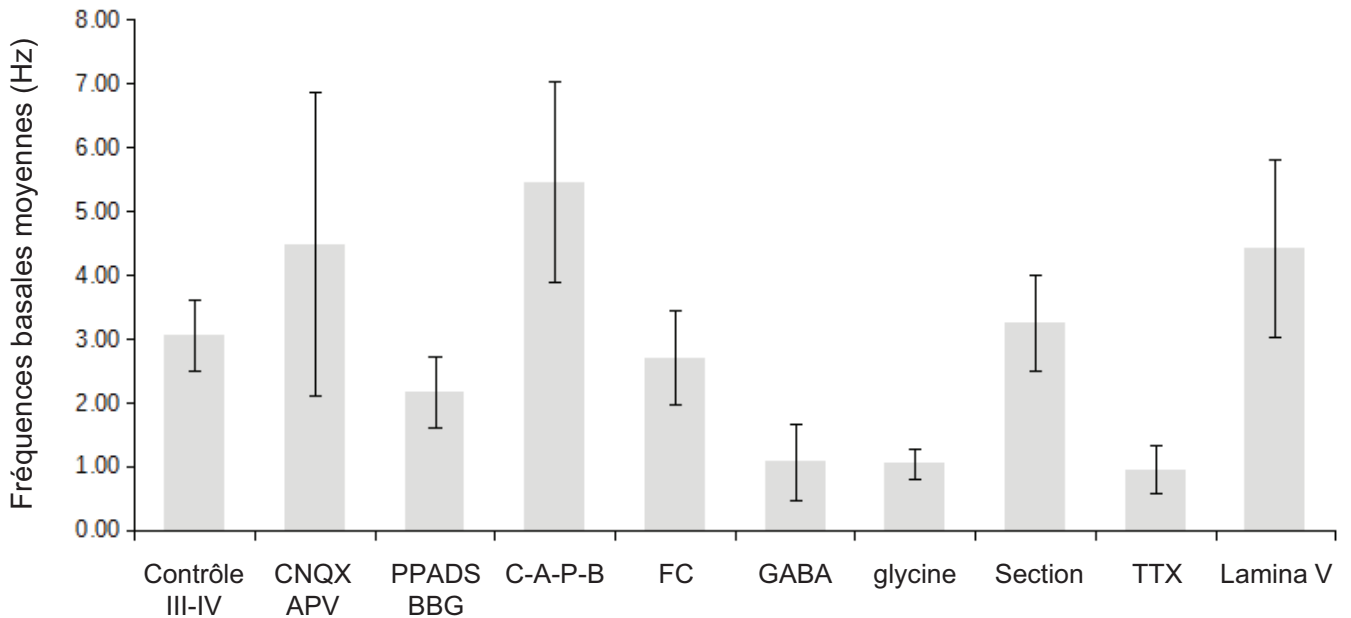


Figure 20. Fréquences de base moyennes des CPSI dans différentes conditions d'enregistrement

Les cellules ont toutes été enregistrées dans les laminae III-IV sauf pour la condition « Lamina V ». CNQX (10 μ M)-APV (50 μ M) ; PPADS (10 μ M)-BBG (1 μ M) ; C-A-P-B : les quatre bloquants précédent appliqués en même temps ; FC : fluorocitrate (prétraitement 100 μ M, 1 h) ; GABA : CPSIs enregistrés en présence de PMBA (un bloquant des récepteurs de la glycine) ; glycine : CPSIs enregistrés en présence de bicuculline (un bloquant des récepteurs GABA_A) ; section : section mécanique entre les laminae IV et V ; TTX : CPSIm enregistrés en présence de TTX 0,5 μ M.

Les substances testées ont toutes été appliquées par perfusion générale dans le bain de la chambre d'enregistrement. Les concentrations de NA utilisées dans la littérature sont de l'ordre de 50-100 μM . Nos concentrations sont plus faibles (20 μM). Elles ont été choisies pour être compatibles avec les concentrations endogènes locales estimées dans des expériences de microdialyse dans la moelle épinière (Abhold et Bowker, 1990). De plus, une concentration de 20 μM est un bon compromis pour activer les récepteurs ciblés assez rapidement (front de montée de la concentration de NA dans les profondeurs de la tranche assez importante) sans pour autant désensibiliser trop rapidement ces récepteurs. Les concentrations que nous avons utilisées se situent d'une manière générale dans une gamme de concentration de 100 à 1000 fois supérieure à l' EC_{50} de la substance pour son récepteur. Etant donné la courte durée d'application par bain (3 min), la concentration de NA atteinte à l'intérieur de la tranche (dans sa profondeur) est probablement de l'ordre de 100 fois plus faible que dans la solution appliquée.

Expériences de section

Les résultats obtenus sur des tranches de moelle épinière ayant subi une section mécanique pourraient être faussés par une dégradation de l'état des réseaux synaptiques après la section du tissu. Or nous voyons qu'après la section, dont le but est de supprimer tout échange d'informations entre les cellules des laminae III-IV et V, la fréquence des CPSIs enregistrés dans les laminae III-IV ne diffère pas des conditions contrôle (Figure 20). Après la section il existe toujours des réponses pour certaines substances pharmacologiques (phényléphrine) et l'ensemble des neurones testés répondent à une application d'une solution « dépolarisante » contenant 50 mM de potassium (solution de haut K^+) par une forte augmentation de fréquence des CPSIs. Ces données indiquent que les résultats obtenus suite aux sections mécaniques entre les laminae IV et V sont dus à une absence de communication intralaminaire et non pas à un réseau synaptique globalement endommagé (i.e à une baisse de capacité de libération de neurotransmetteurs).

Fluorocitrate, cellules gliales et transmission synaptique

Le fluorocitrate (FC) bloque le cycle de Krebs en inhibant l'aconitase et donc la formation d'isocitrate. Il a l'avantage d'être préférentiellement capté par la glie mais, pour des incubations plus longues (>3h), le FC a également un effet sur les neurones (Fonnum et al., 1997). Dans nos expériences, la préincubation des tranches avec le FC a été limitée à 1 h car, dans ces conditions il a été montré dans des tranches de cerveau que la transmission synaptique et l'activité neuronale ne sont pas affectées (Nakanishi et al., 1996; Schurr et al., 1997; Martín et al., 2007). Le fait que les fréquences de bases ne soient pas modifiées par le FC (Figure 20) et que l'application d'une solution de haut K^+ induise toujours une très forte augmentation de la fréquence des CPSIs indiquent que le FC n'affecte pas directement les fonctions neuronales (du moins la transmission synaptique). De plus, nous avons pu observer qu'après le FC, l'effet de la capsaïcine subsiste dans les laminae II et V, confirmant que l'effet du FC ne résulte pas d'une dépression généralisée de la transmission synaptique et qu'il n'affecte pas le métabolisme (e.g synthèse d'ATP) des neurones dans nos conditions. En parallèle des expériences avec le FC, nous avons aussi eu recours à un autre moyen pour bloquer l'activité gliale dans nos tranches. Dans quelques expériences nous avons incubé les tranches de moelle épinière avec une gliotoxine : l'acide α -aminoadipique (α -AA) (Huck et al., 1984). Bien que le nombre de cellules enregistrées soit faible (n=9), nous avons remarqué que l' α -AA (500 μ M) reproduisait l'effet du FC en inhibant l'augmentation de fréquence des CPSIs induit par la NA ou ses agonistes.

Les injections intrathécales de FC ont été faites avec des doses de 1 nmol dans un volume de 10 μ L. Ces conditions sont similaires à d'autres études dans lesquelles il a été montré que l'effet du FC sur les comportements nociceptifs est observable à partir de 30 min après l'injection (Hassel et al., 1992; Milligan et al., 2003).

II. Effets de la NA

La NA est une catécholamine produisant une analgésie. Le substrat neuronal de cet effet se trouve au niveau spinal et a été documenté grâce à des études électrophysiologiques et comportementales. La CDME est subdivisée en laminae et les informations nociceptives y parvenant ne restent pas cantonnées aux laminae I-II et V

dans lesquelles projettent les fibres afférentes primaires véhiculant ces informations nociceptives en provenance de la périphérie. Il existe en effet des connexions interlaminaires entre les laminae superficielles et profondes de la corne dorsale qui participent à l'intégration et au traitement des messages nociceptifs (Petitjean et al., 2012) (voir introduction). Notre objectif a été de rechercher et de caractériser les effets de la NA sur les transmissions synaptiques dans et entre ces laminae, avec un intérêt particulier pour les laminae profondes de la corne dorsale où les effets de la NA n'ont jamais été documentés au niveau de la transmission synaptique.

Jusqu'à présent les études sur le mode d'action de la NA se sont effectivement focalisées sur la lamina II. La littérature nous indique que la NA augmente la fréquence des CPSIs mais pas des CPSEs via les récepteurs α_1 alors que l'activation du récepteur β n'a aucun effet sur la transmission synaptique dans la lamina II. La stimulation des adrénocéphes α_2 hyperpolarise les neurones de la lamina II sans affecter la fréquence ou les amplitudes des CPSEs ou des CPSIs. Par contre l'activation des adrénocéphes α_2 inhibe les CPSEs évoqués par stimulation électrique ou chimique des fibres afférentes primaires nociceptives, indiquant la présence de récepteurs α_2 fonctionnels sur les terminaisons des afférences primaires nociceptives plutôt que sur les terminaisons des interneurons de la CDME.

Nos résultats obtenus sur la transmission synaptique inhibitrice dans la lamina II sont en accord avec les données de la littérature.

III. Effets pré et/ou postsynaptiques de la NA

Nos résultats montrent que les effets de la NA sur la transmission synaptique inhibitrice sont majoritairement présynaptiques (augmentation de fréquence des CPSIs). Nous n'avons observé aucun effet de la NA sur la transmission synaptique excitatrice spontanée dans les laminae II-V de la CDME.

Au niveau postsynaptique nous avons vu que dans 33 % des cellules des laminae III-IV la NA augmentait l'amplitude des CPSIm glycinergiques tout en n'ayant aucun effet sur les CPSIm GABAergiques. La NA semble donc avoir un effet postsynaptique sélectif sur les récepteurs de la glycine. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans la moelle épinière sacrée et sur des neurones de la corne dorsale en culture

(Nabekura et al., 1999; Lang et al., 2003). Dans l'hippocampe, la NA induit une libération d'ATP par les astrocytes qui va déclencher l'internalisation d'AMPA postsynaptiques neuronaux via un mécanisme dynamine-dépendant (Pouget et al., 2014). Dans l'hypothalamus, suite à l'activation des adrénocéphes α_1 la NA induit également une libération d'ATP par les astrocytes qui semble au contraire amener à l'insertion d'AMPA postsynaptiques après activation des récepteurs P2X7 (Gordon et al., 2005). Ces effets ont une cinétique lente avec un délai d'apparition de 20-30 min alors que dans nos expériences l'effet postsynaptique de la NA avait lieu à partir de 3 min après l'application de NA. L'effet que nous observons est donc plus compatible avec un mécanisme de modulation rapide, dépendant probablement de la voie PKA (Ahmadi et al., 2002; Lang et al., 2003).

IV. Propriétés pharmacologiques des effets de la NA dans les laminae III-IV et V

Nos données montrent que l'activation du récepteur α_1 avec la phényléphrine entraîne une augmentation forte et durable de la fréquence des CPSIs dans 67 % des neurones enregistrés dans la lamina II, dans 100 % des neurones des laminae III-IV et dans 27 % des neurones de la lamina V. Or, la majorité des données comportementales semblent indiquer que l'activation des adrénocéphes α_1 n'est pas critique dans l'analgésie noradrénergique spinale induite par la libération endogène de NA (Fleetwood-Walker et al., 1985; Hunter et al., 1997; Malmberg et al., 2001). Ainsi se pose la question du rôle des récepteurs de type α_1 dans les contrôles descendants noradrénergiques chez le rat. L'expression spinale des adrénocéphes α_1 est importante (voir données immunohistochimiques – introduction) et nous observons un nombre élevé de neurones qui répondent à la phényléphrine dans les laminae II-IV. Il se pourrait que le système α_1 -adrénergique joue un rôle de rétrocontrôle pour limiter la libération de NA lors de sollicitations fortes des contrôles descendants noradrénergiques en augmentant la transmission inhibitrice GABAergique et glycinergique afin d'inhiber la libération de NA. Ce phénomène pourrait être un mécanisme de régulation important au plan physiologique car il semble par ailleurs que les autorécepteurs inhibiteurs « classiques » de type α_2 soient absents des terminaisons noradrénergiques spinales

Tableau 4. Affinités des adrénoccepteurs pour la noradrénaline (British Journal of Pharmacology – The Concise Guide to Pharmacology 2013/2014).

Adrénoccepteur	Affinité pour la noradrénaline (nM – pKi)
α_{1A}	5.8 – 6.0
α_{1B}	6.2
α_{1D}	7.4
α_{2A}	5.6 – 8.4
α_{2B}	5.6 – 9.1
α_{2C}	5.9 – 8.7
β_3	4.7 – 6.3

(Stone et al., 1998; Olave et Maxwell, 2002). Notons cependant que chez l'humain les récepteurs α_1 sont peu exprimés dans la corne dorsale de la moelle épinière et ne contribuent donc probablement que très peu aux effets analgésiques de la NA (Smith et al., 1999).

Par ailleurs, nos données fonctionnelles suggèrent que les adrénoccepteurs de type β semblent uniquement exprimés dans les laminae III-IV de la corne dorsale bien que des données histochimiques suggèrent leur présence dans la lamina II (Mizukami, 2004). Nous avons, en effet, observé une facilitation de la transmission synaptique inhibitrice suite à l'activation du récepteur β dans 33 % des neurones des laminae III-IV mais jamais dans les laminae II ou V. De plus, nos expériences de section, de blocage pharmacologique du métabolisme glial ou des transmissions glutamatergique/purinergique, n'ont jamais significativement affecté cette proportion de réponses. Si des récepteurs β fonctionnels sont présents dans la lamina II, leur effet ne passe en tout cas pas par la modulation de la transmission synaptique inhibitrice ou excitatrice.

V. Analgésie comportementale et récepteurs α_2

L'effet analgésique de la NA est reproduit par des agonistes et bloqué par des antagonistes des récepteurs α_2 . Les récepteurs α_2 semblent donc jouer un rôle déterminant dans les réseaux spinaux responsables de l'analgésie noradrénergique.

Dans la CDME nous trouvons les trois types de récepteurs à la NA et nous avons vu que les récepteurs α_1 et β sont fonctionnels : leur activation module la transmission synaptique inhibitrice. Un rôle prédominant des récepteurs α_2 s'explique peut-être par la présence préférentielle de ces adrénoccepteurs α_2 sur les terminaisons des afférences primaires, à proximité des sites de libération de la NA dans la CDME. Leur affinité pour la NA est comparable à celle des autres types d'adrénoccepteurs (tableau 4) (Shibata et al., 1995; Strosberg, 1997; Jasper et al., 1998; Peltonen et al., 1998; Pihlavisto et al., 1998; Taniguchi et al., 1999; Hoffmann et al., 2004). Dans la CDME, les données d'immunolocalisation en microscopie électronique des récepteurs adrénérgiques actuellement disponibles sont insuffisantes pour indiquer une localisation différentielle des récepteurs α_2 par rapport aux récepteurs α_1 et β au niveau synaptique (Stone et al., 1998; Olave et Maxwell, 2002; Mizukami, 2004). Une des façons de déterminer si la

libération synaptique de NA à partir de fibres descendantes peut directement et rapidement activer les récepteurs α_2 (ou alternativement les récepteurs α_1 ou β) passerait par une approche optogénétique. Ainsi, on pourrait envisager d'exprimer par transgénèse virale la channelrhodopsine 2 dans les neurones noradrénergiques du LC sous le contrôle du promoteur de la dopamine β -hydroxylase. Ceci permettrait une photostimulation sélective des fibres NA en provenance du LC dans une tranche de moelle épinière. L'analyse des événements synaptiques excitateurs ou inhibiteurs évoqués par la stimulation optique de ces fibres (notamment de leur latence et de la variabilité de celle-ci) dans la tranche, couplée à une approche pharmacologique (antagonistes des adrénocéphes), devrait permettre de déterminer si les neurones (et/ou les cellules gliales) contactés par les fibres ou suffisamment proche des sites de libération de la NA, expriment des récepteurs α_2 et si la libération endogène de NA active préférentiellement ces récepteurs α_2 .

VI. Implication de la NA endogène

Toutes les substances que nous avons appliquées par bain diffusent dans l'ensemble de la tranche de moelle épinière. Ainsi, nous touchons l'ensemble des récepteurs présents dans la tranche pour un agoniste donné. Ce mode d'activation des récepteurs est potentiellement différent d'une libération physiologique de NA par les contrôles descendants qui pourrait être plus restreinte dans l'espace. Ainsi, on pourrait se demander si les effets que nous observons ne sont pas principalement dus au mode d'application et/ou à la concentration de NA ou de ses agonistes que nous utilisons dans nos expériences.

Quand le LC est stimulé électriquement, la concentration de NA mesurée au niveau de la moelle lombaire par microdialyse avoisine les 23 μM (Abhold et Bowker, 1990), une concentration proche des 20 μM que nous utilisons pour la NA dans nos expériences. De plus, nous montrons que l'application de nortriptyline, qui bloque les transporteurs de la NA et augmente donc localement la concentration de NA au voisinage des sites de libération endogène de la NA, reproduit en tous points les effets de la NA appliquée de façon exogène. Ces résultats montrent d'une part, que dans nos conditions expérimentales les fibres noradrénergiques présentes dans la CDME libèrent

de manière basale de la NA et d'autre part, que les effets induits par la NA endogène sont similaires à ceux induits par une application exogène de NA. Ainsi, la nortriptyline facilite la transmission synaptique inhibitrice dans une forte proportion de neurones enregistrés dans les laminae III-IV, et cet effet est bloqué par les antagonistes des adrénocéphes ainsi que par le blocage du métabolisme glial avec le FC.

Par conséquent, nous pensons que les effets d'applications exogènes de NA tels que nous avons pu les caractériser dans les différentes laminae de la corne dorsale de la moelle épinière se rapprochent de ceux induits par la NA libérée de manière endogène dans des conditions plus physiologiques.

VII. Réseau neuro-glial spinal

1) Importance de la glie

Les données de la littérature montrent que la NA a des effets sur les cellules gliales et notamment sur les astrocytes (voir introduction pour plus de détails). La NA induit la libération par les astrocytes de divers gliotransmetteurs tels que le glutamate et l'ATP qui sont capables de moduler les communications entre les neurones au sein des réseaux synaptiques (Newman, 2003; Gordon et al., 2005; Pougnet et al., 2014) ainsi qu'entre les astrocytes eux-mêmes au sein des réseaux gliaux (Hassinger et al., 1996; Guthrie et al., 1999). Par ailleurs, une partie des fibres descendantes noradrénergiques se terminent en apposition avec des astrocytes de la corne dorsale (Ridet et al., 1993). C'est pour ces raisons que nous avons recherché une implication éventuelle de la glie dans les effets de la NA sur la transmission synaptique inhibitrice dans la corne dorsale de la moelle épinière.

Pour mettre en évidence une telle implication, nous avons décidé de traiter les tranches aiguës de moelle épinière avec un inhibiteur du métabolisme glial : le fluorocitrate (FC) qui inhibe la synthèse et la libération d'ATP et de glutamate.

Nous avons pu observer qu'après inhibition du métabolisme glial par le FC, 68 % des réponses α_1 -dépendantes et la totalité des réponses α_2 -dépendantes étaient bloquées. Par contre, le traitement au FC n'a jamais affecté la composante β -adrénergique.

De plus, l'inhibition du métabolisme glial a bloqué sélectivement les effets de la capsaïcine sur la transmission synaptique inhibitrice dans les laminae III-IV de la CDME, sans affecter les caractéristiques de base des transmissions synaptiques inhibitrices et excitatrices ou les effets facilitateurs de la capsaïcine sur ces transmissions dans les autres laminae (II et V).

Les cellules gliales de la moelle épinière semblent donc indispensables à l'effet facilitateur α_2 - et TRPV1-dépendants de la transmission synaptique inhibitrice dans les laminae III-IV. Ceci suggère que la glie spinale et les interactions neurone-glie sont probablement cruciales pour le bon fonctionnement des contrôles descendants noradrénergiques et l'intégration des informations nociceptives dans les laminae III-IV.

Cette importance des communications entre la glie et les neurones est confirmée par l'effet des injections intrathécales de FC sur les réponses comportementales nociceptives.

L'étude des réflexes nociceptifs mécanique (filaments de Von Frey) et thermique (plaque chaude) nous montre qu'après prétraitement au FC le seuil du réflexe mécanique est fortement augmenté. Cela veut dire que lorsque le métabolisme glial de la moelle épinière est bloqué, les animaux présentent une baisse de sensibilité à une stimulation mécanique nociceptive au niveau de leurs pattes postérieures. Une injection intraplantaire de capsaïcine après l'injection intrathécale de FC ne produit plus d'hyperalgésie thermique ou d'allodynie mécanique. L'intégrité des cellules gliales semble donc nécessaire au développement de l'hyperalgésie mécanique et thermique suite à une injection périphérique de capsaïcine. D'une manière plus générale, la glie apparaît comme indispensable au fonctionnement du système somatosensoriel spinal. Les effets du FC s'installent progressivement et sont réversibles après 24h. Ils ne sont donc pas dus à une éventuelle toxicité du FC. Nous ne pouvons cependant pas être certains d'un mode d'action exclusivement spinal du FC étant donné que durant le temps nécessaire au blocage du métabolisme glial (ici, 45 min), le FC peut atteindre les centres supraspinaux par l'intermédiaire du liquide céphalo-rachidien.

Le FC bloque le métabolisme de toutes les cellules gliales (Hassel et al., 1992) et les astrocytes ainsi que les cellules microgliales expriment potentiellement des adrénocéphes. Mais la preuve d'une expression spinale d'adrénocéphes par les

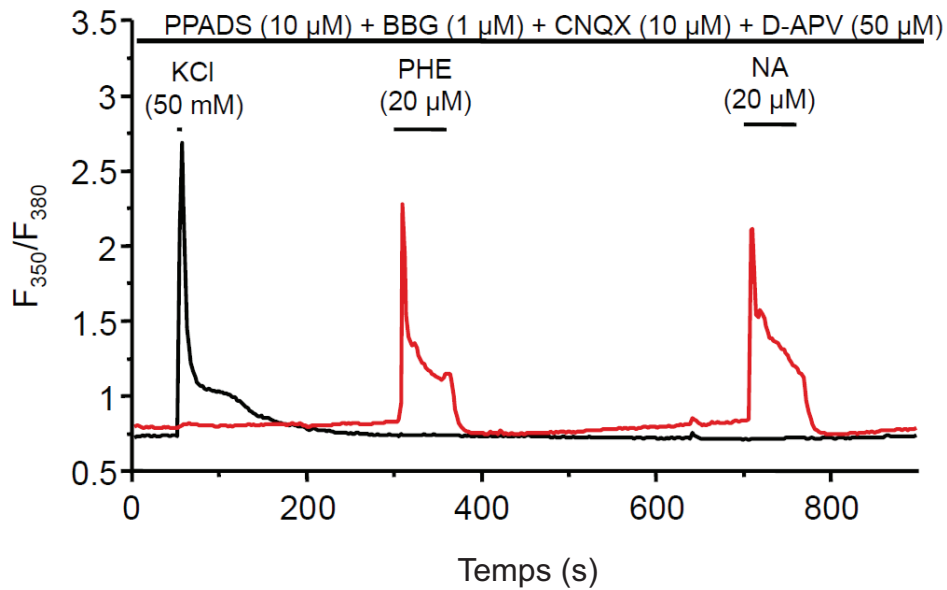


Figure 21. La NA augmente la concentration intracellulaire de calcium dans les cellules gliales

Réponse calcique dans un neurones (trace noire) et une cellule gliale (trace rouge) en présence de bloquants des récepteurs ionotropiques du glutamate (CNQX, APV) et de l'ATP (PPADS, BBG). L'application d'une solution dépolarisante de haut K^+ (50 mM KCl) induit une augmentation du calcium libre intracellulaire dans le neurone mais pas dans la cellule gliale. La phényléphrine (PHE, agoniste α_1) et la noradrénaline (NA) augmentent la concentration de calcium intracellulaire libre dans la cellule gliale mais pas dans le neurone.

astrocytes (Hösli et Hösli, 1982; Hösli et al., 1993) et de leur stimulation fonctionnelle par la NA (Do et al., 1997; Hertz et al., 2010; O'Donnell et al., 2012; Xu et al., 2014a) nous font penser que les astrocytes plutôt que la microglie seraient impliqués dans ces interactions glie-neurone.

À l'heure actuelle, il n'existe malheureusement pas de bloquant métabolique entièrement sélectif des astrocytes ou des cellules microgliales. L'étude des effets de la NA devra être poursuivie sur des cellules identifiées *in situ* (ou en culture) en utilisant par exemple des cellules de souris transgéniques dans lesquelles les cellules microgliales sont identifiées par l'expression d'EGFP sous le promoteur du récepteur CX3CR1 ou les astrocytes par l'expression d'EGFP sous le promoteur de la GFAP.

Des expériences préliminaires d'imagerie du calcium sur des cocultures entre neurones et cellules gliales des laminae profondes de la corne dorsale vont dans le sens d'une action de la NA sur des astrocytes (Figure 21).

Gliotransmetteurs potentiellement impliqués dans la communication glie-neurone

Nous avons voulu voir si des gliotransmetteurs tels que le glutamate et l'ATP pouvaient être impliqués dans ces interactions glie-neurone. Pour cela nous avons réalisé des enregistrements dans les laminae III-IV en bloquant les récepteurs-canaux cationiques du glutamate (avec le CNQX et l'APV) et/ou de l'ATP (récepteurs P2X, avec le PPADS et le brillant blue G).

Ces expériences ont montré que l'effet α_1 -dépendant sur la transmission synaptique inhibitrice nécessite l'activation de récepteurs AMPA et que l'effet α_2 -dépendant nécessite l'activation de récepteurs NMDA et P2X.

Il est aussi intéressant de noter que l'effet de la NA est fortement réduit uniquement lorsque les transmissions glutamatergiques et purinergiques sont inhibées simultanément. En effet, lorsqu'on bloque ces transmissions séparément, l'effet de la NA n'est soit pas affecté, soit faiblement atténué. Ceci indique que l'effet de la NA est complexe et implique probablement la libération de gliotransmetteurs comme le glutamate et l'ATP qui agiraient de façon synergique.

La libération de ces gliotransmetteurs par les cellules gliales peut se faire de différentes façons : par exocytose, par l'intermédiaire de canaux anioniques ou de canaux

pannexine (Garré et al., 2010; Vroman et al., 2014). Une fois libérés, ces gliotransmetteurs peuvent agir sur les neurones par l'activation de récepteurs-canaux (AMPA, NMDA, KA, P2X) ou métabotropes (mGluR, P2Y). Il est probable que la modulation des communications cellulaires spinales par la NA via l'ATP astrocytaire implique des effets postsynaptiques. En effet, il a été montré que l'ATP libérée suite à l'application de NA peut atténuer la communication synaptique excitatrice en jouant sur l'insertion membranaire des récepteurs AMPA (Pougnnet et al., 2014) et que la NA pouvait potentialiser directement les récepteurs P2X via un mécanisme de type allostérique, même à des concentrations de l'ordre du nanomolaire (Surprenant et al., 2000).

Au stade actuel de nos travaux, notre démonstration de l'implication de l'ATP et du glutamate comme gliotransmetteur impliqués dans les effets de la NA sur la transmission synaptique inhibitrice reste indirecte. Cependant, il faut souligner que les effets bloquants des antagonistes des récepteurs canaux de l'ATP et du glutamate sont identiques à ceux du FC. Ce point renforce l'hypothèse selon laquelle le glutamate et l'ATP impliqués dans les effets de la NA sur la transmission synaptique inhibitrice pourraient être d'origine gliale.

2) Réseau modulé par la NA

Dans cette partie de la discussion nous allons nous appuyer sur les résultats présentés jusqu'ici et sur des données publiées dans la littérature pour tenter d'élaborer un modèle du mécanisme d'action de la NA dans la CDME.

Les hypothèses discutées dans cette partie sont schématisées dans les figures 22, 24, 25 et 26.

Avant de discuter de ces différentes hypothèses, il convient de rappeler que :

1) la section mécanique entre les couches IV et V produit le même effet qu'un blocage du métabolisme glial par le FC, ce qui indique une relation étroite entre les cellules gliales et les processus à l'origine de la modulation de la transmission synaptique inhibitrice dans les couches III-IV. De plus, ces données suggèrent que cette interaction entre cellules gliales et neurones prend son origine dans les laminae profondes.

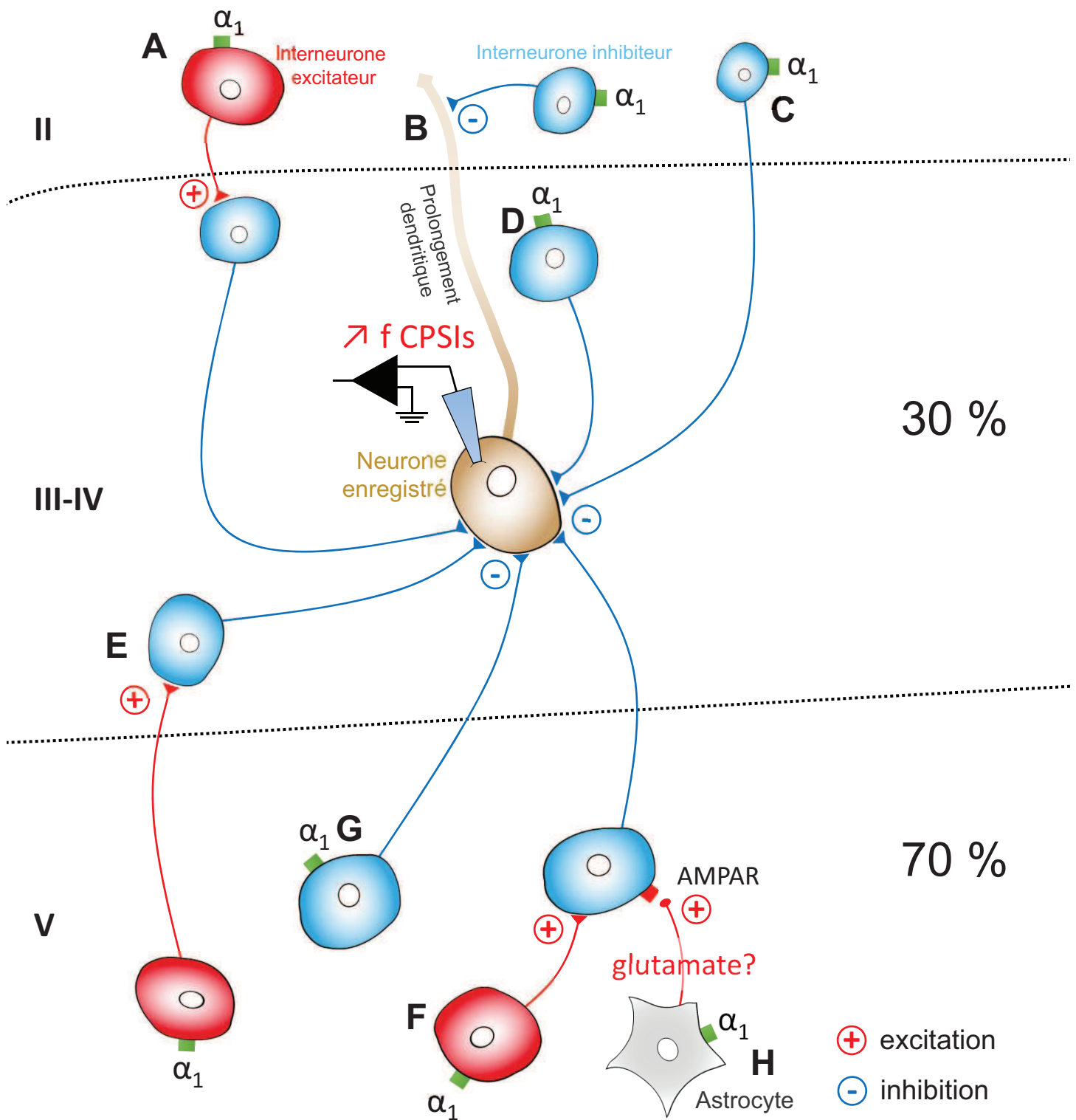


Figure 22. Réseaux potentiellement impliqués dans les effets facilitateurs de la transmission synaptique inhibitrice dans les laminae III-IV suite à l'activation des récepteurs α_1

Environ 70 % des effets observés dans les laminae III-IV dépendent des laminae profondes (V-VI) (c.f expériences de section et FC). Ce phénomène dépend probablement des cellules gliales et des récepteurs AMPA (effet α_1 -dépendant bloqué par le FC (70 % des neurones) et par le CNQX (100 % neurones). Les hypothèses pouvant rendre compte de l'effet dans les laminae profondes sont schématisées par les situations E, F, G et H.

Les 30 % de réponses restantes après section entre les laminae IV-V ou après FC pourraient s'expliquer selon 4 hypothèses : A, B, C ou D, l'hypothèse D étant la plus probable (voir discussion).

2) sur les neurones, les récepteurs de la NA sont localisés loin des terminaisons synaptiques car les effets des agonistes de ces récepteurs (ou de la NA) ne sont jamais observés en présence de TTX qui bloque la genèse et la propagation des potentiels d'action. Il est vraisemblable que les récepteurs se situent sur le corps cellulaire et/ou les dendrites de ces neurones.

En tenant compte de ces considérations, on peut supposer que :

- si l'effet d'un agoniste de la NA persiste dans les laminae III-IV après section entre les laminae IV-V, le corps cellulaire du neurone (ou de la cellule gliale) impliqué dans cet effet se situe dans une lamina plus dorsale que la lamina V (i.e. au-dessus de la section).

-si l'effet de l'agoniste disparaît après section, le corps cellulaire du neurone (ou de la cellule gliale) impliqué se situe dans une lamina plus profonde que la lamina IV (i.e. en dessous de la section).

a) Réseaux modulés par les récepteurs α_1

Communications au sein et entre les laminae II et III-IV

Nos résultats indiquent qu'après section entre les laminae IV et V, la proportion de réponses à la phényléphrine dans les laminae III-IV est de 30 % ; 70 % des réponses ayant disparu. Notons également que le pourcentage de réponses persistant après section est similaire à celui observé en FC, ce qui indique que les cellules gliales ne participent pas à ces effets « résiduels ». Ces derniers sont donc probablement dus à des récepteurs α_1 exprimés par des neurones. Cette situation peut s'expliquer par quatre hypothèses que nous nommerons A, B, C et D et qui sont schématisées dans la figure 22.

A. *Les adrénocéphes α_1 sont exprimés sur des interneurones excitateurs stimulant des interneurones inhibiteurs.* Nous avons noté que les effets de la NA subsistent lorsque nous bloquons la transmission excitatrice (CNQX/APV) et que la NA n'a jamais eu d'effet sur la fréquence des CPSEs. Cette hypothèse est donc peu probable.

B. *Des interneurones inhibiteurs de la lamina II exprimant les récepteurs α_1 contactent des prolongements dendritiques des neurones des laminae III-IV.* Dans ce cas les CPSIs dont

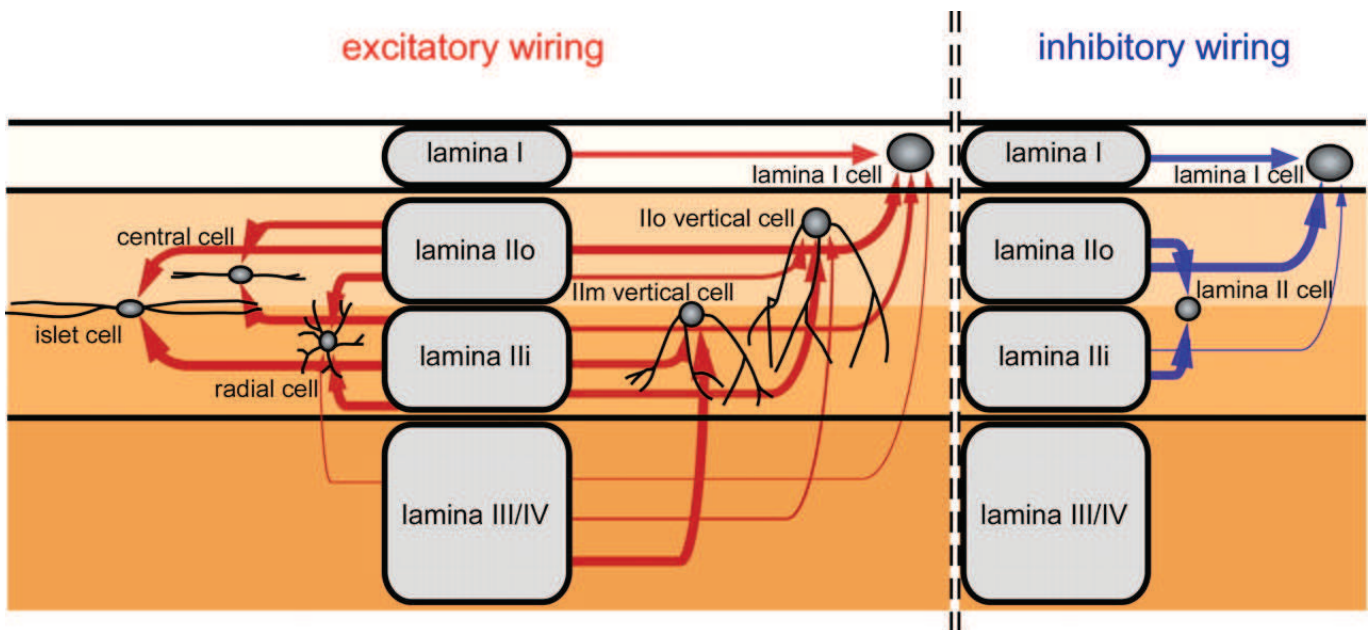


Figure 23. Connectivité interlaminare et translaminare des laminae superficielles de la CDME
 Connectivité des interneurons excitateurs et inhibiteurs des laminae I à IV de la CDME proposée suite à une étude de balayage par photo-stimulation dégageant du glutamate (reproduit de Kato et al., 2009).

la fréquence serait augmentée après application de l'agoniste α_1 (phényléphrine) et que nous enregistrons dans les laminae III-IV devraient être de faible amplitude et présenter un front de montée lent. Ceci n'est pas le cas.

C. Des interneurones inhibiteurs de la lamina II exprimant les récepteurs α_1 contactent les neurones des laminae III-IV. Une étude détaillée des contacts entre la lamina II et les laminae III-IV a montré l'existence de projections excitatrices mais pas inhibitrices de la lamina II vers les laminae III-IV (Figure 23) (Kato et al., 2009). Les neurones inhibiteurs de la lamina II qui possèdent des récepteurs α_1 (Baba et al., 2000a, 2000b; Gassner et al., 2009) ne peuvent donc pas rendre compte de l'augmentation de la fréquence des CPSIs dans les laminae III-IV.

D. Des interneurones inhibiteurs des laminae III-IV expriment le récepteur α_1 et font des synapses avec les neurones que nous enregistrons dans les laminae III-IV dans lesquels nous observons l'augmentation de fréquence des CPSIs. Cette hypothèse est la plus probable pour la proportion de 30 % des neurones qui répondent à la phényléphrine après la section mécanique entre les laminae IV et V, et après traitement des tranches au FC.

Implication des laminae V et VI

La section entre les laminae IV et V supprime 70 % des réponses aux agonistes α_1 dans les laminae III-IV et le même effet est obtenu après inhibition du métabolisme glial par le FC. Ces données indiquent que des neurones et des cellules gliales situées plus profondément que la lamina IV sont impliqués dans 70 % des effets des agonistes α_1 sur la transmission synaptique inhibitrice dans les laminae III-IV. Quatre hypothèses principales (dénommées E-H dans la figure 22) pourraient rendre compte de cette situation :

E. Un interneurone excitateur des laminae V-VI exprime le récepteur α_1 et stimule un interneurone inhibiteur des laminae III-IV et/ou *F. Un interneurone excitateur des laminae V-VI exprime le récepteur α_1 et stimule un interneurone inhibiteur des laminae V-VI.*

Les hypothèses E et F sont peu probables car nous n'avons jamais enregistré de facilitation de la transmission synaptique excitatrice dans la lamina V ou les laminae III-IV suite à l'application de NA.

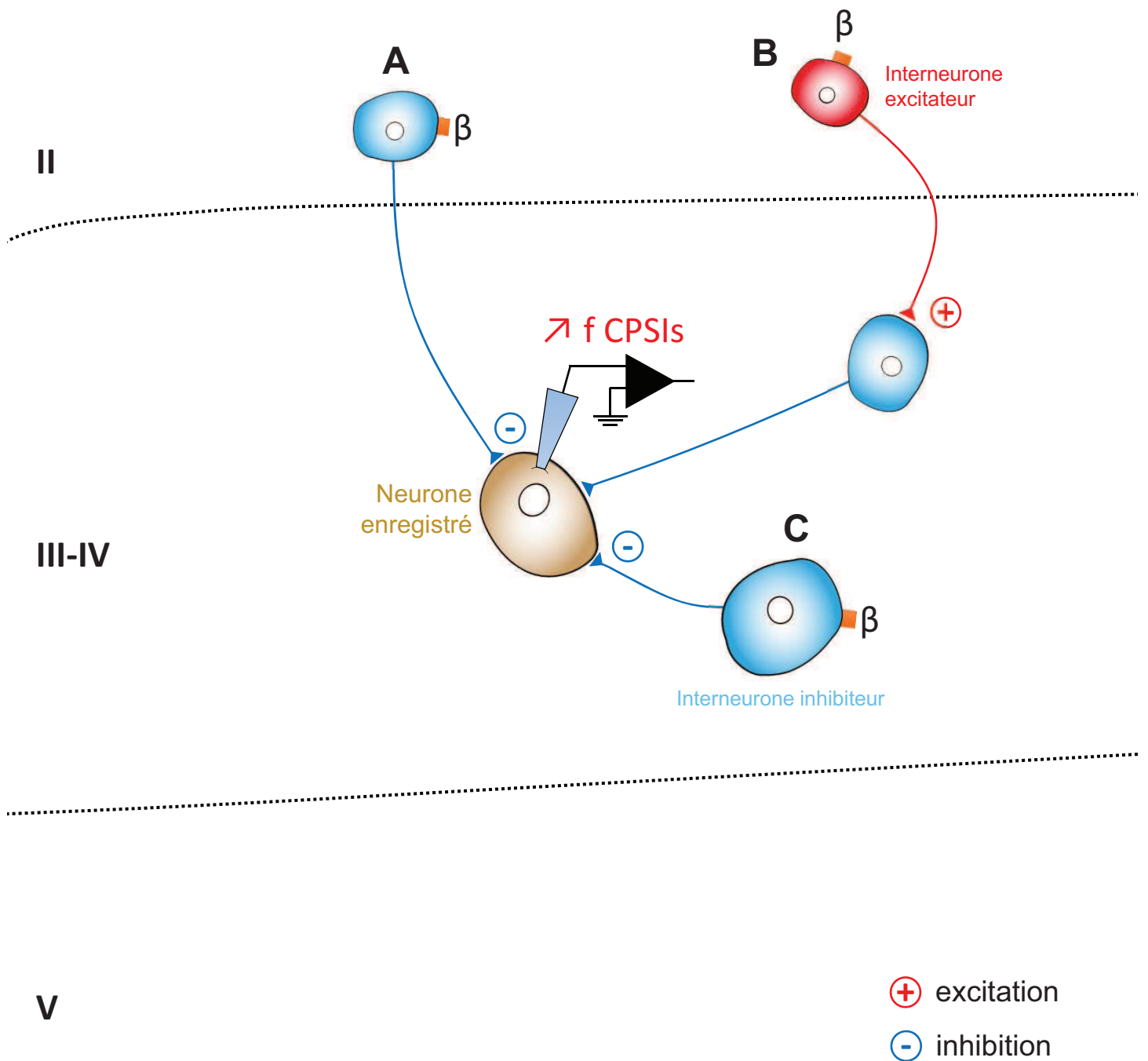


Figure 24. Réseaux hypothétiques permettant d'expliquer les effets facilitateurs de la transmission synaptique inhibitrice dans les laminae III-IV suite à l'activation des récepteurs β

Un tiers des neurones enregistrés dans les laminae III-IV répondent par une augmentation de la fréquence des CPSIs suite à l'application d'agonistes sélectifs des récepteurs de type β . Cet effet n'est bloqué ni par le FC, ni par la section entre les laminae IV et V. Il peut s'expliquer par les situations **A**, **B** et/ou **B**.

G. *Un interneurone inhibiteur des laminae V-VI exprime le récepteur α_1 et contacte directement le neurone des laminae III-IV dans lequel nous enregistrons l'augmentation de fréquence des CPSIs.*

H. *L'adrénocepteur α_1 est exprimé par des cellules gliales des laminae V-VI.*

Dans le cas des hypothèses G et H, la section mécanique des communications entre les laminae IV et V entraînerait une perte des effets des laminae profondes sur les laminae III-IV. Nous avons remarqué que la proportion de réponses α_1 -dépendante bloquée par la section (70 %) est la même que celle induite par l'inhibition du métabolisme glial par FC. Par conséquent nous favorisons l'hypothèse H impliquant un maillon glial dans les laminae V-VI.

b) Réseaux modulés par les récepteurs β

L'effet facilitateur observé dans 33% des neurones des laminae III-IV suite à l'activation des adrénoccepteurs β persiste après section entre les laminae IV et V, ainsi qu'après préincubation des tranches avec du FC. Dans l'hypothèse A (Figure 24), *un interneurone inhibiteur possédant des adrénoccepteurs β projetterait vers les laminae III-IV.* Cependant, en accord avec d'autres études publiées (North et Yoshimura, 1984; Baba et al., 2000b), nous n'avons pas observé d'effet de l'isoprotérénol sur la transmission synaptique dans la lamina II et il n'y a pas de connexions inhibitrices de la lamina II vers les neurones des laminae III-IV (Kato et al., 2009). L'hypothèse A est donc peu probable. L'hypothèse *d'un interneurone excitateur de la lamina II possédant des récepteurs β et projetant sur un interneurone inhibiteur des laminae III-IV* (hypothèse B, Figure 24) est également à exclure car ni la NA, ni les agonistes des récepteurs β n'ont induit d'augmentation de fréquence des CPSEs dans les laminae III-IV. Par contre, comme présenté dans l'hypothèse C (Figure 24), *les adrénoccepteurs β pourraient être exprimés par des interneurons inhibiteurs des laminae III-IV* sur lesquels ils auraient un effet excitateur. Cette situation permettrait de rendre compte de nos observations.

c) Réseaux modulés par les récepteurs α_2

Lors des premiers enregistrements réalisés dans les laminae III-IV pendant lesquels nous avons appliqué de la clonidine nous avons été surpris par son action facilitatrice sur la transmission synaptique inhibitrice.

II

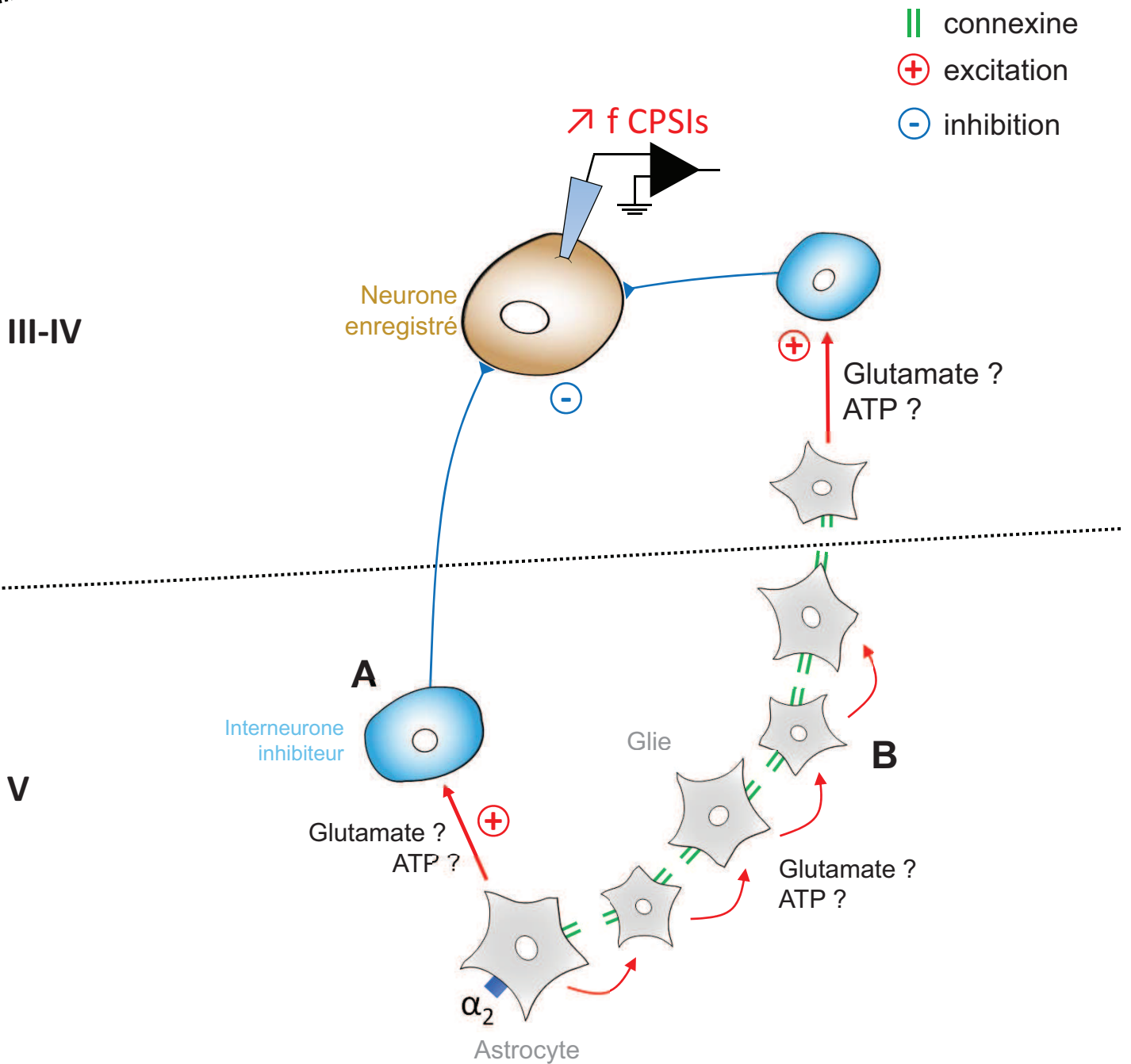


Figure 25. Réseaux hypothétiques permettant de rendre compte des effets facilitateurs de la transmission synaptique inhibitrice dans les laminae III-IV suite à l'activation des récepteurs α_2

La totalité des effets facilitateurs dus à l'activation des récepteurs α_2 est bloquée par le FC et la section entre les laminae IV et V. La carbénosolone et l'inhibition pharmacologique des récepteurs du glutamate et de l'ATP bloquent également cet effet.

Nous spéculons que les récepteurs α_2 sont exprimés par les astrocytes. L'information des laminae profondes peut parvenir aux neurones enregistrés dans les laminae III-IV par un intermédiaire neuronal (hypothèse A) ou un réseau glial (hypothèse B) via des neurotransmetteurs et/ou des jonctions communicantes, respectivement.

Les enregistrements dans la lamina V nous ont montré, qu'en plus d'un effet facilitateur tel que celui observé dans les laminae III-IV, dans 33 % des neurones, la clonidine avait un effet inhibiteur sur la fréquence des CPSIs. En vue de la nature inhibitrice du couplage intracellulaire des adrénoccepteurs α_2 , nous nous sommes demandé si les augmentations de fréquence des CPSIs observés dans 36 % des neurones des laminae III-IV et 33 % des neurones de la lamina V pouvaient être dues à un phénomène de désinhibition ayant lieu dans les laminae V ou VI. Un mécanisme de désinhibition similaire a déjà été décrit dans l'hippocampe (Doze et al., 1991).

Lorsque le métabolisme glial est inhibé par le FC, ou que les communications nerveuses sont interrompues entre les laminae IV et V, les effets de la clonidine sur la transmission synaptique inhibitrice disparaissent dans les laminae III-IV. Cela montre que les récepteurs α_2 activés par la clonidine sont situés sous la lamina IV et modulent l'activité de cellules gliales. De plus, des données préliminaires indiquent que dans la lamina V, le traitement au FC bloque uniquement les augmentations de fréquences des CPSIs mais n'a pas d'effet sur les baisses de fréquences des CPSIs induites par la clonidine. L'hypothèse de la désinhibition d'un interneurone inhibiteur suite à l'activation des récepteurs α_2 ne semble donc pas la plus probable pour expliquer l'augmentation de fréquence des CPSIs dans les laminae III-IV, sauf si les cellules gliales sont des intermédiaires obligatoires entre les neurones dans lesquels on observe une diminution de fréquence des CPSIs et les neurones qui présentent une augmentation de fréquence des CPSIs suite à la stimulation des adrénoccepteurs α_2 .

Par ailleurs, nous savons que les astrocytes de la corne dorsale peuvent exprimer le récepteur α_2 (Hösli et Hösli, 1982) et qu'ils sont potentiellement contactés par des fibres noradrénergiques en provenance du LC (Ridet et al., 1993). Des données démontrant clairement et sans ambiguïté, la localisation de récepteurs α_2 fonctionnels directement sur des neurones des laminae profondes, n'ont pas été rapportés dans la littérature. Nous faisons l'hypothèse que les récepteurs α_2 responsables de l'augmentation de fréquence des CPSIs dans un tiers des neurones des laminae III-IV sont exprimés par les astrocytes des laminae V-VI.

L'acheminement de l'information des laminae profondes vers les laminae superficielles et qui résulte en une augmentation de la transmission synaptique

II

III-IV

V

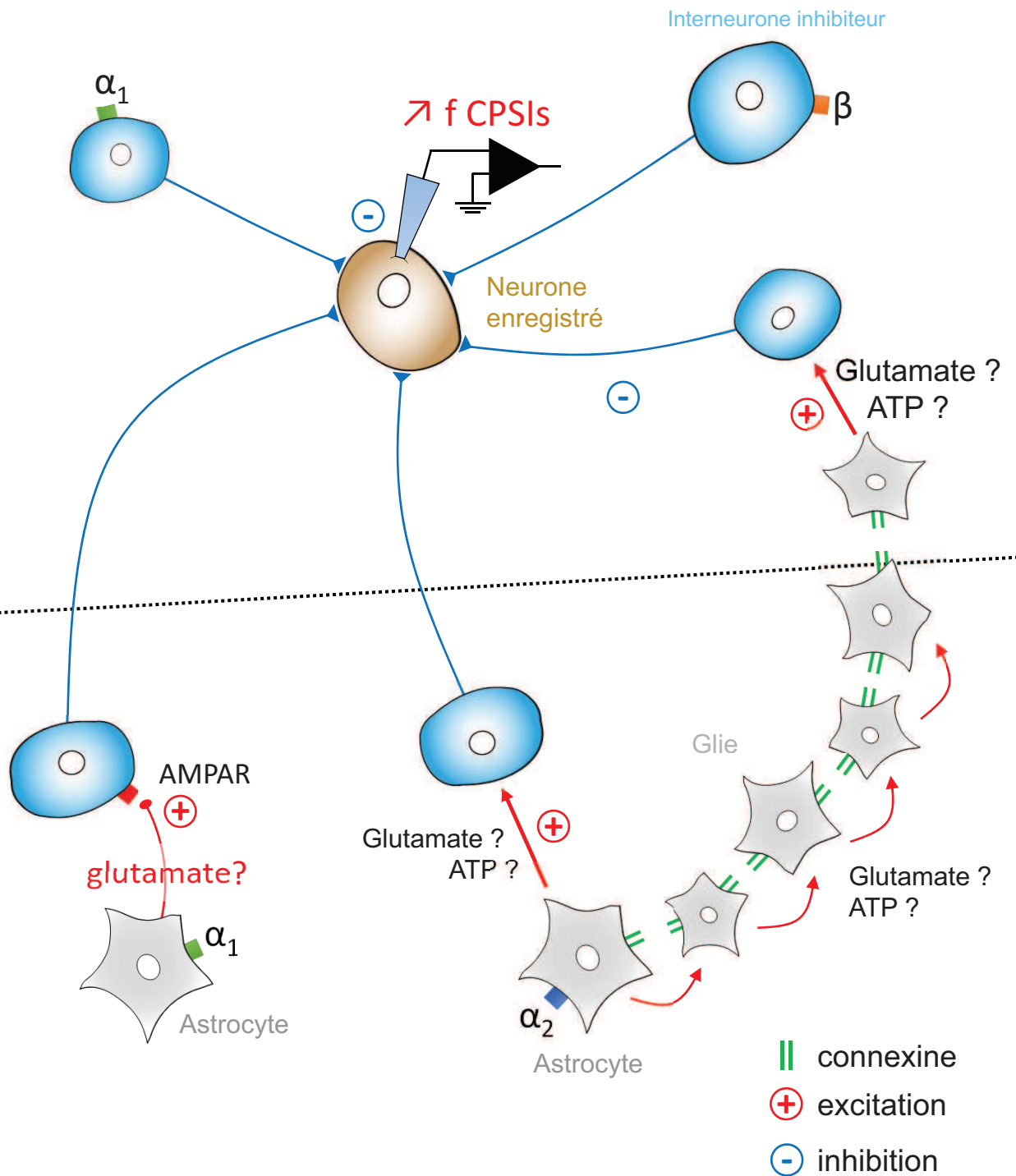


Figure 26. Schéma de synthèse illustrant les réseaux les plus probables impliqués dans les effets de la NA sur la transmission synaptique inhibitrice dans les laminae III-IV
Vue synthétique des figures 22, 24 et 25.

inhibitrice dans les laminae III-IV peut en théorie se faire *par l'intermédiaire d'un neurone ou d'un réseau neuronal* (hypothèse A, Figure 25), ou *via un réseau de cellules gliales* (hypothèse B, Figure 25) impliquant des jonctions communicantes et/ou des gliotransmetteurs (glutamate et/ou ATP).

En considérant les différentes hypothèses retenues dans les paragraphes précédents nous avons représenté dans la figure 26, le réseau nerveux hypothétique modulé par la NA et qui est responsable de l'augmentation de la transmission synaptique inhibitrice dans les laminae III-IV.

Curieusement, le FC semble inhiber de façon ciblée la transmission synaptique inhibitrice dans les laminae III-IV. Cette diminution du recrutement de la transmission synaptique inhibitrice des laminae III-IV par la NA ou la capsaïcine est similaire à l'effet d'une section mécanique entre les laminae IV et V (c.f nos données pour la NA et (Petitjean et al., 2012) pour l'effet de la capsaïcine). Il est tentant de spéculer qu'un réseau glial dans lequel les cellules seraient interconnectées par des canaux jonctionnels et/ou communiqueraient entre elles par des gliotransmetteurs (par exemple l'ATP) pourrait être impliqué dans la communication entre les laminae profondes et plus superficielles de la CDME. Cette hypothèse devra être vérifiée dans des expériences futures (voir perspectives). De manière intéressante, des résultats préliminaires que nous avons obtenus montrent que la carbénoxolone, un bloquant des connexines qui entrent dans la composition des canaux jonctionnels, bloque complètement les effets de la NA et de la capsaïcine sur la transmission synaptique inhibitrice dans les laminae III-IV. Néanmoins, la carbénoxolone peut également bloquer les canaux pannexines qui sont connus pour être impliqués dans la libération d'ATP par les cellules gliales dans le système nerveux central (Garré et al., 2010; Vroman et al., 2014). Quoiqu'il en soit, ces résultats soulignent un rôle important et obligatoire des cellules gliales dans les effets de la NA et de la capsaïcine dans la modulation de la transmission synaptique inhibitrice dans les laminae III-IV.

VIII. Relations entre les systèmes noradrénergiques et dopaminergiques spinaux

Dans la lamina II, l'activation des récepteurs D2 hyperpolarise les neurones par un mécanisme impliquant une conductance potassique (Tamae et al., 2005). La DA inhibe également l'émission de potentiels d'action évoqués par stimulation électrique des fibres afférentes primaires enregistrés dans des neurones de la lamina II (Tamae et al., 2005; García-Ramírez et al., 2014). Ces effets sont similaires à ceux observés avec la clonidine (agoniste des adrénoccepteurs α_2) dans la lamina II (North et Yoshimura, 1984; Sullivan et al., 1987; Gassner et al., 2009).

Les fibres dopaminergiques en provenance de AII projettent dans les mêmes régions (laminae III-IV) de la CDME que les fibres noradrénergiques (Fritschy et al., 1987; Mouchet et al., 1992; Bruinstroop et al., 2012). Nos résultats préliminaires indiquent que dans la CDME la DA appliquée de manière exogène activerait des récepteurs de la NA plutôt que des récepteurs de la DA pour moduler la transmission synaptique inhibitrice dans les laminae III-IV. Dans l'encéphale, il a été montré que la DA peut moduler l'activité neuronale via l'activation de récepteurs de la NA. Ainsi, dans le noyau préoptique médian, la dopamine hyperpolarise une grande partie des neurones via l'activation du récepteurs α_1 , et plus probablement, α_2 adrénergiques (Cornil et al., 2002). Dans l'hypothalamus de souris, la dopamine inhibe les neurones par un mécanisme dépendant des adrénoccepteurs α_2 (Conductier et al., 2011). Les transporteurs de la dopamine (DAT) ne sont exprimés, ni sur les fibres dopaminergiques présentes dans la moelle épinière, ni sur les neurones dopaminergiques de la région AII (Barraud et al., 2010; Koblinger et al., 2014), ce qui devrait faciliter une accumulation de la DA dans le milieu extracellulaire et sa diffusion latérale. Ainsi nos résultats suggèrent que dans le contexte de la modulation de la transmission synaptique inhibitrice dans les laminae III-IV, la DA pourrait activer des récepteurs de la NA.

À l'heure actuelle, il est impossible de savoir si la DA libérée par les fibres dopaminergiques diffuse latéralement (transmission volumique) jusqu'aux adrénoccepteurs voisins ou si la DA est colibérée avec la NA à partir des fibres noradrénergiques.

Conclusion

En conclusion, nous avons apporté des informations nouvelles sur la manière dont les contrôles descendants noradrénergiques contribuent à moduler le réseau nerveux de la CDME pour exercer un rôle analgésique.

Nous avons vu que dans les laminae profondes, les effets de la NA impliquent les adrénocéphes α_1 , α_2 et β . De plus, la NA ne semble moduler que la composante inhibitrice de la transmission synaptique de la CDME et n'a apparemment pas d'effet sur la transmission synaptique excitatrice. L'action principale de la NA semble donc être une facilitation des communications synaptiques inhibitrices au sein de la CDME. De manière intéressante, cette modulation fait appel à des interactions entre la glie et les neurones situés dans les laminae les plus profondes de la corne dorsale (V-VI), un phénomène qui n'a pas été décrit jusqu'à présent dans le cadre des effets de la NA dans la CDME. Par conséquent, cette interaction glie-neurone pourrait également être un élément important dans les effets analgésiques de la NA au niveau spinal.

Nos travaux soulignent également l'importance des interactions inhibitrices entre les laminae profondes et superficielles précédemment décrites dans notre équipe (Petitjean et al., 2012, 2014). En effet, il a été observé que l'activation des afférences primaires nociceptives exprimant le récepteur TRPV1, facilitaient l'augmentation de la transmission inhibitrice notamment glycinergique dans les laminae III-IV et que ce phénomène impliquait un relais essentiel dans la lamina V (Petitjean et al., 2012). De plus, des expériences en cours semblent indiquer que cette remontée d'information inhibitrice TRPV1-dépendante est également bloquée par le traitement au FC et dépendrait donc de la glie. Nous pensons par conséquent qu'il est possible que l'information inhibitrice remontant de la lamina V aux laminae III-IV implique d'une manière plus générale une composante gliale. Les conséquences fonctionnelles de la stimulation des récepteurs TRPV1 et des adrénocéphes sont différentes, la capsaïcine provoquant des états hyperalgésiques mécaniques et thermiques alors que la NA induit une analgésie. Mais dans les deux cas les cellules gliales semblent impliquées. Il pourrait s'agir non pas d'un réseau, mais d'un ensemble de réseaux gliaux sélectivement mis en jeu en fonction des voies d'entrées stimulées (ex : voie neuronale liée à l'activation des afférences TRPV1-positives) ou du type de neuromodulateur concerné. Il reste à

déterminer si ces réseaux peuvent interagir fonctionnellement et, le cas échéant, par quels mécanismes.

Plus généralement, nos résultats confirment le rôle important des laminae profondes de la CDME dans l'intégration et la modulation des informations nociceptives et révèlent un rôle important des cellules gliales dans les communications nerveuses et l'intégration des informations somatosensorielles dans la CDME.

Perspectives

Les résultats que nous avons obtenus apportent de nouveaux éléments en ce qui concerne le mode d'action de la NA sur les réseaux neuronaux et gliaux de la CDME. Cependant, il reste un certain nombre de points à éclaircir. Nous allons ci-dessous en présenter quelques-uns dans le cadre des perspectives qu'offre notre travail.

1. Rôle des récepteurs α_2 gliaux dans la nociception

Pour déterminer si les récepteurs de type α_2 présents sur les astrocytes de la CDME sont impliqués dans la nociception, nous envisageons une approche génétique permettant d'inhiber sélectivement l'expression de récepteurs α_2 dans les astrocytes. Une manière d'obtenir ces animaux knock-down- α_2 consisterait en l'injection d'un vecteur viral codant un siRNA pour un sous-type du récepteur α_2 donné (α_{2A} , α_{2B} ou α_{2C}) sous le promoteur de la GFAP (Glial fibrillary acidic protein). Cette méthode présente l'avantage d'être plus rapide à mettre en place qu'un K.O classique et d'être applicable chez le rat. Une première cible serait les récepteur α_{2A} qui colocalisent avec la GFAP dans la CDME (Xu et al., 2010b). Des tests comportementaux nociceptifs permettraient de savoir dans quelle mesure ils contribuent à l'analgésie noradrénergique spinale en condition basale (douleur aiguë) ou dans des modèles de douleur inflammatoire ou neuropathique (modèle animal de douleur neuropathique : compression du nerf sciatique, ou ligature du nerf sciatique).

2. Transfert d'informations des laminae profondes aux laminae superficielles par un réseau glial

Un autre point concerne le passage d'informations des laminae V-VI vers les laminae III-IV par l'intermédiaire d'un réseau glial. Des résultats préliminaires semblent indiquer l'implication d'une communication au sein d'un réseau glial car la carbénoxolone, qui bloque les canaux jonctionnels, bloque également l'effet de la clonidine sur la transmission synaptique inhibitrice dans les laminae III-IV. Nous sommes en train de mettre en place un poste d'imagerie du calcium sur tranches de moelle épinière qui devrait nous permettre de déterminer si des vagues de calcium intracellulaire se propagent des laminae profondes vers les laminae III-IV au sein du réseau glial suite à l'application locale d'agonistes de la NA dans les laminae profondes. Le cas échéant, nous vérifierons si cette propagation dans le réseau glial est bloquée par la carbénoxolone. Dans ces expériences, la propagation d'information dans les réseaux de neurones sera bloquée en ajoutant de la TTX au milieu extracellulaire afin de n'observer que les communications dans le réseau glial. Les astrocytes pourront être visualisés après une incubation des tranches avec de la sulforhodamine (Kafitz et al., 2008), un marqueur fluorescent qui se fixe sur les astrocytes vivants. Alternativement on pourrait étudier les changements de calcium intracellulaire sélectivement dans les astrocytes par l'intermédiaire d'une sonde calcium encodée génétiquement (Gcamp3) et exprimée sous le promoteur de la GFAP (Shigetomi et al., 2013).

3. Identification des messagers impliqués dans la communication glie-neurone

Nos résultats suggèrent que le glutamate et/ou l'ATP pourraient servir de gliotransmetteurs dans notre système pour assurer la communication glie-neurone suite à la stimulation par les agonistes de la NA. L'utilisation de cocultures de neurones/glie spinales (mises au point et utilisées en routine dans notre laboratoire) nous permettra d'étudier dans des conditions d'approche pharmacologique idéales la libération d'un gliotransmetteur par la glie et son action sur les neurones voisins (éléments détecteurs

du gliotransmetteur libéré). Nous prévoyons également l'utilisation de cellules HEK 293 transfectées avec des récepteurs P2X2 de l'ATP qui nous serviront d'éléments de détection de l'ATP (sniffer cell) de l'ATP.

4. Stimulation optogénétique des fibres noradrénergiques

Une infection du LC avec un virus permettant l'expression de la channelrhodopsine 2 sous le contrôle du promoteur de la dopamine β -hydroxylase permettrait une activation optique des fibres noradrénergiques sur des préparations *in vitro* de moelle épinière de rat. De telles expériences devraient idéalement reproduire les résultats obtenus avec l'application de nortriptyline (bloquant de la recapture de la NA) ou l'application exogène d'agonistes de la NA. L'approche optogénétique nous permettrait également de mieux caractériser la transmission noradrénergique en enregistrant et en caractérisant pharmacologiquement les variations de potentiel de membrane (PPSE, PPSI) induits par la stimulation optogénétique des fibres noradrénergiques dans des neurones ou des cellules gliales de la CDME enregistrées en configuration cellule entière de la technique du patch-clamp.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abhold RH, Bowker RM (1990) Descending modulation of dorsal horn biogenic amines as determined by in vivo dialysis. *Neurosci Lett* 108:231-236.
- Ahmadi S, Lippross S, Neuhuber WL, Zeilhofer HU (2002) PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. *Nat Neurosci* 5:34-40.
- Al Ghamdi KS, Polgár E, Todd AJ (2009) Soma size distinguishes projection neurons from neurokinin 1 receptor-expressing interneurons in lamina I of the rat lumbar spinal dorsal horn. *Neuroscience* 164:1794-1804.
- Al-Khater KM, Kerr R, Todd AJ (2008) A quantitative study of spinothalamic neurons in laminae I, III, and IV in lumbar and cervical segments of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 511:1-18.
- Alvarez FJ, Fyffe RE (2000) Nociceptors for the 21st century. *Curr Rev Pain* 4:451-458.
- Aoki C, Go CG, Venkatesan C, Kurose H (1994) Perikaryal and synaptic localization of alpha 2A-adrenergic receptor-like immunoreactivity. *Brain Res* 650:181-204.
- Aoki C, Venkatesan C, Go CG, Forman R, Kurose H (1998) Cellular and subcellular sites for noradrenergic action in the monkey dorsolateral prefrontal cortex as revealed by the immunocytochemical localization of noradrenergic receptors and axons. *Cereb Cortex* 8:269-277.
- Aoyama R, Okada Y, Yokota S, Yasui YY, Fukuda K, Shinozaki Y, Yoshida H, Nakamura M, Chiba K, Yasui YY, Kato F, Toyama Y (2011) Spatiotemporal and anatomical analyses of P2X receptor-mediated neuronal and glial processing of sensory signals in the rat dorsal horn. *Pain* 152:2085-2097.
- Aran S, Proudfit HK (1990) Antinociceptive interactions between intrathecally administered alpha noradrenergic agonists and 5'-N-ethylcarboxamide adenosine. *Brain Res* 519:287-293.
- Asano T, Dohi S, Ohta S, Shimonaka H, Iida H (2000) Antinociception by epidural and systemic alpha(2)-adrenoceptor agonists and their binding affinity in rat spinal cord and brain. *Anesth Analg* 90:400-407.
- Averill S, McMahon SB, Clary DO, Reichardt LF, Priestley J V (1995) Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons. *Eur J Neurosci* 7:1484-1494.
- Baba H, Goldstein P a, Okamoto M, Kohno T, Ataka T, Yoshimura M, Shimoji K (2000a) Norepinephrine facilitates inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord (part 2): effects on somatodendritic sites of GABAergic neurons. *Anesthesiology* 92:485-492.
- Baba H, Shimoji K, Yoshimura M (2000b) Norepinephrine facilitates inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord (part 1): effects on axon terminals of GABAergic and glycinergic neurons. *Anesthesiology* 92:473-484.
- Barasi S, Duggal KN (1985) The effect of local and systemic application of dopaminergic agents on tail flick latency in the rat. *Eur J Pharmacol* 117:287-294.

- Barber RP, Vaughn JE, Roberts E (1982) The cytoarchitecture of gabaergic neurons in rat spinal cord. *Brain Res* 238:305-328.
- Barraud Q, Obeid I, Aubert I, Barrière G, Contamin H, McGuire S, Ravenscroft P, Porras G, Tison F, Bezard E, Ghorayeb I (2010) Neuroanatomical study of the AII diencephalospinal pathway in the non-human primate. *PLoS One* 5:e13306.
- Barrot M (2012) Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience* 211:39-50.
- Barrot M, Yalcin I, Choucair-Jaafar N, Benbouzid M, Freund-Mercier M-J (2009) From antidepressant drugs to beta-mimetics: preclinical insights on potential new treatments for neuropathic pain. *Recent Pat CNS Drug Discov* 4:182-189.
- Belcher G, Ryall RW, Schaffner R (1978) The differential effects of 5-hydroxytryptamine, noradrenaline and raphe stimulation on nociceptive and non-nociceptive dorsal horn interneurons in the cat. *Brain Res* 151:307-321.
- Bernard J-F, Villanueva L (2009) Architecture fonctionnelles des systèmes nociceptifs. In: Douleurs : physiologie, physiopathologie et pharmacologie, Arnette., pp 1-158. Rueil-Malmaison: Arnette.
- Bortorelli R, Fredduzzi S, Tarozzo G, Campanella M, Grundy R, Beltramo M, Reggiani A (2005) Endogenous and exogenous melanocortin antagonists induce anti-allodynic effects in a model of rat neuropathic pain. *Behav Brain Res* 157:55-62.
- Besson JM, Guilbaud G, Abdelmoumene M, Chaouch A (1982) [Physiology of nociception]. *J Physiol (Paris)* 78:7-107.
- Besson J-M, Guilbaud G, Ollat H (1995) Forebrain Areas Involved in Pain Processing. Montrouge: John Libbey Eurotext.
- Besson JM, Oliveras JL, Chaouch A, Rivot JP (1981) Role of the raphe nuclei in stimulation producing analgesia. *Adv Exp Med Biol* 133:153-176.
- Biella G, Riva L, Sotgiu ML (1997) Interaction between neurons in different laminae of the dorsal horn of the spinal cord. A correlation study in normal and neuropathic rats. *Eur J Neurosci* 9:1017-1025.
- Birch PJ, Fillenz M (1985) The regulation of noradrenaline synthesis in central nerve terminals by autoreceptors and heteroreceptors in rat. *Neurosci Lett* 59:197-202.
- Bohren Y, Tessier L-H, Megat S, Petitjean H, Hugel S, Daniel D, Kremer M, Fournel S, Hein L, Schlichter R, Freund-Mercier M-J, Yalcin I, Barrot M (2013) Antidepressants suppress neuropathic pain by a peripheral β 2-adrenoceptor mediated anti-TNF α mechanism. *Neurobiol Dis* 60:39-50.
- Bowker RM, Westlund KN, Sullivan MC, Wilber JF, Coulter JD (1983) Descending serotonergic, peptidergic and cholinergic pathways from the raphe nuclei: A multiple transmitter complex. *Brain Res* 288:33-48.
- Bowsher D (1976) Role of the reticular formation in responses to noxious stimulation. *Pain* 2:361-378.
- Braz J, Solorzano C, Wang X, Basbaum AI (2014) Transmitting Pain and Itch Messages: A Contemporary View of the Spinal Cord Circuits that Generate Gate Control. *Neuron* 82:522-536.
- Braz JM, Nassar MA, Wood JN, Basbaum AI (2005) Parallel « pain » pathways arise from subpopulations of primary afferent nociceptor. *Neuron* 47:787-793.

- Breton JD, Poisbeau P, Darbon P (2009) Antinociceptive action of oxytocin involves inhibition of potassium channel currents in lamina II neurons of the rat spinal cord. *Mol Pain* 5:63.
- Breton J-D, Veinante P, Uhl-Bronner S, Vergnano AM, Freund-Mercier MJ, Schlichter R, Poisbeau P (2008) Oxytocin-induced antinociception in the spinal cord is mediated by a subpopulation of glutamatergic neurons in lamina I-II which amplify GABAergic inhibition. *Mol Pain* 4:19.
- Brosda J, Jantschak F, Pertz HH (2014) α 2-Adrenoceptors are targets for antipsychotic drugs. *Psychopharmacology (Berl)* 231:801-812.
- Brown AG (1982) The dorsal horn of the spinal cord. *Q J Exp Physiol*:193-212.
- Bruinstroop E, Cano G, Vanderhorst VGJM, Cavalcante JC, Wirth J, Sena-Esteves M, Saper CB (2012) Spinal projections of the A5, A6 (locus coeruleus), and A7 noradrenergic cell groups in rats. *J Comp Neurol* 520:1985-2001.
- Budai D, Harasawa I, Fields HL (1998) Midbrain periaqueductal gray (PAG) inhibits nociceptive inputs to sacral dorsal horn nociceptive neurons through alpha2-adrenergic receptors. *J Neurophysiol* 80:2244-2254.
- Burnstock G (1995) Noradrenaline and ATP: cotransmitters and neuromodulators. *J Physiol Pharmacol* 46:365-384.
- Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR, Trendelenburg U (1994) International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev* 46:121-136.
- Cavanaugh DJ, Lee H, Lo L, Shields SD, Zylka MJ, Basbaum AI, Anderson DJ (2009) Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:9075-9080.
- Cechetto DF, Saper CB (1988) Neurochemical organization of the hypothalamic projection to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 272:579-604.
- Chéry 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* 19:7342-7355.
- Choucair-Jaafar N, Salvat E, Freund-Mercier M-J, Barrot M (2014) The antiallodynic action of nortriptyline and terbutaline is mediated by β (2) adrenoceptors and δ opioid receptors in the ob/ob model of diabetic polyneuropathy. *Brain Res* 1546:18-26.
- Chvátal A, Anderová M, Syková E (2004) Analysis of K⁺ accumulation reveals privileged extracellular region in the vicinity of glial cells in situ. *J Neurosci Res* 78:668-682.
- Chvátal A, Anderová M, Ziak D, Syková E (1999) Glial depolarization evokes a larger potassium accumulation around oligodendrocytes than around astrocytes in gray matter of rat spinal cord slices. *J Neurosci Res* 56:493-505.
- Coggeshall R, Carlton S (1997) Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. *Brain Res Rev* 24:28-66.
- Conductier G, Nahon J-L, Guyon A (2011) Dopamine depresses melanin concentrating hormone neuronal activity through multiple effects on α 2-noradrenergic, D1 and D2-like dopaminergic receptors. *Neuroscience* 178:89-100.

- Cornil C a, Balthazart J, Motte P, Massotte L, Seutin V (2002) Dopamine activates noradrenergic receptors in the preoptic area. *J Neurosci* 22:9320-9330.
- Craig AD (1992) Spinal and trigeminal lamina I input to the locus coeruleus anterogradely labeled with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) in the cat and the monkey. *Brain Res* 584:325-328.
- D'Mello R, Dickenson a H (2008) Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth* 101:8-16.
- Dahlström A, Fuxe K (1964a) Evidence for the Existence of Monoamine-Containing Neurons in the Central Nervous System. I. Demonstration of Monoamines in the Cell Bodies of Brain Stem Neurons. *Acta Physiol Scand Suppl:SUPPL 232:1-55*.
- Dahlström A, Fuxe K (1964b) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20:398-399.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.
- Daniels M, Brown DR (2001) Astrocytes regulate N-methyl-D-aspartate receptor subunit composition increasing neuronal sensitivity to excitotoxicity. *J Biol Chem* 276:22446-22452.
- Day HE, Campeau S, Watson SJ, Akil H (1997) Distribution of alpha 1a-, alpha 1b- and alpha 1d-adrenergic receptor mRNA in the rat brain and spinal cord. *J Chem Neuroanat* 13:115-139.
- Ding F, O'Donnell J, Thrane AS, Zeppenfeld D, Kang H, Xie L, Wang F, Nedergaard M (2013) α 1-Adrenergic receptors mediate coordinated Ca²⁺ signaling of cortical astrocytes in awake, behaving mice. *Cell Calcium* 54:387-394.
- Djoughri L, Lawson SN (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* 46:131-145.
- Do KQ, Benz B, Sorg O, Pellerin L, Magistretti PJ (1997) beta-Adrenergic stimulation promotes homocysteic acid release from astrocyte cultures: evidence for a role of astrocytes in the modulation of synaptic transmission. *J Neurochem* 68:2386-2394.
- Doze V a, Cohen G a, Madison D V (1991) Synaptic localization of adrenergic disinhibition in the rat hippocampus. *Neuron* 6:889-900.
- Du T, Li B, Li H, Li M, Hertz L, Peng L (2010) Signaling pathways of isoproterenol-induced ERK1/2 phosphorylation in primary cultures of astrocytes are concentration-dependent. *J Neurochem* 115:1007-1023.
- Dubois A, Savasta M, Curet O, Scatton B (1986) Autoradiographic distribution of the D1 agonist [3H]SKF 38393, in the rat brain and spinal cord. Comparison with the distribution of D2 dopamine receptors. *Neuroscience* 19:125-137.
- Eide PK, Hole K (1993) The role of 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor subtypes and plasticity in the 5-HT systems in the regulation of nociceptive sensitivity. *Cephalalgia* 13:75-85.
- Engberg I, Ryall RW (1966) The inhibitory action of noradrenaline and other monoamines on spinal neurones. *J Physiol* 185:298-322.

- Fagerholm V, Rokka J, Nyman L, Sallinen J, Tiihonen J, Tupala E, Haaparanta M, Hietala J (2008) Autoradiographic characterization of alpha(2C)-adrenoceptors in the human striatum. *Synapse* 62:508-515.
- Fairbanks C a, Stone LS, Wilcox GL (2009) Pharmacological profiles of alpha 2 adrenergic receptor agonists identified using genetically altered mice and isobolographic analysis. *Pharmacol Ther* 123:224-238.
- Feng Y-P, Yang K, Li Y-Q (2002) Norepinephrine depresses the capsaicin-evoked miniature excitatory postsynaptic currents in substantia gelatinosa of the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 322:99-102.
- Fields H (2004) State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci* 5:565-575.
- Fleetwood-Walker SM, Mitchell R, Hope PJ, Molony V, Iggo A (1985) An alpha 2 receptor mediates the selective inhibition by noradrenaline of nociceptive responses of identified dorsal horn neurones. *Brain Res* 334:243-254.
- Fonnum F, Johnsen A, Hassel B (1997) Use of fluorocitrate and fluoroacetate in the study of brain metabolism. *Glia* 21:106-113.
- Fritschy J, Lyons W, Mullen C (1987) Distribution of locus coeruleus axons in the rat spinal cord: a combined anterograde transport and immunohistochemical study. *Brain Res* 437:176-180.
- Fritschy JM, Grzanna R (1989) Immunohistochemical analysis of the neurotoxic effects of DSP-4 identifies two populations of noradrenergic axon terminals. *Neuroscience* 30:181-197.
- Fujita H, Tanaka J, Maeda N, Sakanaka M (1998) Adrenergic agonists suppress the proliferation of microglia through beta 2-adrenergic receptor. *Neurosci Lett* 242:37-40.
- Funai Y, Pickering AE, Uta D, Nishikawa K, Mori T, Asada A, Imoto K, Furue H (2014) Systemic dexmedetomidine augments inhibitory synaptic transmission in the superficial dorsal horn through activation of descending noradrenergic control: an in vivo patch-clamp analysis of analgesic mechanisms. *Pain* 155:617-628.
- Furuyama T, Kiyama H, Sato K, Park HT, Maeno H, Takagi H, Tohyama M (1993) Region-specific expression of subunits of ionotropic glutamate receptors (AMPA-type, KA-type and NMDA receptors) in the rat spinal cord with special reference to nociception. *Brain Res Mol Brain Res* 18:141-151.
- Gadea A, López-Colomé AM (2001a) Glial transporters for glutamate, glycine and GABA I. Glutamate transporters. *J Neurosci Res* 63:453-460.
- Gadea A, López-Colomé AM (2001b) Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA: II. GABA transporters. *J Neurosci Res* 63:461-468.
- Gadea A, López-Colomé AM (2001c) Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA III. Glycine transporters. *J Neurosci Res* 64:218-222.
- García-Ramírez DL, Calvo JR, Hochman S, Quevedo JN (2014) Serotonin, dopamine and noradrenaline adjust actions of myelinated afferents via modulation of presynaptic inhibition in the mouse spinal cord. *PLoS One* 9:e89999.

- Garré JM, Retamal MA, Cassina P, Barbeito L, Bukauskas FF, Sáez JC, Bennett MVL, Abudara V (2010) FGF-1 induces ATP release from spinal astrocytes in culture and opens pannexin and connexin hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:22659-22664.
- Gassner M, Ruscheweyh R, Sandkühler J (2009) Direct excitation of spinal GABAergic interneurons by noradrenaline. *Pain* 145:204-210.
- Gobel S (1975) Neurons with two axons in the substantia gelatinosa layer of the spinal trigeminal nucleus of the adult cat. *Brain Res* 88:333-338.
- Gobel S (1978) Golgi studies of the neurons in layer II of the dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis). *J Comp Neurol* 180:395-413.
- Gordon GRJ, Baimoukhametova D V, Hewitt SA, Rajapaksha WRAKJS, Fisher TE, Bains JS (2005) Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. *Nat Neurosci* 8:1078-1086.
- Gordon GRJ, Iremonger KJ, Kantevari S, Ellis-Davies GCR, MacVicar B a, Bains JS (2009) Astrocyte-mediated distributed plasticity at hypothalamic glutamate synapses. *Neuron* 64:391-403.
- Gotoh Y, Andoh T, Kuraishi Y (2011) Noradrenergic regulation of itch transmission in the spinal cord mediated by α -adrenoceptors. *Neuropharmacology* 61:825-831.
- Granum SL (1986) The spinothalamic system of the rat. I. Locations of cells of origin. *J Comp Neurol* 247:159-180.
- Gu Q (2002) Neuromodulatory transmitter systems in the cortex and their role in cortical plasticity. *Neuroscience* 111:815-835.
- Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett M V, Charles AC, Kater SB (1999) ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci* 19:520-528.
- Hagihira S, Senba E, Yoshida S, Tohyama M, Yoshiya I (1990) Fine structure of noradrenergic terminals and their synapses in the rat spinal dorsal horn: an immunohistochemical study. *Brain Res* 526:73-80.
- Han P, Whelan PJ (2009) Modulation of AMPA currents by D(1)-like but not D(2)-like receptors in spinal motoneurons. *Neuroscience* 158:1699-1707.
- Han ZS, Zhang ET, Craig AD (1998) Nociceptive and thermoreceptive lamina I neurons are anatomically distinct. *Nat Neurosci* 1:218-225.
- Hassel B, Paulsen RE, Johnsen A, Fonnum F (1992) Selective inhibition of glial cell metabolism in vivo by fluorocitrate. *Brain Res* 576:120-124.
- Hassinger TD, Guthrie PB, Atkinson PB, Bennett M V, Kater SB (1996) An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13268-13273.
- Hayashida K-I, Peters CM, Gutierrez S, Eisenach JC (2012) Depletion of endogenous noradrenaline does not prevent spinal cord plasticity following peripheral nerve injury. *J Pain* 13:49-57.
- Headley PM, Duggan AW, Griersmith BT (1978) Selective reduction by noradrenaline and 5-hydroxytryptamine of nociceptive responses of cat dorsal horn neurones. *Brain Res* 145:185-189.

- Heneka MT, Nadrigny F, Regen T, Martinez-Hernandez A, Dumitrescu-Ozimek L, Terwel D, Jardanhazi-Kurutz D, Walter J, Kirchhoff F, Hanisch U-K, Kummer MP (2010) Locus ceruleus controls Alzheimer's disease pathology by modulating microglial functions through norepinephrine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:6058-6063.
- Hertz L, Chen Y, Gibbs ME, Zang P, Peng L (2004) Astrocytic adrenoceptors: a major drug target in neurological and psychiatric disorders? *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3:239-267.
- Hertz L, Lovatt D, Goldman S a, Nedergaard M (2010) Adrenoceptors in brain: cellular gene expression and effects on astrocytic metabolism and $[Ca^{2+}]_i$. *Neurochem Int* 57:411-420.
- Hertz L, Xu J, Song D, Du T, Li B, Yan E, Peng L (2014) Astrocytic glycogenolysis: mechanisms and functions. *Metab Brain Dis* 30:317-333.
- Hertz L, Xu J, Song D, Du T, Yan E, Peng L (2013) Brain glycogenolysis, adrenoceptors, pyruvate carboxylase, Na^{+} , K^{+} -ATPase and Marie E. Gibbs' pioneering learning studies. *Front Integr Neurosci* 7:20.
- Hickey L, Li Y, Fyson SJ, Watson TC, Perrins R, Hewinson J, Teschemacher AG, Furue H, Lumb BM, Pickering AE (2014) Optoactivation of locus ceruleus neurons evokes bidirectional changes in thermal nociception in rats. *J Neurosci* 34:4148-4160.
- Hirst WD, Cheung NY, Rattray M, Price GW, Wilkin GP (1998) Cultured astrocytes express messenger RNA for multiple serotonin receptor subtypes, without functional coupling of 5-HT₁ receptor subtypes to adenylyl cyclase. *Brain Res Mol Brain Res* 61:90-99.
- Hitoto T, Tsuruoka M, Hiruma Y, Matsui Y (1998) A delta afferent fiber stimulation activates descending noradrenergic system from the locus coeruleus. *Neurochem Res* 23:1461-1465.
- Hoffmann C, Leitz MR, Oberdorf-Maass S, Lohse MJ, Klotz K-N (2004) Comparative pharmacology of human beta-adrenergic receptor subtypes--characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369:151-159.
- Hösli E, Hösli L (1982) Evidence for the existence of α - and β -adrenoceptors on neurones and glial cells of cultured rat central nervous system—an autoradiographic study. *Neuroscience* 7:2873-2881.
- Hösli L, Hösli E, Käser H (1993) Colocalization of cholinergic, adrenergic and peptidergic receptors on astrocytes. *Neuroreport* 4:679-682.
- Hossaini M, French PJ, Holstege JC (2007) Distribution of glycinergic neuronal somata in the rat spinal cord. *Brain Res* 1142:61-69.
- Howe JR, Zieglgänsberger W (1987) Responses of rat dorsal horn neurons to natural stimulation and to iontophoretically applied norepinephrine. *J Comp Neurol* 255:1-17.
- Huck S, Grass F, Hörtnagl H (1984) The glutamate analogue alpha-amino adipic acid is taken up by astrocytes before exerting its gliotoxic effect in vitro. *J Neurosci* 4:2650-2657.
- Hunter JC, Fontana DJ, Hedley LR, Jasper JR, Lewis R, Link RE, Secchi R, Sutton J, Eglen RM (1997) Assessment of the role of alpha₂-adrenoceptor subtypes in the antinociceptive, sedative and hypothermic action of dexmedetomidine in transgenic mice. *Br J Pharmacol* 122:1339-1344.

- Inquimbert P, Rodeau J-L, Schlichter R (2007) Differential contribution of GABAergic and glycinergic components to inhibitory synaptic transmission in lamina II and laminae III-IV of the young rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 26:2940-2949.
- Inquimbert P, Rodeau J-L, Schlichter R (2008) Regional differences in the decay kinetics of GABA(A) receptor-mediated miniature IPSCs in the dorsal horn of the rat spinal cord are determined by mitochondrial transport of cholesterol. *J Neurosci* 28:3427-3437.
- Ishii H, Kohno T, Yamakura T, Ikoma M, Baba H (2008) Action of dexmedetomidine on the substantia gelatinosa neurons of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 27:3182-3190.
- Jalonen TO, Margraf RR, Wielt DB, Charniga CJ, Linne ML, Kimelberg HK (1997) Serotonin induces inward potassium and calcium currents in rat cortical astrocytes. *Brain Res* 758:69-82.
- Jasper JR, Lesnick JD, Chang LK, Yamanishi SS, Chang TK, Hsu SA, Daunt DA, Bonhaus DW, Eglen RM (1998) Ligand efficacy and potency at recombinant alpha2 adrenergic receptors: agonist-mediated [35S]GTPgammaS binding. *Biochem Pharmacol* 55:1035-1043.
- Jendelová P, Syková E (1991) Role of glia in K⁺ and pH homeostasis in the neonatal rat spinal cord. *Glia* 4:56-63.
- Jensen TS, Yaksh TL (1984) Effects of an intrathecal dopamine agonist, apomorphine, on thermal and chemical evoked noxious responses in rats. *Brain Res* 296:285-293.
- Jo YH, Schlichter R (1999) Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat Neurosci* 2:241-245.
- Jones BE, Yang T-Z (1985) The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. *J Comp Neurol* 242:56-92.
- Jones SL (1992) Noradrenergic modulation of noxious heat-evoked fos-like immunoreactivity in the dorsal horn of the rat sacral spinal cord. *J Comp Neurol* 325:435-445.
- Kafitz KW, Meier SD, Stephan J, Rose CR (2008) Developmental profile and properties of sulforhodamine 101-labeled glial cells in acute brain slices of rat hippocampus. *J Neurosci Methods* 169:84-92.
- Kanui TI, Tjølsen A, Lund A, Mjøllem-Joly N, Hole K (1993) Antinociceptive effects of intrathecal administration of α -adrenoceptor antagonists and clonidine in the formalin test in the mouse. *Neuropharmacology* 32:367-371.
- Kato G, Kawasaki Y, Koga K, Uta D, Kosugi M, Yasaka T, Yoshimura M, Ji R-R, Strassman AM (2009) Organization of intralaminar and translaminar neuronal connectivity in the superficial spinal dorsal horn. *J Neurosci* 29:5088-5099.
- Kato G, Kosugi M, Mizuno M, Strassman AM (2013) Three-dimensional organization of local excitatory and inhibitory inputs to neurons in laminae III-IV of the spinal dorsal horn. *J Physiol* 591:5645-5660.
- Kato G, Yasaka T, Katafuchi T, Furue H, Mizuno M, Iwamoto Y, Yoshimura M (2006) Direct GABAergic and glycinergic inhibition of the substantia gelatinosa from the rostral ventromedial medulla revealed by in vivo patch-clamp analysis in rats. *J Neurosci* 26:1787-1794.

- Kawamoto K, Otsuguro K, Ishizuka M, Ito S (2012) Inhibitory effects of dopamine on spinal synaptic transmission via dopamine D1-like receptors in neonatal rats. *Br J Pharmacol* 166:788-800.
- Keay KA, Feil K, Gordon BD, Herbert H, Bandler R (1997) Spinal afferents to functionally distinct periaqueductal gray columns in the rat: an anterograde and retrograde tracing study. *J Comp Neurol* 385:207-229.
- Keller AF, Coull JA, Chery N, Poisbeau P, De Koninck Y (2001) Region-specific developmental specialization of GABA-glycine cosynapses in laminae I-II of the rat spinal dorsal horn. *J Neurosci* 21:7871-7880.
- Kemplay SK, Webster KE (1986) A qualitative and quantitative analysis of the distributions of cells in the spinal cord and spinomedullary junction projecting to the thalamus of the rat. *Neuroscience* 17:769-789.
- Kerr FA, Szabadi E (1985) Comparison of the effects of chronic administration of ciclesonid and desipramine on pupillary responses to tyramine, methoxamine and pilocarpine in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 19:639-647.
- Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A (2011) Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91:461-553.
- Kettenmann H, Ransom BR (1995) *Neuroglia*. New-York: Oxford University Press.
- Koblinger K, Füzesi T, Ejdrygiewicz J, Krajacic A, Bains JS, Whelan PJ (2014) Characterization of All Neurons Projecting to the Spinal Cord of Mice. *PLoS One* 9:e109636.
- Koob GF, Koob GF (2008) A role for brain stress systems in addiction. *Neuron* 59:11-34.
- Kopach O, Voitenko N (2013) Extrasynaptic AMPA receptors in the dorsal horn: Evidence and functional significance. *Brain Res Bull* 93:47-56.
- Kulik a, Haentzsch a, Lückermann M, Reichelt W, Ballanyi K (1999) Neuron-glia signaling via alpha(1) adrenoceptor-mediated Ca(2+) release in Bergmann glial cells in situ. *J Neurosci* 19:8401-8408.
- Lang B, Li H, Kang JF, Li YQ (2003) Alpha-2 adrenoceptor mediating the facilitatory effect of norepinephrine on the glycine response in the spinal dorsal horn neuron of the rat. *Life Sci* 73:893-905.
- Lenz FA, Casey KL, Jones EG, Willis WD (2010) *The Human Pain System: Experimental and Clinical Perspectives*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Levant B, McCarson KE (2001) D(3) dopamine receptors in rat spinal cord: implications for sensory and motor function. *Neurosci Lett* 303:9-12.
- Lewis DI, Coote JH (1990) Excitation and inhibition of rat sympathetic preganglionic neurones by catecholamines. *Brain Res* 530:229-234.
- Li YQ, Li H, Kaneko T, Mizuno N (1999) Substantia gelatinosa neurons in the medullary dorsal horn: An intracellular labeling study in the rat. *J Comp Neurol* 411:399-412.
- Light AR, Kavookjian AM (1988) Morphology and ultrastructure of physiologically identified substantia gelatinosa (lamina II) neurons with axons that terminate in deeper dorsal horn laminae (III-V). *J Comp Neurol* 267:172-189.

- Light AR, Perl ER (1979) Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers. *J Comp Neurol* 186:133-150.
- Lima D, Coimbra A (1986) A Golgi study of the neuronal population of the marginal zone (lamina I) of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 244:53-71.
- Liu W, Alreja M (1998) Norepinephrine inhibits neurons of the intermediate subnucleus of the lateral septum via alpha2-adrenoceptors. *Brain Res* 806:36-54.
- Lu Y, Perl ER (2007) Selective action of noradrenaline and serotonin on neurones of the spinal superficial dorsal horn in the rat. *J Physiol* 582:127-136.
- Luque JM, Nelson N, Richards JG (1995) Cellular expression of glycine transporter 2 messenger RNA exclusively in rat hindbrain and spinal cord. *Neuroscience* 64:525-535.
- Lynn B (1984) Effect of neonatal treatment with capsaicin on the numbers and properties of cutaneous afferent units from the hairy skin of the rat. *Brain Res* 322:255-260.
- Lyons WE, Fritschy JM, Grzanna R (1989) The noradrenergic neurotoxin DSP-4 eliminates the coeruleospinal projection but spares projections of the A5 and A7 groups to the ventral horn of the rat spinal cord. *J Neurosci* 9:1481-1489.
- Ma W, Eisenach JC (2003) Chronic constriction injury of sciatic nerve induces the up-regulation of descending inhibitory noradrenergic innervation to the lumbar dorsal horn of mice. *Brain Res* 970:110-118.
- Mackie M, Hughes D., Maxwell D., Tillakaratne NJ., Todd A. (2003) Distribution and colocalisation of glutamate decarboxylase isoforms in the rat spinal cord. *Neuroscience* 119:461-472.
- Malmberg AB, Hedley LR, Jasper JR, Hunter JC, Basbaum AI (2001) Contribution of alpha(2) receptor subtypes to nerve injury-induced pain and its regulation by dexmedetomidine. *Br J Pharmacol* 132:1827-1836.
- Martín ED, Fernández M, Perea G, Pascual O, Haydon PG, Araque A, Ceña V (2007) Adenosine released by astrocytes contributes to hypoxia-induced modulation of synaptic transmission. *Glia* 55:36-45.
- Maruo K, Yamamoto H, Yamamoto S, Nagata T, Fujikawa H, Kanno T, Yaguchi T, Maruo S, Yoshiya S, Nishizaki T (2006) Modulation of P2X receptors via adrenergic pathways in rat dorsal root ganglion neurons after sciatic nerve injury. *Pain* 120:106-112.
- Maxwell DJ, Belle MD, Cheunsuang O, Stewart A, Morris R (2007) Morphology of inhibitory and excitatory interneurons in superficial laminae of the rat dorsal horn. *J Physiol* 584:521-533.
- McLachlan EM, Jänig W, Devor M, Michaelis M (1993) Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia. *Nature* 363:543-546.
- Men D, Matsui a, Matsui Y (1996) Somatosensory afferent inputs release 5-HT and NA from the spinal cord. *Neurochem Res* 21:1515-1519.
- Millan MJ (1999) The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57:1-164.
- Millan MJ (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66:355-474.

- Millan MJ, Seguin L, Honoré P, Girardon S, Bervoets K (1996) Pro- and antinociceptive actions of serotonin (5-HT)_{1A} agonists and antagonists in rodents: relationship to algometric paradigm. *Behav Brain Res* 73:69-77.
- Milligan ED, Twining C, Chacur M, Biedenkapp J, O'Connor K, Poole S, Tracey K, Martin D, Maier SF, Watkins LR (2003) Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *J Neurosci* 23:1026-1040.
- Milne RJ, Gamble GD (1990) Behavioural modification of bulbospinal serotonergic inhibition and morphine analgesia. *Brain Res* 521:167-174.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:189-225.
- Mizukami T (2004) Immunocytochemical localization of beta₂-adrenergic receptors in the rat spinal cord and their spatial relationships to tyrosine hydroxylase-immunoreactive terminals. *Kurume Med J*:175-183.
- Mori K, Ozaki E, Zhang B, Yang L, Yokoyama A, Takeda I, Maeda N, Sakanaka M, Tanaka J (2002) Effects of norepinephrine on rat cultured microglial cells that express α ₁, α ₂, β ₁ and β ₂ adrenergic receptors. *Neuropharmacology* 43:1026-1034.
- Morley MJ, Bradshaw CM, Szabadi E (1991) Effects of clonidine and yohimbine on the pupillary light reflex and carbachol-evoked sweating in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 31:99-101.
- Mouchet P, Manier M, Feuerstein C (1992) Immunohistochemical study of the catecholaminergic innervation of the spinal cord of the rat using specific antibodies against dopamine and noradrenaline. *J Chem Neuroanat* 5:427-440.
- Mungenast AE (2011) Diacylglycerol signaling underlies astrocytic ATP release. *Neural Plast* 2011:537659.
- Nabekura J, Xu TL, Rhee JS, Li JS, Akaike N (1999) Alpha₂-adrenoceptor-mediated enhancement of glycine response in rat sacral dorsal commissural neurons. *Neuroscience* 89:29-41.
- Naderi S, Türe U, Pait TG (2004) History of the spinal cord localization. *Neurosurg Focus* 16:E15.
- Nakanishi H, Kawachi A, Okada M, Fujiwara M, Yamamoto K (1996) Protective effect of MK-801 on the anoxia-aglycemia induced damage in the fluorocitrate-treated hippocampal slice of the rat. *Brain Res* 732:232-236.
- Newman EA (2003) New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci* 26:536-542.
- Nicholas AP, Hökfelt T, Pieribone VA (1996) The distribution and significance of CNS adrenoceptors examined with in situ hybridization. *Trends Pharmacol Sci* 17:245-255.
- Nicholas AP, Pieribone V, Hökfelt T (1993) Distributions of mRNAs for alpha-2 adrenergic receptor subtypes in rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 328:575-594.
- Nicholson R, Dixon a K, Spanswick D, Lee K (2005) Noradrenergic receptor mRNA expression in adult rat superficial dorsal horn and dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* 380:316-321.
- North RA, Yoshimura M (1984) The actions of noradrenaline on neurones of the rat substantia gelatinosa in vitro. *J Physiol* 349:43-55.

- O'Donnell J, Zeppenfeld D, McConnell E, Pena S, Nedergaard M (2012) Norepinephrine: a neuromodulator that boosts the function of multiple cell types to optimize CNS performance. *Neurochem Res* 37:2496-2512.
- Olave M., Maxwell D. (2002) An investigation of neurones that possess the α_2C -adrenergic receptor in the rat dorsal horn. *Neuroscience* 115:31-40.
- Overland AC, Kitto KF, Chabot-Doré A-J, Rothwell PE, Fairbanks C a, Stone LS, Wilcox GL (2009) Protein kinase C mediates the synergistic interaction between agonists acting at alpha2-adrenergic and delta-opioid receptors in spinal cord. *J Neurosci* 29:13264-13273.
- Pan Y-Z, Li D-P, Pan H-L (2002) Inhibition of glutamatergic synaptic input to spinal lamina II(o) neurons by presynaptic alpha(2)-adrenergic receptors. *J Neurophysiol* 87:1938-1947.
- Paris A, Tonner PH (2005) Dexmedetomidine in anaesthesia. *Curr Opin Anaesthesiol* 18:412-418.
- Peltonen JM, Pihlavisto M, Scheinin M (1998) Subtype-specific stimulation of [35S]GTPgammaS binding by recombinant alpha2-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 355:275-279.
- Peng YI, Liu HJ, Fu TC (1993) Involvement of alpha- and beta-adrenoceptors in antinociception at the lumbar spinal level in mice. *Chin J Physiol* 36:177-180.
- Perez D (2006) The adrenergic receptors: in the 21st century (Perez DM, éd). Totowa, New Jersey: Humana Press.
- 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* 40:3189-3201.
- Petitjean H, Rodeau J-L, Schlichter R (2012) Interactions between superficial and deep dorsal horn spinal cord neurons in the processing of nociceptive information. *Eur J Neurosci* 36:3500-3508.
- Petkó M, Antal M (2012) Propriospinal pathways in the dorsal horn (laminae I-IV) of the rat lumbar spinal cord. *Brain Res Bull* 89:41-49.
- Pfeiffer F, Simler R, Grenningloh G, Betz H (1984) Monoclonal antibodies and peptide mapping reveal structural similarities between the subunits of the glycine receptor of rat spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:7224-7227.
- Pihlavisto M, Sjöholm B, Scheinin M, Wurster S (1998) Modulation of agonist binding to recombinant human alpha2-adrenoceptors by sodium ions. *Biochim Biophys Acta* 1448:135-146.
- Poisbeau P, Patte-Mensah C, Keller AF, Barrot M, Breton J-D, 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.
- Polgár E, Durrieux C, Hughes DI, Todd AJ (2013a) A Quantitative Study of Inhibitory Interneurons in Laminae I-III of the Mouse Spinal Dorsal Horn. *PLoS One* 8:e78309.
- Polgár E, Fowler JH, McGill MM, Todd AJ (1999) The types of neuron which contain protein kinase C gamma in rat spinal cord. *Brain Res* 833:71-80.

- Polgár E, Sardella TCP, Tiong SYX, Locke S, Watanabe M, Todd AJ (2013b) Functional differences between neurochemically defined populations of inhibitory interneurons in the rat spinal dorsal horn. *Pain* 154:2606-2615.
- Pougnat J-T, Toulme E, Martinez A, Choquet D, Hosy E, Boué-Grabot E (2014) ATP P2X receptors downregulate AMPA receptor trafficking and postsynaptic efficacy in hippocampal neurons. *Neuron* 83:417-430.
- Price DD, Hayashi H, Dubner R, Ruda MA (1979) Functional relationships between neurons of marginal and substantia gelatinosa layers of primate dorsal horn. *J Neurophysiol* 42:1590-1608.
- Price J, Mudge AW (1983) A subpopulation of rat dorsal root ganglion neurones is catecholaminergic. *Nature* 301:241-243.
- Prinz M, Häusler KG, Kettenmann H, Hanisch U (2001) beta-adrenergic receptor stimulation selectively inhibits IL-12p40 release in microglia. *Brain Res* 899:264-270.
- Puke MJ, Wiesenfeld-Hallin Z (1993) The differential effects of morphine and the alpha 2-adrenoceptor agonists clonidine and dexmedetomidine on the prevention and treatment of experimental neuropathic pain. *Anesth Analg* 77:104-109.
- Rajaofetra N, Ridet JL, Poulat P, Marlier L, Sandillon F, Geffard M, Privat A (1992) Immunocytochemical mapping of noradrenergic projections to the rat spinal cord with an antiserum against noradrenaline. *J Neurocytol* 21:481-494.
- Ralston HJ (1979) The fine structure of laminae I, II and III of the macaque spinal cord. *J Comp Neurol* 184:619-642.
- Ramana Reddy SV, Yaksh TL (1980) Spinal noradrenergic terminal system mediates antinociception. *Brain Res* 189:391-401.
- Ramer MS, Bisby MA (1997) Rapid sprouting of sympathetic axons in dorsal root ganglia of rats with a chronic constriction injury. *Pain* 70:237-244.
- Ramón y Cajal S (1899) *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados*. (Moya I y L de N, éd). Madrid.
- Ren K, Randich A, Gebhart GF (1991) Spinal serotonergic and kappa opioid receptors mediate facilitation of the tail flick reflex produced by vagal afferent stimulation. *Pain* 45:321-329.
- Rexed B (1952) The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 96:414-495.
- Ridet JL, Rajaofetra N, Teilhac JR, Geffard M, Privat a (1993) Evidence for nonsynaptic serotonergic and noradrenergic innervation of the rat dorsal horn and possible involvement of neuron-glia interactions. *Neuroscience* 52:143-157.
- Ridet JL, Sandillon F, Rajaofetra N, Geffard M, Privat a (1992) Spinal dopaminergic system of the rat: light and electron microscopic study using an antiserum against dopamine, with particular emphasis on synaptic incidence. *Brain Res* 598:233-241.
- Roh D-H, Kwon Y-B, Kim H-W, Ham T-W, Yoon S-Y, Kang S-Y, Han H-J, Lee H-J, Beitz AJ, Lee J-H (2004) Acupoint stimulation with diluted bee venom (apipuncture) alleviates thermal

- hyperalgesia in a rodent neuropathic pain model: involvement of spinal alpha 2-adrenoceptors. *J Pain* 5:297-303.
- Rolando L (1809) Saggio sopra la vera struttura del cervello dell'uomo e degli animali e sopra le funzioni del sistema nervosa., Stamperia . Sassari.
- Romano C, Sesma MA, McDonald CT, O'Malley K, Van den Pol AN, Olney JW (1995) Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR5 immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol* 355:455-469.
- Roudet C, Mouchet P, Feuerstein C, Savasta M (1994) Normal distribution of alpha 2-adrenoceptors in the rat spinal cord and its modification after noradrenergic denervation: A quantitative autoradiographic study. *J Neurosci Res* 39:319-329.
- Salm a K, McCarthy KD (1992) The evidence for astrocytes as a target for central noradrenergic activity: expression of adrenergic receptors. *Brain Res Bull* 29:265-275.
- Salm A, McCarthy K (1990) Norepinephrine-evoked calcium transients in cultured cerebral type I astroglia. *Glia* 538.
- Satoh K, Kashiba A, Kimura H, Maeda T (1982) Noradrenergic axon terminals in the substantia gelatinosa of the rat spinal cord: an electron-microscopic study using glyoxylic acid-potassium permanganate fixation. *Cell Tissue Res* 222:359-378.
- Scheibel ME, Scheibel AB (1968) Terminal axonal patterns in cat spinal cord. II. The dorsal horn. *Brain Res* 9:32-58.
- Scheinin M, Lomasney JW, Hayden-Hixson DM, Schambra UB, Caron MG, Lefkowitz RJ, Fremeau Jr. RT (1994) Distribution of alpha 2-adrenergic receptor subtype gene expression in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 21:133-149.
- Schneider SP (2008) Local circuit connections between hamster laminae III and IV dorsal horn neurons. *J Neurophysiol* 99:1306-1318.
- Schurr A, Payne RS, Miller JJ, Rigor BM (1997) Glia are the main source of lactate utilized by neurons for recovery of function posthypoxia. *Brain Res* 774:221-224.
- Shannon HE, Lutz EA (2000) Yohimbine produces antinociception in the formalin test in rats: involvement of serotonin 1A receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 149:93-97.
- Shi TJ, Winzer-Serhan U, Leslie F, Hökfelt T (1999) Distribution of alpha2-adrenoceptor mRNAs in the rat lumbar spinal cord in normal and axotomized rats. *Neuroreport* 10:2835-2839.
- Shibata K, Foglar R, Horie K, Obika K, Sakamoto A, Ogawa S, Tsujimoto G (1995) KMD-3213, a novel, potent, alpha 1a-adrenoceptor-selective antagonist: characterization using recombinant human alpha 1-adrenoceptors and native tissues. *Mol Pharmacol* 48:250-258.
- Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N (1992) Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR1) in the central nervous system: An in situ hybridization study in adult and developing rat. *J Comp Neurol* 322:121-135.
- Shigetomi E, Bushong EA, Hausteiner MD, Tong X, Jackson-Weaver O, Kracun S, Xu J, Sofroniew M V, Ellisman MH, Khakh BS (2013) Imaging calcium microdomains within entire astrocyte territories and endfeet with GCaMPs expressed using adeno-associated viruses. *J Gen Physiol* 141:633-647.

- Smit AB, Syed NI, Schaap D, van Minnen J, Klumperman J, Kits KS, Lodder H, van der Schors RC, van Elk R, Sorgedragter B, Brejc K, Sixma TK, Geraerts WP (2001) A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature* 411:261-268.
- Smith MS, Schambra UB, Wilson KH, Page SO, Schwinn DA (1999) α 1-Adrenergic receptors in human spinal cord: specific localized expression of mRNA encoding α 1-adrenergic receptor subtypes at four distinct levels. *Mol Brain Res* 63:254-261.
- Sonohata M, Furue H, Katafuchi T, Yasaka T, Doi A, Kumamoto E, Yoshimura M (2004) Actions of noradrenaline on substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord revealed by in vivo patch recording. *J Physiol* 555:515-526.
- Starke K (2001) Presynaptic autoreceptors in the third decade: focus on alpha2-adrenoceptors. *J Neurochem* 78:685-693.
- Starowicz K, Mousa S a, Obara I, Chocyk A, Przewłocki R, Wedzony K, Machelska H, Przewłocka B (2009) Peripheral antinociceptive effects of MC4 receptor antagonists in a rat model of neuropathic pain - a biochemical and behavioral study. *Pharmacol Rep* 61:1086-1095.
- Stilling B (1842) Untersuchungen über die Functionen des Rückenmarks und der Nerven. Leipzig: Wigand.
- Stone LS, Broberger C, Vulchanova L, Wilcox GL, Hökfelt T, Riedl MS, Elde R (1998) Differential distribution of alpha2A and alpha2C adrenergic receptor immunoreactivity in the rat spinal cord. *J Neurosci* 18:5928-5937.
- Strosberg AD (1997) Structure and function of the beta 3-adrenergic receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:421-450.
- Subbarao K V, Hertz L (1990) Effect of adrenergic agonists on glycogenolysis in primary cultures of astrocytes. *Brain Res* 536:220-226.
- Sullivan AF, Dashwood MR, Dickenson AH (1987) Alpha 2-adrenoceptor modulation of nociception in rat spinal cord: location, effects and interactions with morphine. *Eur J Pharmacol* 138:169-177.
- Summers RJ, McMartin LR (1993) Adrenoceptors and their second messenger systems. *J Neurochem* 60:10-23.
- Sur C, McKernan R, Triller A (1995) Subcellular localization of the GABAA receptor gamma 2 subunit in the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 7:1323-1332.
- Surprenant A, Schneider D a., Wilson HL, Galligan JJ, North RA (2000) Functional properties of heteromeric P2X(1/5) receptors expressed in HEK cells and excitatory junction potentials in guinea-pig submucosal arterioles. *J Auton Nerv Syst* 81:249-263.
- Surprenant A, Williams J (1987) Inhibitory synaptic potentials recorded from mammalian neurones prolonged by blockade of noradrenaline uptake. *J Physiol*:87-103.
- Szabadi E (2013) Functional neuroanatomy of the central noradrenergic system. *J Psychopharmacol* 27:659-693.
- Takahashi H, Okabayashi H, Suga K, Matsuzawa M, Ikegaki I, Yoshimura M (1987) Sympatholytic effects of the intravenously injected alpha 1-adrenergic blocker, bunazosin, in anaesthetized rats. *J Hypertens* 5:677-682.

- Takeda H, Inazu M, Matsumiya T (2002) Astroglial dopamine transport is mediated by norepinephrine transporter. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 366:620-623.
- Tamae A, Nakatsuka T, Koga K, Kato G, Furue H, Katafuchi T, Yoshimura M (2005) Direct inhibition of substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord by activation of dopamine D2-like receptors. *J Physiol* 568:243-253.
- Tanaka KF, Kashima H, Suzuki H, Ono K, Sawada M (2002) Existence of functional beta1- and beta2-adrenergic receptors on microglia. *J Neurosci Res* 70:232-237.
- Taniguchi T, Inagaki R, Murata S, Akiba I, Muramatsu I (1999) Microphysiometric analysis of human alpha-adrenoceptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Br J Pharmacol* 127:962-968.
- Todd A, Spike R (1993) The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal horn. *Prog Neurobiol* 41:609-645.
- Todd AJ (2010) Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci* 11:823-836.
- Todd AJ, Hughes DI, Polgár E, Nagy GG, Mackie M, Ottersen OP, Maxwell DJ (2003) The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn. *Eur J Neurosci* 17:13-27.
- Todd AJ, Watt C, Spike RC, Sieghart W (1996) Colocalization of GABA, glycine, and their receptors at synapses in the rat spinal cord. *J Neurosci* 16:974-982.
- Tölle TR, Berthele A, Zieglgänsberger W, Seeburg PH, Wisden W (1993) The differential expression of 16 NMDA and non-NMDA receptor subunits in the rat spinal cord and in periaqueductal gray. *J Neurosci* 13:5009-5028.
- Tredici G, Torri Tarelli LT, Cavaletti G, Marmioli P (1985) Ultrastructural organization of lamina VI of the spinal cord of the cat. *Prog Neurobiol* 24:293-331.
- Ueda M, Oyama T, Kuraishi Y, Akaike A, Satoh M (1995) Alpha 2-adrenoceptor-mediated inhibition of capsaicin-evoked release of glutamate from rat spinal dorsal horn slices. *Neurosci Lett* 188:137-139.
- Uhlén S, Lindblom J, Tiger G, Wikberg JE (1997) Quantification of alpha2A and alpha2C adrenoceptors in the rat striatum and in different regions of the spinal cord. *Acta Physiol Scand* 160:407-412.
- Van der Hagen E a E, Tudpor K, Verkaart S, Lavrijsen M, van der Kemp A, van Zeeland F, Bindels RJM, Hoenderop JGJ (2014) β 1-Adrenergic receptor signaling activates the epithelial calcium channel, transient receptor potential vanilloid type 5 (TRPV5), via the protein kinase A pathway. *J Biol Chem* 289:18489-18496.
- Van Dijken H, Dijk J, Voom P, Holstege JC (1996) Localization of dopamine D2 receptor in rat spinal cord identified with immunocytochemistry and in situ hybridization. *Eur J Neurosci* 8:621-628.
- Vega JA, Amenta F, Hernandez LC, del Valle ME (1991) Presence of catecholamine-related enzymes in a subpopulation of primary sensory neurons in dorsal root ganglia of the rat. *Cell Mol Biol* 37:519-530.
- Verkhatsky A, Orkand RK, Kettenmann H (1998) Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev* 78:99-141.

- Vidnyánszky Z, Hámori J, Négyessy L, Rüegg D, Knöpfel T, Kuhn R, Görcs TJ (1994) Cellular and subcellular localization of the mGluR5a metabotropic glutamate receptor in rat spinal cord. *Neuroreport* 6:209-213.
- Villanueva L, Bourgeois L (2009) Les systèmes de modulation de la douleur. In: Douleurs : physiologie, physiopathologie et pharmacologie, pp 29-44. Rueil-Malmaison: Arnette.
- Vogt M (1954) The concentration of sympathin in different parts of the central nervous system under normal conditions and after the administration of drugs. *J Physiol* 123:451-481.
- Von Euler US (1951) The nature of adrenergic nerve mediators. *Pharmacol Rev* 3:247-277.
- Vroman R, Klaassen LJ, Howlett MHC, Cenedese V, Klooster J, Sjoerdsma T, Kamermans M (2014) Extracellular ATP hydrolysis inhibits synaptic transmission by increasing pH buffering in the synaptic cleft. *PLoS Biol* 12:e1001864.
- Waldvogel HJ, Faull RL, Jansen KL, Dragunow M, Richards JG, 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* 39:361-385.
- Walker SM, Grafe M, Yaksh TL (2012) Intrathecal clonidine in the neonatal rat: dose-dependent analgesia and evaluation of spinal apoptosis and toxicity. *Anesth Analg* 115:450-460.
- Wang X, Pinol RA, Byrne P, Mendelowitz D (2014) Optogenetic Stimulation of Locus Ceruleus Neurons Augments Inhibitory Transmission to Parasympathetic Cardiac Vagal Neurons via Activation of Brainstem 1 and I Receptors. *J Neurosci* 34:6182-6189.
- Watkins LR, Milligan ED, Maier SF (2001) Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci* 24:450-455.
- Westlund KN, Bowker RM, Ziegler MG, Coulter JD (1984) Origins and terminations of descending noradrenergic projections to the spinal cord of monkey. *Brain Res* 292:1-16.
- Willis WD, Coggeshall RE (2004) *Sensory Mechanisms of the Spinal Cord*. Boston, MA: Springer US.
- Woodbury CJ, Koerber HR (2003) Widespread projections from myelinated nociceptors throughout the substantia gelatinosa provide novel insights into neonatal hypersensitivity. *J Neurosci* 23:601-610.
- Woodbury CJ, Kullmann FA, McIlwrath SL, Koerber HR (2008) Identity of myelinated cutaneous sensory neurons projecting to nociceptive laminae following nerve injury in adult mice. *J Comp Neurol* 508:500-509.
- Woolf CJ, Ma Q (2007) Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron* 55:353-364.
- Xu B, Zhang W, Yang J, Xu H, Deng X, Zhang Y (2010a) Dexmedetomidine blocks thermal hyperalgesia and spinal glial activation in rat model of monoarthritis. *Acta Pharmacol Sin* 31:523-530.
- Xu B, Zhang W-S, Yang J-L, Lù N, Deng X-M, Xu H, Zhang Y-Q (2010b) Evidence for suppression of spinal glial activation by dexmedetomidine in a rat model of monoarthritis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37:e158-e166.
- Xu J, Song D, Bai Q, Cai L, Hertz L, Peng L (2014a) Basic Mechanism Leading to Stimulation of Glycogenolysis by Isoproterenol, EGF, Elevated Extracellular K⁺ Concentrations, or GABA. *Neurochem Res* 39:661-667.

- Xu J, Song D, Bai Q, Zhou L, Cai L, Hertz L, Peng L (2014b) Role of glycogenolysis in stimulation of ATP release from cultured mouse astrocytes by transmitters and high K⁺ concentrations. *ASN Neuro* 6:e00132.
- Yaksh TL (1985) Pharmacology of spinal adrenergic systems which modulate spinal nociceptive processing. *Pharmacol Biochem Behav* 22:845-858.
- Yaksh TL, Reddy S V (1981) Studies in the primate on the analgetic effects associated with intrathecal actions of opiates, alpha-adrenergic agonists and baclofen. *Anesthesiology* 54:451-467.
- Yasaka T, Tiong SYX, Hughes DI, Riddell JS, Todd AJ (2010) Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach. *Pain* 151:475-488.
- Yokoyama C, Okamura H, Nakajima T, Taguchi J-I, Iбата Y (1994) Autoradiographic distribution of [3H]YM-09151-2, a high-affinity and selective antagonist ligand for the dopamine D2 receptor group, in the rat brain and spinal cord. *J Comp Neurol* 344:121-136.
- Yoshimura N, Sasa M, Yoshida O, Takaori S (1990) Alpha 1-adrenergic receptor-mediated excitation from the locus coeruleus of the sacral parasympathetic preganglionic neuron. *Life Sci* 47:789-797.
- Zarbin MA, Wamsley JK, Kuhar MJ (1981) Glycine receptor: light microscopic autoradiographic localization with [3H]strychnine. *J Neurosci* 1:532-547.
- Zeilhofer HU, Studler B, Arabadzisz D, Schweizer C, Ahmadi S, Layh B, Bösl MR, Fritschy J-M (2005) Glycinergic neurons expressing enhanced green fluorescent protein in bacterial artificial chromosome transgenic mice. *J Comp Neurol* 482:123-141.
- Zhang DX, Owens CM, Willis WD (1991) Two forms of inhibition of spinothalamic tract neurons produced by stimulation of the periaqueductal gray and the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 65:1567-1579.
- Zhang ET, Han ZS, Craig AD (1996) Morphological classes of spinothalamic lamina I neurons in the cat. *J Comp Neurol* 367:537-549.
- Zhang H, Xin W, Dougherty PM (2009) Synaptically evoked glutamate transporter currents in Spinal Dorsal Horn Astrocytes. *Mol Pain* 5:36.
- Zhang J, Cavanaugh DJ, Nemenov MI, Basbaum AI (2013) The modality-specific contribution of peptidergic and non-peptidergic nociceptors is manifest at the level of dorsal horn nociceptive neurons. *J Physiol* 591:1097-1110.
- Zigmond M, Bloom F, Landis S, Roberts J, Squire L (1999) *Fundamental Neuroscience*. San Diego: Academic press.

Effets de la noradrénaline sur les transmissions synaptiques dans la corne dorsale de la moelle épinière de rat

Résumé

La corne dorsale de la moelle épinière (CDME) est un site d'intégration et de modulation de l'information somatosensorielle. Les laminae profondes de la CDME jouent un rôle important dans la modulation des informations nociceptives.

Notre objectif a été de caractériser les effets de la NA sur la transmission synaptique des laminae profondes de la CDME.

Nous montrons que la NA facilite la transmission synaptique inhibitrice dans les laminae III-V de la CDME. Ce phénomène met en jeu l'activation d'adrénocepteurs α_1 , α_2 , et β et nécessite une communication interlaminaire intacte entre les laminae III-IV et V. L'inhibition du métabolisme glial produit les mêmes effets qu'une section mécanique entre les laminae IV et V. Une interaction entre les cellules gliales et les neurones des laminae profondes la CDME semble donc indispensable à l'effet facilitateur de la NA.

Moelle épinière, corne dorsale, noradrénaline, transmission synaptique, glie

Résumé en anglais

The dorsal horn of the spinal cord (DH) is an important site of integration and modulation of somatosensory information and deep laminae of the DH play an important role in the modulation of nociceptive information in the neuronal network of the spinal cord.

Our aim was to characterize the effects of NA on synaptic transmission in deep laminae of the DH.

We show that NA facilitates inhibitory synaptic transmission in laminae III-IV of the DH. This phenomenon involves the activation of α_1 , α_2 , and β adrenoceptors and requires intact interlaminar communications between laminae III-IV and V. Glial cell metabolism inhibition has the same consequences as a mechanical section between laminae IV and V. These results indicate that an interaction between glial cell and deep laminae neurons of the DH seems essential for the facilitatory effect of NA on inhibitory synaptic communications in laminae III-IV of the DH.

Spinal cord, dorsal horn, noradrenaline, synaptic transmission, glia