



**HAL**  
open science

# Rôle de l'inhibition segmentaire dans le traitement de l'information nociceptive cutanée et méningée dans le complexe trigéminal

Céline Melin

► **To cite this version:**

Céline Melin. Rôle de l'inhibition segmentaire dans le traitement de l'information nociceptive cutanée et méningée dans le complexe trigéminal. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2011. Français. NNT : 2011CLF1DD01 . tel-01423839

**HAL Id: tel-01423839**

**<https://theses.hal.science/tel-01423839v1>**

Submitted on 1 Jan 2017

**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.

**ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

**THESE**

Présentée à l'Université d'Auvergne Clermont1

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITE**

Spécialité : NEUROSCIENCES

Présentée et soutenue publiquement le 13 Décembre 2011

par

**Céline MELIN**

---

**ROLE DE L'INHIBITION SEGMENTAIRE DANS LE  
TRAITEMENT DE L'INFORMATION NOCICEPTIVE  
CUTANÉE ET MÉNINGÉE DANS LE COMPLEXE  
TRIGÉMINAL.**

---

**Directeur de thèse : Professeur Alain ARTOLA**

**JURY**

Mr Le Professeur ARTOLA Alain  
Mr Le Professeur DALLEL Radhouane  
Mr Le Docteur LINGUEGLIA Eric  
Mr Le Professeur VOISIN Daniel

Directeur  
Président  
Rapporteur  
Rapporteur

INSERM U929 Neurobiologie de la Douleur Trigéminal, Faculté de Chirurgie Dentaire,  
11 Bld Charles de Gaulles – 63000 Clermont-Ferrand

## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes remerciements au Professeur Radhouane Dallel, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Merci de m'avoir fait découvrir la recherche fondamentale avec sa rigueur et merci pour vos remarques toujours constructives et votre enseignement de l'esprit de synthèse.

Merci au Professeur Alain Artola pour avoir accepté de diriger ce travail, pour vos conseils, votre aide et votre investissement dans cette aventure du field. Merci aussi pour votre enseignement de la persévérance.

Merci au Professeur Daniel Voisin, pour avoir accepté de lire et de juger ce travail, jusqu'au bout, malgré votre expérience personnelle de la douleur neuropathique à ce moment-là. Vos remarques constructives ont permis d'améliorer ce travail.

Merci au Docteur Lingueglia Eric pour l'intérêt que vous avez su porter à ce travail.

Merci à Jean Louis Molat, pour ton aide précieuse dans la mise au point de la technique, tes conseils avisés et ton aide tout au long de ce travail.

Merci au Docteur Eric Ducret pour ton aide généreuse pour l'analyse des données.

Merci à Amélie, Anne Marie, Cédric, Christelle, Christophe, Florian, Fred, Khaled, Laurent, Lénaïc, Myriam, Nelly, Nathalie, Nicolas, Paul, Pédro, Philippe, Raja, Rachel, Sudi, Sylvain  
pour votre sympathie et votre soutien.

<b>A. INTRODUCTION</b> -----	<b>9</b>
<b>I. DOULEURS TRIGÉMINALES, LEURS PARTICULARITÉS</b> -----	<b>10</b>
1. Douleurs, douleurs aiguës, douleurs chroniques-----	10
2. Particularités des douleurs de la face -----	11
3. Un exemple de douleur trigéminal : la migraine-----	12
<b>II. ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DU SYSTEME TRIGEMINAL</b> -----	<b>14</b>
1. Système nerveux trigéminal périphérique -----	15
1.1. Territoires d'innervation -----	15
1.2. Les fibres afférentes primaires -----	16
1.3. Les fibres afférentes primaires d'origine méningée-----	18
2. Le complexe sensitif du trijumeau -----	19
2.1. Organisation et afférences primaires -----	19
2.2. Rôle fonctionnel -----	20
2.3. Communication intratrigéminal-----	21
3. Particularités du système trigéminal-----	22
<b>III. LE SOUS-NOYAU CAUDAL</b> -----	<b>26</b>
1. Cytoarchitecture du Sp5C -----	27
2. Terminaisons centrales des afférences primaires -----	28
3. Interneurones -----	31
3.1. Types d'interneurones dans la corne dorsale superficielle -----	31
3.2. Interneurones : une organisation modulaire ? -----	33
<b>IV. INHIBITION SYNAPTIQUE DANS LA CORNE DORSALE</b> -----	<b>36</b>
1. Neurotransmission inhibitrice dans la corne dorsale -----	37
1.1. Différents types de récepteurs -----	37
1.1.1. Récepteurs ionotropiques -----	37
1.1.2. Récepteurs GABA <sub>B</sub> métabotropiques -----	40
1.2. Neurones GABAergiques et glycinergiques de la corne dorsale-----	41
1.3. Activation des neurones inhibiteurs -----	42
1.4. Inputs inhibiteurs sur les neurones de la corne dorsale-----	44
2. Mécanismes de la perte de l'inhibition synaptique dans la corne dorsale au cours de la douleur chronique -----	47
2.1. Douleur inflammatoire-----	47
2.2. Douleur neuropathique-----	47
2.3. Sensibilisation centrale -----	48
3. Conséquences fonctionnelles d'une réduction de la transmission inhibitrice -----	49

<b>V. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MIGRAINE</b> -----	<b>51</b>
1. Vasodilatation des vaisseaux et inflammation neurogène-----	51
2. Sensibilisation périphérique et centrale-----	53
3. Générateur endogène dans le tronc cérébral ? -----	54
4. Dépression corticale envahissante (CSD)-----	55
5. Altération de l'excitabilité corticale chez les patients migraineux -----	57
<b>VI. OBJECTIFS DE TRAVAIL</b> -----	<b>59</b>
<b>B. Article1</b> -----	<b>61</b>
<b>C. Article 2</b> -----	<b>101</b>
<b>D. DISCUSSION GENERALE</b> -----	<b>129</b>
<b>I. Les fibres afférentes primaires de type C, cutanées et méningées, paraissent         avoir des propriétés pharmacologiques identiques.</b> -----	<b>130</b>
1. Effet de l'activation des récepteurs opioïdes-----	131
2. Effet de l'activation des récepteurs GABA <sub>B</sub> -----	131
<b>II. Le potentiel C cutané mais non méningé est inhibé à la suite d'une         désinhibition GABAergique et/ou glycinergique</b> -----	<b>134</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> -----	<b>140</b>

<i>Figure 1 : Territoires cutanés innervés par le nerf trijumeau.....</i>	<i>16</i>
<i>Figure 2 : Organisation du complexe sensitif du trijumeau et ses connexions. ....</i>	<i>20</i>
<i>Figure 3 : Communication intratrigéminal : organisation du sous-noyau spinal.....</i>	<i>22</i>
<i>Figure 4 : Diversité des tissus cranio-faciaux innervés par le nerf trijumeau. (d'après Bereiter, 2008).....</i>	<i>23</i>
<i>Figure 5 : Couches de Rexed au niveau C4 de la moelle épinière d'un rat adulte.....</i>	<i>28</i>
<i>Figure 6 : Projections centrales des afférences primaires.....</i>	<i>30</i>
<i>Figure 7 : Réponses de quatre types de neurones à des courants dépolarisants croissants (de bas en haut)....</i>	<i>31</i>
<i>Figure 8 : Classification des interneurons de la couche II par Grudt et Perl.....</i>	<i>32</i>
<i>Figure 9 : Connexion monosynaptique excitatrice entre un neurone de type « vertical » de la couche II<sub>e</sub> et un neurone de projection de la couche I.....</i>	<i>34</i>
<i>Figure 10 : Schéma représentant le « module » dans la corne dorsale superficielle.....</i>	<i>35</i>
<i>Figure 11 : Schémas des récepteurs glycinergiques et GABA<sub>A</sub>ergiques.....</i>	<i>38</i>
<i>Figure 12 : Signalisation intra cellulaire postsynaptique des récepteurs GABA<sub>B</sub>.....</i>	<i>40</i>
<i>Figure 13 : Des récepteurs inhibiteurs différents, synaptiques et extra-synaptiques, modulent des sous-populations de neurones inhibiteurs dans différentes régions de la corne dorsale.....</i>	<i>45</i>
<i>Figure 14 : Circuit hypothétique du Sp5C à l'origine de l'allodynie mécanique dynamique.....</i>	<i>50</i>
<i>Figure 15 : Propagation des modifications de l'activité neuronale et du débit sanguin au cours d'une CSD....</i>	<i>56</i>
<i>Figure 16 : Proposition de mécanisme physiopathologique de la céphalée migraineuse (d'après Pietrobon et Striessnig, 2003).....</i>	<i>58</i>
<i>Figure 17 : Effet de l'application intracisternale de baclofène (10 µl) sur les potentiels de champ évoqués dans ce noyau par une stimulation cutanée.....</i>	<i>132</i>
<i>Figure 18 : Effet d'une micro-injection intracérébrale de baclofène (0,5 µl, 0,1 mM) dans le Sp5C sur les potentiels de champ évoqués dans ce noyau par une stimulation méningée (10 mA, 2 ms).....</i>	<i>133</i>
<i>Figure 19 : Schéma de la théorie du « gate control ».....</i>	<i>135</i>
<i>Figure 20 : Représentation schématique des circuits polysynaptiques possibles pour le contrôle de l'input de type C par l'activité des fibres afférentes primaires de type Aβ et Aδ.....</i>	<i>137</i>

## **ABBREVIATIONS**

AMPc	adénosine mono-phosphate cyclique
AP	Potentiel d'action
ATP	adénosine triphosphate
B4	Isolectine B4
BDNF	brain derived neurotrophic factor
BOLD fMRI	niveau d'oxygénation du sang
C2	niveau métamérique C2
C4	niveau métamérique C4
CB1	récepteur cannabinoïde 1
CGRP	calcitonin gene related peptide
CSD	cortical spreading depression
DRPs	dorsal root potentials
EGFP	enhanced green fluorescent protein
GABA	acide $\gamma$ -aminobutyrique
GABA <sub>A</sub> (GABA <sub>A</sub> R)	récepteur GABA <sub>A</sub>
GABA <sub>B</sub> (GABA <sub>B</sub> R)	récepteur GABA <sub>B</sub>
GDNF	glial derived neurotrophic factor
GFP	green fluorescent protein
GlyR	récepteurs à la glycine
IX	nerf glossopharyngien
KCC2	K <sup>+</sup> -Cl <sup>-</sup> -co-transporteur
NGF	nerve growth factor
NKCC1	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -2 Cl <sup>-</sup> -co-transporteur
NMDA	N-Methyl-D-aspartic acid
NNS	neurones nociceptifs non spécifiques
NO	monoxyde d'azote
NS	neurones nociceptifs spécifiques
P2X4	récepteur purinergique P2X4
P30	trente jours après la naissance
PA	potentiel d'action
PGE2	prostaglandine E2
PKA	protéine kinase A
PKC $\gamma$	protéine kinase C
PPSE	potentiel postsynaptique excitateur
PPSI ou CPSIs	potentiels ou courants postsynaptiques inhibiteurs



siRNA	small interfering ribonucleic acid
SP ou P	substance P
Sp5C	sous-noyau caudal
Sp5O	sous-noyau oral
TrkA	récepteur tyrosine-kinase A
TrkB	récepteur tyrosine-kinase B
TRPV1	transient receptor potential vanilloïde 1
V	nerf trijumeau
V1	nerf ophtalmique
V2	nerf maxillaire
V3	nerf mandibulaire
VGAT	transporteur des vésicules GABA
VGLUT2	vesicular glutamate transporter 2
VGLUT3	vesicular glutamate transporter 3
VII	nerf facial
WDR	wide dynamic range
X	nerf vague

## **A. INTRODUCTION**

# I. DOULEURS TRIGÉMINALES, LEURS PARTICULARITÉS

## 1. Douleurs, douleurs aiguës, douleurs chroniques

Selon l'International Association for the Study of Pain (IASP), la douleur est : "une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à des lésions tissulaires réelles ou potentielles ou décrites en de tels termes". Cette définition montre à quel point la douleur est un phénomène complexe revêtant un aspect multidimensionnel (sensoriel, affectif et émotionnel, cognitif et comportemental). En effet, trois systèmes interdépendants concourent à la perception douloureuse. Le système sensori-discriminatif informe l'individu de l'intensité, l'étendue, la localisation, la durée et la qualité du stimulus. Le système affectivo-motivationnel centre l'attention de l'individu sur la douleur qui devient alors prioritaire sur l'activité en cours, de par son caractère désagréable. D'autre part, il déclenche un comportement de défense ou de fuite, indispensable à la survie de l'individu en mettant en jeu des réflexes somatomoteurs et des réactions neurovégétatives. Enfin le système cognitif interprète la douleur en fonction du contexte, mais aussi de l'expérience passée, de projections vers le futur et de l'éducation socioculturelle.

On distingue les douleurs aiguës (physiologiques) et douleurs chroniques (pathologiques). Contrairement à ce que l'on pourrait penser, l'abolition de la douleur ne procure aucun avantage : les cas pathologiques d'insensibilité congénitale à la douleur sont dramatiques et mettent la survie de ces patients en péril (*Cox et al., 2010; Indo, 2001*). Leur environnement doit être aménagé en permanence afin d'éviter brûlures, blessures, fractures. La **douleur aiguë** est donc physiologique. Elle résulte de l'activation des voies nociceptives par une stimulation périphérique d'intensité suffisante, capable d'entraîner un dommage tissulaire ou de menacer l'intégrité du corps. C'est un processus de protection. La douleur aiguë permet de prévenir une blessure en créant à la fois un réflexe de retrait du stimulus et une sensation si désagréable qu'elle va entraîner une stratégie comportementale d'évitement à un futur stimulus identique. Un autre processus important augmente cette fonction protectrice, c'est la sensibilisation du système nociceptif, déclenchée à la suite d'une répétition du stimulus ou d'une stimulation particulièrement intense. Elle correspond à une diminution du seuil d'activation du système nociceptif et une augmentation de la réponse nociceptive. Ainsi, une stimulation non douloureuse dans les conditions habituelles entraîne une douleur (allodynie) et la réponse à une stimulation douloureuse est augmentée (hyperalgésie). Ce processus facilite la cicatrisation de la partie du corps endommagée (ex : coup de soleil,

entorse). Cette hypersensibilité est persistante mais non permanente. Elle disparaît une fois la cause éliminée et la cicatrisation achevée. Il s'agit d'un processus adaptatif, le système étant en alerte pour éviter tous risques de nouvelle lésion tissulaire. Ceci est l'expression d'une plasticité du système nerveux périphérique ou central.

Cette fonction d'alarme et de protection peut subir des dérèglements. Un excès de nociception ou une lésion du système nerveux par exemple, peut entraîner des modifications plus ou moins réversibles du système nociceptif. La douleur peut alors durer des mois, voire des années ; on parle de **douleur chronique**. Elle se manifeste par des douleurs spontanées et/ou provoquées (hyperalgie, allodynie). L'effet protecteur physiologique a fait place à un état pathologique. La douleur n'est plus utile et elle devient même délétère pour la qualité de vie des patients.

## 2. Particularités des douleurs de la face

Les lésions du nerf trijumeau entraînent relativement rarement des douleurs neuropathiques en comparaison au reste du corps (nerfs spinaux). En effet, l'incidence des douleurs neuropathiques suite à un traitement endodontique (Campbell et al., 1990; Lobb et al., 1996; Polycarpou et al., 2005), un traumatisme facial (Benoliel et al., 2005), une chirurgie orthognatique (Cheung & Lo, 2002), une extraction dentaire (Berge, 2002; Carmichael & McGowan, 1992; Robinson & Smith, 1996; Valmaseda-Castellón et al., 2000) ou la pause d'un implant dentaire (Gregg, 2000) est relativement basse. Le système trigéminal apparaît comme « résistant » au développement des douleurs neuropathiques.

Par contre, lorsque les douleurs oro-faciales se développent, elles présentent des caractéristiques bien particulières, jamais observées dans d'autres parties du corps. L'algie vasculaire de la face est une douleur unilatérale associée à des signes dysautonomiques. La névralgie typique du trijumeau est caractérisée par le déclenchement d'une douleur fulgurante par le simple effleurement d'une zone gâchette. La migraine est une douleur pulsatile, accompagnée de troubles sensoriels incitant le patient à s'isoler du monde (phonophobie, photophobie). Ces douleurs sont souvent intenses, voire violentes, que ce soit la douleur décrite comme « fulgurante » de la névralgie du trijumeau, celle pulsatile, intense, réveillant la nuit, de la pulpite ou la douleur décrite comme étant « la pire douleur qu'il soit » ou comme « douleur suicidaire » de l'algie vasculaire de la face.

Enfin les douleurs persistantes de l'extrémité céphalique ont un retentissement considérable sur des fonctions vitales telles que l'alimentation ou le sommeil, mais aussi sur la communication de l'individu avec son environnement (phonation, audition, vision). Les douleurs persistantes de cette zone sont très souvent associées à un état de dépression et ont un impact dévastateur sur la qualité de vie (Sessle & Hu, 1991).

### **3. Un exemple de douleur trigéminal : la migraine**

La migraine est une céphalée dite primaire, sans lésion sous-jacente dont la prévalence globale dans les pays occidentaux est de 6 à 8% chez les hommes et de 15 à 25 % chez les femmes (Stewart & Lipton, 1995; Rasmussen, 2001). Environ 5% de la population souffre d'au moins 18 jours de migraine par an. Et le caractère handicapant de ces crises de migraine est illustré par la perte de productivité qu'elles causent, évaluée à environ 27 milliards d'euros par an dans la communauté européenne (Andlin-Sobocki et al., 2005).

Les experts de l'International Headache Society publient en 1998 (mise à jour en 2004 : Headache Classification Subcommittee of the international Headache Society, 2004) des critères diagnostiques homogènes de classification des céphalées reconnus par l'ensemble de la communauté scientifique internationale. Les attaques de migraine sont caractérisées par des céphalées d'intensité modérée à sévère, unilatérales, pulsatiles, pouvant durer de 4 à 72 heures en l'absence de traitement. La céphalée migraineuse doit être accompagnée de troubles digestifs comme les nausées et les vomissements, et/ou de troubles sensoriels tels que la photophobie et la phonophobie (migraine sans aura). Chez au moins 20% des patients, les crises sont précédées par des symptômes neurologiques connus sous le nom d'aura migraineuse qui durent environ 60 minutes (migraines avec aura). L'aura la plus fréquente est d'origine visuelle, à laquelle peut s'ajouter des déficits moteurs et/ou de langage. La migraine présente un caractère héréditaire dans environ 50% des cas, mais ce pourcentage peut être plus élevé chez les patients atteints de migraines avec aura. Cette composante héréditaire est d'origine poly-génétique et donc multifactorielle et constitue probablement un facteur déterminant du seuil de migraine qui dépend à la fois de facteurs exogènes et endogènes. Il existe toute une variété de facteurs que les patients incriminent comme favorisant la survenue ou augmentant la fréquence des crises. On retrouve le stress, l'anxiété, la période menstruelle, la fatigue, le manque ou l'excès de sommeil, les boissons alcoolisées, le chocolat, la luminosité et la chaleur (Kelman, 2007). Néanmoins jusqu'à présent, il n'y a pas eu d'études concluantes montrant le niveau de participation des facteurs environnementaux dans la genèse

du syndrome migraineux. Les facteurs hormonaux semblent jouer un rôle important en tant que déclencheur endogène des migraines du fait de leur prédominance chez les femmes et de la survenue fréquente des crises de migraine en début de période menstruelle (Johannes, 1995). Le diagnostic est basé sur l'interrogatoire et la normalité de l'examen clinique. Le traitement de la crise vise à soulager la céphalée et repose sur les anti-inflammatoires non stéroïdiens et les antimigraineux spécifiques tels que les triptans. Un traitement de fond est proposé en cas de crises fréquentes. Les structures cérébrales et les mécanismes à l'origine de ce syndrome demeurent encore largement mal connus.

D'énormes progrès ont été réalisés au cours de ces dernières années dans la connaissance des mécanismes cellulaires et moléculaires de la douleur (Scholz & Woolf, 2007). Pourtant les douleurs comme la migraine restent un problème majeur de santé publique. Les traitements disponibles à ce jour ne sont que partiellement efficaces et peuvent être associés à des effets secondaires importants. Il est donc crucial de trouver de nouveaux médicaments. La découverte de nouvelles cibles thérapeutiques passe par l'amélioration de nos connaissances sur les mécanismes de la douleur.

Il y a bien entendu de nombreux points communs entre les physiologies de la douleur au niveau de la tête et du reste du corps. Cependant, l'analyse clinique ci-dessus suggère des différences notoires entre ces deux systèmes. De même, le nerf trijumeau (V) possède à première vue des fonctions identiques à celles des nerfs spinaux, en transmettant les informations sensorielles douloureuses ou non, mécaniques, chimiques ou thermiques, vers le cerveau. En réalité, l'organisation d'éléments périphériques et centraux peut être totalement différente dans le nerf trigéminal et les nerfs spinaux. La connaissance des spécificités du système nociceptif trigéminal est donc indispensable à l'amélioration de la prise en charge des douleurs oro-faciales chroniques et des migraines.

Le système trigéminal reçoit l'information sensorielle d'afférences primaires innervant la peau, les muqueuses, les tissus profonds (muscles et articulations) de la tête et les méninges qui répondent spécifiquement à des stimuli douloureux ou non. Ces afférences se terminent dans le complexe sensitif du trijumeau où elles se distribuent en fonction de la région qu'elles innervent et de leur modalité. Cette information est traitée notamment dans le sous-noyau caudal – dont la structure est similaire à celle de la corne dorsale de la moelle – par un réseau neuronal complexe associant interneurons excitateurs et inhibiteurs puis transmise aux neurones de projection qui la relaient vers diverses régions du cerveau. En retour, des afférences descendantes du cerveau modulent le passage du message sensoriel au niveau trigéminal. La balance entre excitation et inhibition, dans la corne dorsale de la moelle comme

dans le sous-noyau caudal, est cruciale pour garantir une fonction sensorielle normale. Il est clair qu'une diminution de cette inhibition contribue à la manifestation de symptômes tels que l'hyperalgie et l'allodynie. Mais quel est le véritable rôle de l'inhibition dans le traitement de l'information sensorielle dans le sous-noyau caudal (comme la corne dorsale de la moelle) ? Cette question est restée au centre de beaucoup de discussions depuis la proposition du « gate control » par Melzack et Wall (1965).

Dans cette première partie nous ferons une brève revue (1) de l'anatomie du système trigéminal sensitif, (2) de l'organisation de sous-noyau caudal, (3) du rôle de la désinhibition dans la genèse des manifestations cliniques de la douleur chronique, et (4) de la physiopathologie de la migraine.

## **II. ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DU SYSTEME TRIGEMINAL**

Le trijumeau ou V<sup>ème</sup> nerf crânien est un nerf mixte dont le rôle essentiel est d'assurer la sensibilité de la face et des méninges ainsi que la fonction de manducation. Les fonctions somesthésiques de la sphère oro-faciale sont particulièrement développées. La cavité buccale est l'organe somesthésique le plus important chez le jeune enfant. Elle reste importante chez l'adulte, comme le montre l'étendue de la représentation corticale des zones buccales et péri-buccales, similaire à celle des mains (Kaas, 1996). La bouche constitue non seulement l'extrémité supérieure du tube digestif, impliquée dans la saisie des aliments, la succion, la mastication, la déglutition, mais aussi une interface avec l'appareil respiratoire et un moyen de communication. Ces tâches complexes auxquelles participe la bouche, que l'on regroupe sous le terme de manducation, nécessitent un appareil sensitivo-sensoriel particulièrement développé.

# 1. Système nerveux trigéminal périphérique

## 1.1. Territoires d'innervation

Le nerf trijumeau émerge du tronc cérébral au niveau de la protubérance annulaire par deux racines, une racine sensitive, volumineuse et une racine motrice grêle, innervant les muscles masticateurs, le muscle du marteau et le muscle tenseur du voile.

La racine sensitive est constituée de 3 branches (figure 1) :

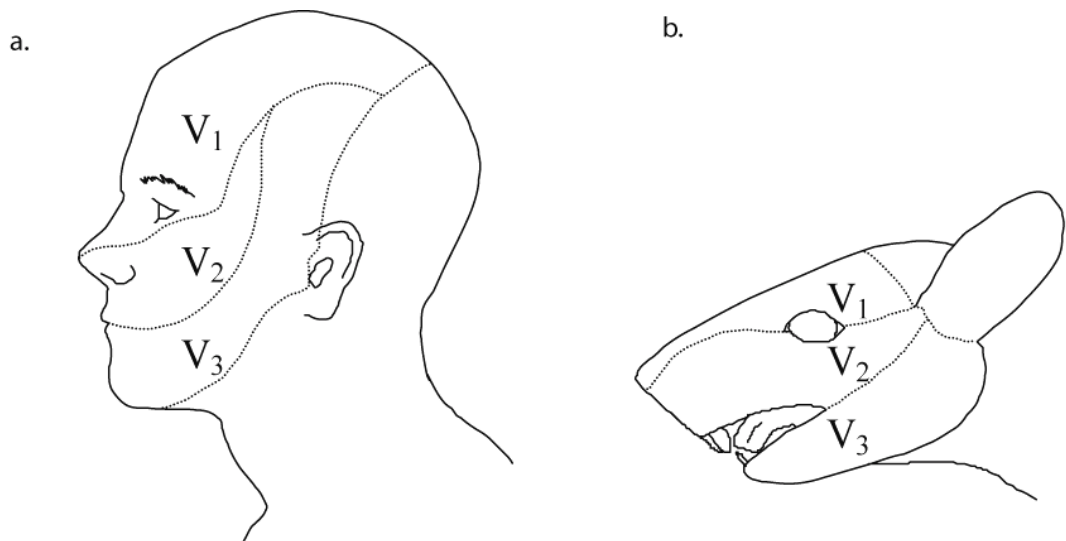
- Le nerf ophtalmique ou **V1** qui par plusieurs branches innerve un territoire cutané qui comprend la partie antérieure de la région temporale, le front, les paupières supérieures, et le dos du nez, ainsi qu'un territoire muqueux comportant les fosses nasales, les sinus éthmoïdal et frontal. D'autre part, il assure l'innervation sensitive de la cornée et des méninges.

- Le nerf maxillaire ou **V2** assure l'innervation sensitive de la partie moyenne de la face. Le nerf infra-orbitaire innerve la paupière inférieure, l'aile du nez, la lèvre supérieure et la joue. Le nerf alvéolaire supérieur innerve les dents et le vestibule maxillaires. Le nerf ptérygopalatin innerve les muqueuses de l'amygdale, du voile du palais, de la voûte palatine ainsi que celles des sinus maxillaires et des fosses nasales.

- Le nerf mandibulaire ou **V3** assure l'innervation sensitive du territoire mandibulaire. Il innerve à la fois une région cutanée temporale, jugale, labiale et mentonnière, la partie antérieure du pavillon de l'oreille et le conduit auditif externe, mais aussi une région muqueuse linguale (2/3 antérieur), labiale et vestibulaire mandibulaire. Il innerve aussi les dents mandibulaires et les articulations temporo-mandibulaires.

D'autres nerfs contribuent à l'innervation sensitive de la tête et du cou. Le plexus cervical supérieur (C2) assure la sensibilité du cou, de la partie postérieure du crâne et de l'angle de la mandibule. Les nerfs facial (VII), glossopharyngien (IX) et vague (X) innervent la région cutanée autour du conduit auditif externe. Le VII innerve aussi les 2/3 antérieurs de la langue. Le IX assure aussi l'innervation du 1/3 postérieur de la langue et le pharynx. Le X innerve le larynx, une partie du pharynx et l'épiglotte.





**Figure 1 : Territoires cutanés innervés par le nerf trijumeau.**

Schémas illustrant (a) chez l'homme et (b) chez le rat les territoires cutanés innervés par les trois branches sensibles du nerf trijumeau (V1 nerf ophtalmique ; V2 nerf maxillaire et V3 nerf mandibulaire). (D'après Kandel et Schwart, 1985 et Waite et Tracey, 1995).

## 1.2. Les fibres afférentes primaires

Les afférences primaires peuvent être classées selon leur origine périphérique (cutanée, musculaire, articulaire ou viscérale), vitesse de conduction (fonction de leur diamètre et degré de myélinisation), modalité sensorielle et phénotype neurochimique (expression de peptides).

Les fibres afférentes primaires de type **A $\beta$** , possèdent une gaine de myéline épaisse (diamètre 6 à 20  $\mu\text{m}$ ) et conduisent rapidement l'influx nerveux (30 à 60  $\text{m.s}^{-1}$  chez l'homme). Elles codent et transmettent les informations tactiles et proprioceptives (Koltzenburg & Scadding, 2001). Les fibres A $\beta$  d'origine cutanée sont connectées à plusieurs types de récepteurs histologiquement bien différenciés, chacun spécifique d'une modalité tactile. Elles véhiculent schématiquement trois types de sensibilités : à la pression, à la vibration et au frottement (Iggo & Andres, 1982).

Les fibres afférentes primaires de plus petit diamètre (A $\delta$  et C) véhiculent, les informations nociceptives et thermiques, le prurit et même la sensibilité à la pression non douloureuse (Koltzenburg & Scadding, 2001). Elles sont connectées à des terminaisons libres. Les fibres **A $\delta$** , possèdent une fine gaine de myéline (diamètre : 1-5  $\mu\text{m}$ ) et conduisent l'influx nerveux à une vitesse de 4-30  $\text{m.s}^{-1}$  chez l'homme. Elles ont une fréquence de décharge supérieure à celle des fibres C et permettent une meilleure discrimination des différentes modalités nociceptives (Slugg et al., 2000). Les fibres **C** ne possèdent pas de gaine de

myéline (diamètre : 0,3-1,5  $\mu\text{m}$ ) et, en conséquence, ont une vitesse de conduction plus lente que les précédentes (0,4-2,0  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

En fait, il existe plusieurs types de fibres afférentes primaires de type C, en fonction de leur modalité. Il existe ainsi, en plus des fibres C répondant aux stimuli mécaniques et thermiques douloureux, des fibres spécifiquement sensibles à l'histamine ; elles seraient à l'origine de la sensation de démangeaison (Schmelz, 2001; Schmelz et al., 1997; Andrew & Craig, 2001). D'ailleurs, ces deux types de fibres C, celles véhiculant la douleur et celles transmettant la sensation de démangeaison, interagissent entre elles au niveau de la corne dorsale : les premières inhibant la transmission des secondes (Liu et al., 2010; Lagerström et al., 2010). D'autres afférences primaires de type C véhiculent des informations tactiles agréables (Löken et al., 2009). Leur mise en jeu n'intervient pas dans la sensibilité tactile épicrotique et n'active pas le cortex somato-sensoriel mais plutôt les régions limbiques (Craig, 2003). Leur activation provoque une sensation agréable et pourrait expliquer les réponses hormonales et émotionnelles aux caresses (Olausson et al., 2003; Wessberg et al., 2003; McGlone et al., 2007). Enfin, certaines afférences primaires de type C ne sont actives que dans des conditions pathologiques (inflammation tissulaire) et sont donc normalement silencieuses (Lynn, 1991; R. Schmidt et al., 1995). Elles représentent 10 à 20% de l'ensemble des fibres C (Cervero, 1994).

On peut aussi distinguer différents types de fibres afférentes primaires de type C en fonction de leurs caractéristiques moléculaires (Snider & McMahon, 1998). Il existe ainsi principalement deux sous-populations de fibres C nociceptives. Les premières, dites « peptidergiques », synthétisent et utilisent comme neurotransmetteur des peptides, notamment la substance P (SP) et le *calcitonin gene related peptide* (CGRP). Elles sont sensibles au facteur de croissance *nerve growth factor* (NGF) dont elles expriment le récepteur tyrosine-kinase spécifique (TrkA). Enfin, elles portent le récepteur *transient receptor potential vanilloïde 1* (TRPV1) sensible à des températures supérieures à 42°C (Caterina et al., 1997). Ce sont ces fibres qui sont à l'origine de l'inflammation neurogène. Les secondes, dites « non peptidergiques » – car elles n'expriment pas de neuropeptide – sont définies par la présence à leur surface du récepteur pour l'isolectine B4. Elles portent également la sous unité P2X3 du récepteur ionotrope de l'ATP et le récepteur tyrosine-kinase, TrkB, spécifique du *glial derived neurotrophic factor* (GDNF). A ces deux sous-populations s'est ajoutée récemment une troisième. Ces dernières fibres afférentes primaires de type C expriment spécifiquement le transporteur vésiculaire de type 3 (vesicular glutamate transporter 3 ou VGLUT3 ; (Seal et al., 2009) et représentent vraisemblablement les fibres qui véhiculent le toucher agréable (voir ci-dessus).

### 1.3. Les fibres afférentes primaires d'origine méningée

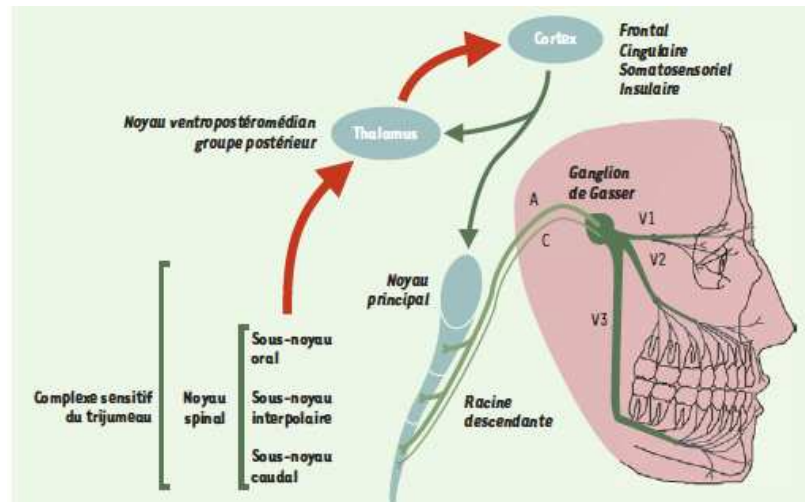
Deux types d'afférences primaires méningées, A $\delta$  et C, ont pu être identifiés sur la base des délais des réponses enregistrées aussi bien dans le ganglion de Gasser (Strassman et al., 1996) qu'au niveau du tronc cérébral (Schepelmann et al., 1999; Burstein et al., 1998; Levy & Strassman, 2002; Pantelev et al., 2005). Ainsi, la réponse des neurones trigéminaux à une stimulation électrique des méninges présente le plus souvent deux composantes, correspondant à des fibres ayant des vitesses de conduction dans les gammes A $\delta$  (Burstein et al., 1998:  $> 2,0 \text{ m.s}^{-1}$ ; Pantelev et al., 2005:  $1,5\text{--}3,5 \text{ m.s}^{-1}$ ) et C (Burstein et al., 1998:  $0,5\text{--}2,0 \text{ m.s}^{-1}$ ; Pantelev et al., 2005:  $0,5\text{--}1 \text{ m.s}^{-1}$ ). Cependant, plusieurs auteurs ont aussi noté l'existence de fibres afférentes méningées beaucoup plus rapides (Strassman et al., 1996:  $11,6 \pm 4,1 \text{ m.s}^{-1}$ ; Levy & Strassman, 2002:  $>5 \text{ m.s}^{-1}$ ) et de gros diamètre (Strassman et al., 2004) qui les font classer à la limite supérieure des A $\delta$  et même A $\beta$ .

## 2. Le complexe sensitif du trijumeau

### 2.1. Organisation et afférences primaires

Le premier relais synaptique des informations somesthésiques oro-faciales et des méninges (douleur, température, proprioception et tact) se situe au niveau du complexe sensitif du trijumeau. Ce complexe s'étend à travers le tronc cérébral des premiers segments cervicaux jusqu'à la limite caudale du mésencéphale. Il comporte deux noyaux : rostralement le noyau principal (plus spécifiquement dédié aux messages non nociceptifs) et caudalement le noyau spinal. Ce dernier est lui-même subdivisé en trois sous-noyaux qui sont dans le sens rostro-caudal : le sous-noyau oral (Sp5O), le sous-noyau interpolaire et le sous-noyau caudal (Sp5C) (Figure 2).

Dès leur entrée dans le tronc cérébral, la majorité des fibres afférentes primaires se divise en deux collatérales, l'une ascendante vers le noyau principal et l'autre descendante, qui abandonne au cours de son trajet de nombreuses collatérales dans les différents sous-noyaux du noyau spinal du complexe sensitif du V. Les afférences primaires ont des projections différentes en fonction de leur modalité et des tissus qu'elles innervent. Parmi les fibres de gros diamètre, les afférences cutanées (fibres A $\beta$ ) se projettent sur l'ensemble du complexe sensitif du trijumeau alors que les afférences musculaires ou articulaires (groupes I et II) – dont le corps cellulaire est au niveau du ganglion mésencéphalique – se projettent essentiellement au niveau du noyau principal et du sous-noyau oral (Shigenaga et al., 1988; Capra & Wax, 1989). Les fibres myélinisées de petit diamètre d'origine cutanées (fibre A $\delta$ ) se projettent sur les trois sous-noyaux du noyau spinal alors que celles qui proviennent des tissus profonds (groupe III) ne se projettent qu'au niveau du Sp5C. Enfin, quelle que soit leur origine, les fibres non myélinisées (C) se projettent exclusivement au niveau Sp5C (Nishimori et al., 1986) (Figure 2). En plus des afférences du V, le complexe sensitif du V reçoit des afférences d'autres nerfs crâniens (VII, IX et X), ainsi que des nerfs cervicaux supérieurs.



**Figure 2 : Organisation du complexe sensitif du trijumeau et ses connexions.**

Les flèches rouges illustrent les voies ascendantes issues du complexe sensitif du trijumeau ou du thalamus, et les flèches vertes les voies descendantes issues du cortex. A : fibres A ; C : fibres C ; V1 : nerf ophthalmique ; V2 : nerf maxillaire ; V3 : nerf mandibulaire (D'après Dallel, 2003).

## 2.2. Rôle fonctionnel

On considère le **noyau principal** et le **sous-noyau interpolaire** comme les relais de la sensibilité tactile discriminative et de la proprioception. Le **Sp5C** et le **Sp5O** sont les relais de la nociception.

En effet, chez les patients qui souffrent d'une lésion bulbaire détruisant le noyau spinal tout en épargnant la partie rostrale du complexe trigéminal, il existe une réduction ou une perte de sensibilité thermique et algique alors que la sensibilité tactile est préservée (Gérard, 1923). De plus, chez l'homme comme chez l'animal, la section chirurgicale de la racine descendante du trijumeau entraîne la déafférentation du seul Sp5C (tractotomie à l'obex) et produit une anesthésie thermo-algique du côté lésé sans modification de la sensibilité tactile (Gérard, 1923).

Cependant, les patients souffrant de douleurs de la cavité buccale ne sont pas soulagés après une telle tractotomie. Seules des sections plus rostrales ou la destruction du Sp5O sont efficaces (Graham et al., 1988). Ces informations suggèrent que le Sp5O est également impliqué dans l'intégration et la transmission des messages douloureux issus de la région orale. Il a effectivement été montré par la suite chez le rat qu'une tractotomie de l'obex n'abolit ni les comportements algiques oraux (Pajot et al., 2000; Dallel et al., 1989), ni la réponse des neurones du thalamus ventrobasal à la stimulation douloureuse oro-faciale

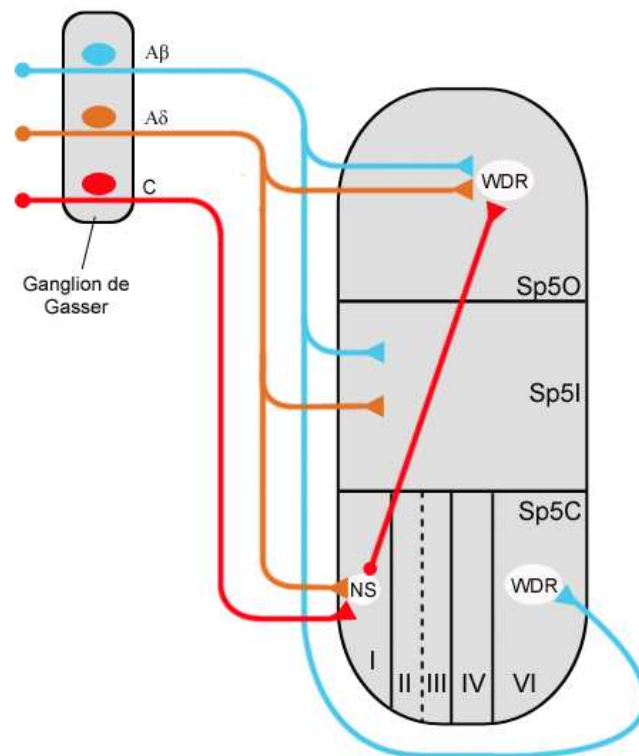
(Raboisson et al., 1989). Par ailleurs, il a été mis en évidence dans le Sp5O (comme dans le Sp5C) deux types de neurones nociceptifs (spécifiques et non spécifiques). Les neurones nociceptifs non spécifiques représentent la grande majorité des neurones de ce sous-noyau. Ils peuvent être activés par des stimulations non-douloureuses tactiles et nociceptives d'origine mécanique, thermique, chimique ou électrique de la région orale ou péri-orale. Ils répondent d'abord à la mise en jeu des fibres myélinisées de type A et pour des intensités de stimulation plus importantes à celles des fibres amyéliniques C. Ils codent de façon remarquable l'intensité des stimulations électriques ou mécaniques (Dallel et al., 1999). De plus, leurs réponses sont facilitées par l'inflammation (Hu et al., 1992), une désafférentation (Hu et al., 1999) ou encore lors du phénomène de windup (Dallel et al., 1999). Le windup est un modèle simple de sensibilisation centrale dans lequel la stimulation électrique répétitive à faible fréquence des afférences primaires de type C provoque une augmentation progressive des réponses des neurones nociceptifs centraux. Les propriétés des neurones à convergence du Sp5O sont très similaires à celles des neurones de la couche V de la corne dorsale de la moelle épinière (Besson & Chaouch, 1987). Il en résulte que ce sous-noyau peut être considéré comme un équivalent fonctionnel d'une couche V spinale (Dallel et al., 1998).

### **2.3. Communication intratrigéminal**

Il existe des connections intratrigéminales ascendantes et descendantes faisant communiquer entre eux les différents noyaux du complexe. Les connexions ascendantes entre Sp5C et Sp5O sont les mieux connues. Le blocage par le froid du Sp5C ou la tractotomie au niveau de l'obex inhibe les réponses des neurones non nociceptifs du Sp5O (Sessle & Greenwood, 1976), alors qu'une micro-injection de strychnine dans le Sp5C provoque plutôt une facilitation des réponses des neurones non nociceptifs du Sp5O (Khayyat et al., 1975). Ces données suggèrent que le Sp5C exerce un effet facilitateur tonique sur les neurones non nociceptifs du Sp5O. De plus la micro-injection de morphine dans le Sp5C déprime de manière naloxone réversible les réponses des neurones à convergence Sp5O lié à l'activation des fibres C (Dallel et al., 1998). Ceci suggère que le Sp5C sert de relais pour les informations véhiculées par les fibres C. Le Sp5O reçoit donc directement des messages nociceptifs dus à la mise en jeu des fibres A $\delta$  et indirectement des messages dus à la mise en jeu des fibres C via des interneurons des couches superficielles du Sp5C (Woda et al., 2004; Coste et al., 2008). En effet, une tractotomie à l'obex n'a pas ou peu d'effet sur la réponse à une stimulation nociceptive, orale ou péri-orale, qui recrute des fibres afférentes primaires de

type A $\delta$ , comme la stimulation de la pulpe dentaire, mais au contraire supprime celle d $\hat{u}$ e  $\grave{a}$  une stimulation qui recrute des fibres aff $\acute{e}$ rentes primaires de type C, comme le test au formol (Pajot et al., 2000; Dallel et al., 1989)

On n'observe pas de telle redondance de la nociception au niveau spinal. Sa signification n'est pas encore connue.



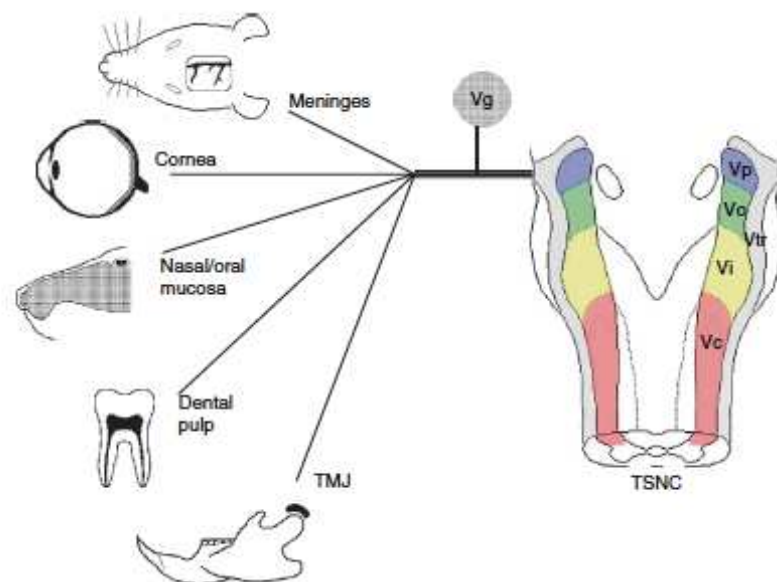
**Figure 3 : Communication intratrigéminalle : organisation du sous-noyau spinal.**

Sp5C : sous-noyau caudal ; Sp5I : sous-noyau interpolaire ; Sp5O : sous-noyau oral ; NS : neurone nociceptif spécifique ; WDR : neurone « wide dynamic range »

### 3. Particularités du système trigéminal

Le trijumeau innerve une grande **diversité de tissus spécialisés**. Il assure l'innervation de tissus aussi différents que la peau, les muqueuses, les méninges, la pulpe dentaire, les articulations temporo-mandibulaires (Figure 4). Certains de ces tissus comme la pulpe dentaire, la cornée ou la dure-mère ne possèdent pas de fibre afférente de type A $\beta$ , et ne sont en général capables de provoquer qu'une sensation de douleur suite à tous types de stimulations, nociceptives ou non (Feindel et al., 1960; Kenshalo, 1960; Beuerman & Tanelian, 1979; Trowbridge et al., 1980). Les afférences sensorielles innervant les muqueuses

oculaires, nasales et orales sont très sensibles aux agents chimiques volatiles (Cometto-Muñiz & Cain, 1995). La cornée est le tissu le plus innervé du corps (Rózsa & Beurman, 1982) et le seul dans lequel les fibres nerveuses pénètrent les couches épithéliales externes (Müller et al., 1996). Elle peut ainsi détecter d'infimes variations de température et d'humidité ou un corps étranger à la surface de l'oeil. De plus, le trijumeau innerve cette partie unique de notre corps qui comporte les récepteurs sensoriels ultra-spécialisés de nos cinq sens. Il innerve, de manière spécialisée, des récepteurs sensoriels telles que les papilles gustatives, la muqueuse nasale.



**Figure 4 : Diversité des tissus cranio-faciaux innervés par le nerf trijumeau.**

(d'après Bereiter, 2008).

La proportion de fibres afférentes primaires de type A et C au niveau trigéminal est différente de celle des autres nerfs sensitifs. Les **fibres C** ne représentent que **40%** des afférences trigéminales (Lazarov, 2002), alors qu'elles représentent 70% des afférences spinales (Millan, 1999). De même, la proportion des fibres sympathiques semble bien moindre dans le nerf trijumeau que dans les nerfs spinaux (Hoffmann & Matthews, 1990). Cela pourrait expliquer l'incidence moindre de syndromes douloureux régionaux complexes au niveau cranio-facial que dans les autres parties du corps (Matthews, 1989).

Les corps cellulaires des afférences primaires somato-sensorielles trigéminales sont situés dans le ganglion de Gasser. Par contre les corps cellulaires des fibres proprioceptives de



gros diamètre, musculaires et articulaires, sont situés dans le noyau mésencéphalique. Les prolongements centraux des fibres trigéminales constituent la racine du V. Alors que les ganglions de la moelle ne présentent aucune organisation apparente, une **somatotopie** existe à la fois dans le ganglion de Gasser et dans la racine sensitive avec la division mandibulaire en position dorsale, la division ophtalmique en position ventrale et la division maxillaire entre les deux (Aigner et al., 2000; Arvidsson et al., 1992; Marfurt, 1981).

Le Sp5C est donc un lieu de grande convergence pour des afférences de différents tissus, régions anatomiques et modalités. Cela signifie qu'un même neurone peut être activé indifféremment par des stimuli appliqués sur des tissus éloignés les uns des autres tels que la peau, les muqueuses, la pulpe dentaire, les articulations temporo-mandibulaires, les muscles ou les méninges. Selon une étude de Sessle (Sessle et al., 1993), 70% des neurones enregistrés dans le Sp5C ont un champ récepteur cutané pur, 20% ont à la fois des champs récepteurs cutanés et profonds et seulement 10% ont un champ récepteur profond. Donc la majorité des neurones dits « profonds » ont aussi un champ récepteur cutané. De plus, l'activation d'afférences nociceptives profondes est capable d'induire une expansion des champs récepteurs à la fois profonds et cutanés (Yu et al., 1993). Ainsi les douleurs des tissus profonds sont souvent ressenties et décrites par les patients au niveau cutané. On comprend alors la difficulté de localiser une douleur céphalique chez ces patients. La fréquence de survenue de douleurs référées pour la plupart des odontalgies et céphalées peut constituer un véritable piège diagnostique. Le Sp5C reçoit également un contingent de fibres des racines sensibles de C1 à C3 (responsables entre autres de l'innervation des muscles de la nuque). Cette interaction anatomique du Sp5C et de la moelle cervicale expliquerait la projection de douleurs d'origine cervicale au niveau de la face ou celle de douleurs d'origine dentaire vers le cou et la face. Le Sp5C reçoit aussi des afférences du nerf vague. Cette relation très particulière avec le système nerveux autonome et notamment l'influx parasympathique contribue à la symptomatologie de certaines douleurs cranio-faciales telles que les algies vasculaires de la face par exemple (Edvinsson & Uddman, 2005). Une stimulation expérimentale douloureuse des tissus cranio-faciaux chez l'homme entraîne une vasodilatation à long terme des régions oro-faciales (Izumi, 1999), ce qui n'est observé dans aucune autre partie du corps. Ceci suggère l'existence de mécanismes réflexes vasodilatateurs spécifiquement trigéminaux. De plus, contrairement à la moelle où presque tous les nerfs sensitifs ont un premier relais dans la corne dorsale ou dans les noyaux de la colonne dorsale, de nombreuses afférences trigéminales, notamment celles de la branche mandibulaire, se projettent directement sur des noyaux du tronc cérébral contrôlant les influx autonomes

comme le noyau du faisceau solitaire et le complexe parabrachial (Marfurt & Rajchert, 1991; Panneton et al., 1994; Panneton, 1991).

On note aussi des différences de réponses face à une lésion tissulaire. Certains neurones peptidergiques trigéminaux peuvent subir des changements morphologiques tels que le « sprouting » à la suite d'une lésion inflammatoire (Byers & Närhi, 1999). Ce phénomène n'est pas observé pour les fibres sympathiques trigéminales contrairement aux fibres sympathiques spinales (Bongenhielm et al., 1999; Benoliel et al., 2001). A la suite d'une axotomie, l'activité ectopique apparaît beaucoup plus importante au niveau spinal qu'au niveau trigéminal (Tal & Devor, 1992). Ainsi la fréquence et la rythmicité des décharges spontanées sont significativement plus importantes au niveau des premiers qu'au niveau des seconds, pour les fibres myélinisées comme non myélinisées. Ceci pourrait expliquer, en partie, la résistance de la région céphalique à développer des douleurs neuropathiques suite à une lésion nerveuse.

Les neurones du trijumeau pourraient enfin être spécifiquement sensibles aux oestrogènes. En effet, les oestrogènes paraissent altérer la transcription de gènes sélectivement dans les neurones du trijumeau, provoquant notamment une augmentation de l'expression de neuropeptides, comme la prolactine, qui sensibilisent les réponses neuronales à la capsaïcine ou au chaud nociceptif (Diogenes et al., 2006). Chez des rats femelles ovariectomisées, l'hyperalgésie provoquée par une injection sous-cutanée de formol est significativement plus importante si cette injection est pratiquée au niveau de la face, comparée à la même injection au niveau de la patte postérieure (Pajot et al., 2003). Cette hypersensibilité spécifique de la face serait liée à une surexpression des récepteurs oestrogéniques dans le Sp5C suite à l'ovariectomie. Ainsi un manque d'hormones ovariennes induirait une augmentation site-spécifique de la sensibilité à une stimulation nociceptive. Ces résultats suggèrent donc que la sensibilité à la douleur au niveau céphalique est spécifiquement modulée par les oestrogènes. Ceci pourrait en partie expliquer la différence de prévalence, en fonction du sexe, observée pour la plupart des douleurs chroniques de la face (migraine 2 à 4 femmes pour 1 homme (Stewart et al., 1992; Steiner et al., 2003); stomatodynie 3 à 20 femmes pour 1 homme (Gorsky et al., 1991; Lamey & Lewis, 1989; Tammiala-Salonen et al., 1993). Cependant, la présence comme l'absence d'oestrogènes semblent augmenter la sensibilité à la douleur céphalique. Ainsi la prévalence de la migraine et des dysfonctions temporo-mandibulaires est beaucoup plus importante chez la femme en période pubertaire que chez la femme ménopausée ou prépubertaire (Stewart et al., 1992; Steiner et al., 2003; Gonçalves et al., 2010). Par contre la plupart des patientes qui présentent une stomatodynie sont ménopausées ou en cours de ménopause (Gorsky et al., 1991).

### III. LE SOUS-NOYAU CAUDAL

Seul, dans le système sensitif trigéminal, le sous-noyau Sp5C reçoit l'ensemble des fibres afférentes primaires, de types A $\beta$ , A $\delta$  et C. Comme la corne dorsale de la moelle, le Sp5C présente une **structure laminaire**, ses cinq couches étant identiques aux couches les plus superficielles, I à V, de la corne dorsale de la moelle épinière. Les terminaisons des fibres afférentes primaires épousent cette structure laminaire : les fibres fines (de type A $\delta$  et C), incluant la majorité des afférences nociceptives, se terminent dans les couches les plus superficielles (I-II), tandis que celles de gros diamètre, qui transmettent l'information tactile, se terminent dans les couches plus profondes (III-V). Plus récemment, il a été montré, que la corne dorsale présente aussi une **structure modulaire** (Lu & Perl, 2005). En effet, il a été noté une répétition de connexions excitatrices entre des neurones spécifiques de différentes couches et recevant des afférences primaires de différents types. La corne dorsale serait ainsi constituée de la juxtaposition de modules, comme d'autres régions du cerveau (Lorente de No, 1938; Mountcastle, 1957; Leise, 1990). Ces modules serviraient une fonction commune : combiner des informations de modalités différentes provenant d'une même région du corps et transmettre aux neurones de projection de la couche I, et donc au cerveau, une synthèse du traitement de ces différentes informations.

Nous présenterons donc essentiellement des résultats obtenus dans la corne dorsale de la moelle, où la plupart des travaux ont été effectués. Cette description sera centrée essentiellement sur les couches I-III de Rexed (Rexed, 1952). D'une part, cette région inclut la zone de terminaison majeure des afférences primaires nociceptives (I-II) et l'origine de l'un des deux faisceaux majeurs (couche I) de projection de la nociception de la corne dorsale vers le cerveau. D'autre part, elle est vraisemblablement directement impliquée dans la physiopathologie des manifestations cliniques des douleurs chroniques comme l'hyperalgie et l'allodynie.

## 1. Cytoarchitecture du Sp5C

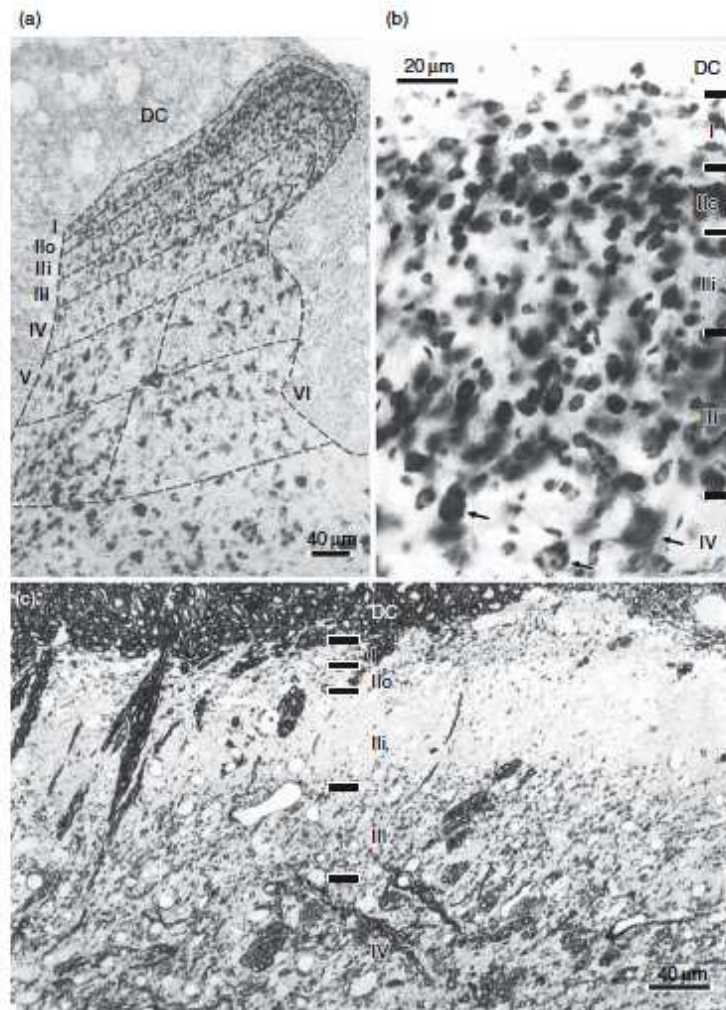
Rexed a divisé les cornes dorsales en six couches parallèles selon la taille, la morphologie et la densité des neurones (Figure 5). Etabli initialement chez le chat (Rexed, 1952), ce schéma d'organisation a été étendu à d'autres espèces (rat, singe, homme). Les couches I-II sont souvent appelées couches superficielles et les couches III-VI, couches profondes. Le Sp5C ne présente que les cinq premières de ces couches.

La couche I ou couche marginale, très fine, présente une très faible densité de cellules (Figure 5). Sur des coupes colorées, on voit quelques rares gros neurones (neurones de projection) au milieu de vastes plages de petits neurones (interneurones). Les neurones de projection de la couche I forment une des voies efférentes principales de la corne dorsale/Sp5C.

La couche II est aussi nommée substance gélatineuse car l'absence de fibres myélinisées lui donne un aspect translucide sur des coupes non colorées (Ribeiro-da-Silva 2003). Sur des coupes colorées, elle apparaît plus dense que la couche I, avec des cellules de taille relativement petite mais homogène. Tous ces neurones sont des interneurones. Cette couche II peut être divisée en une partie externe (II<sub>e</sub>) et une partie interne (II<sub>i</sub>), en fonction de la densité cellulaire, plus grande dans la première que dans la seconde. Enfin, la partie ventrale de cette couche II<sub>i</sub> contient des interneurones qui concentrent spécifiquement la sous-unité  $\gamma$  de la protéine kinase C (PKC $\gamma$ ), nommés par la suite neurones PKC $\gamma$  (Malmberg et al., 1997).

La couche III comporte également une forte densité de neurones mais ils ont une taille plus importante que ceux de la couche II. Les couches IV à VI sont beaucoup moins denses et plus hétérogènes, avec des neurones de tailles variées. La plupart de ces neurones sont des interneurones. Ces couches profondes (III-VI pour la corne dorsale ; III-V pour le Sp5C) contiennent aussi des neurones de projection mais dispersés. Ces neurones forment la seconde voie efférente de la corne dorsale/Sp5C (Koltzenburg & Scadding, 2001).

Il est important de souligner ici que les interneurones forment la très grande majorité (>95%) des neurones de la corne dorsale/Sp5C (Spike et al., 2003).



**Figure 5 : Couches de Rexed au niveau C4 de la moelle épinière d'un rat adulte.**

(a) et (b) Coupes microscopiques de 50µm d'épaisseur, colorées au bleu de toluidine comme décrit par Rexed (1952) (a) représente l'ensemble de l'organisation laminaire de la corne dorsale. (b) La couche I montre une faible densité de cellules, alors que la couche II externe (II<sub>e</sub>) se démarque par un amas de petits neurones, qui la différencie de la couche II interne (II<sub>i</sub>). Les couches II<sub>i</sub> et II<sub>e</sub> ont de nombreux petits neurones de taille relativement uniforme. La présence de quelques neurones légèrement plus larges sépare la couche II<sub>i</sub> de la couche III, alors que la couche IV se distingue facilement de la couche III par une plus faible densité de cellules et la présence de quelques larges neurones. (c) représente une coupe microscopique de 2µm d'épaisseur de section transversale de corne dorsale de rat au niveau de C4, colorée au bleu de toluidine et Azur II, pour montrer que les couches de Rexed peuvent être identifiées sur coupes et peuvent être utilisées comme référence.

## 2. Terminaisons centrales des afférences primaires

Les terminaisons des afférences primaires dépendent de leur origine périphérique (cutanée, articulaire, viscérale), vitesse de conduction (fonction de leur diamètre et de la présence de myéline), propriétés de la réponse (modalité sensorielle, intensité du stimulus nécessaire pour les activer) et phénotype neurochimique (comme la présence de neuropeptides). Bien entendu ces caractéristiques peuvent être reliées entre elles. Ainsi, les afférences myélinisées de large diamètre (Aβ) sont aussi les mécanorécepteurs à bas seuil,

répondant au toucher et aux mouvements des poils. La plupart des fibres de petit diamètre, myélinisées (A $\delta$ ) ou non (C), véhiculent la douleur et la sensibilité à la température.

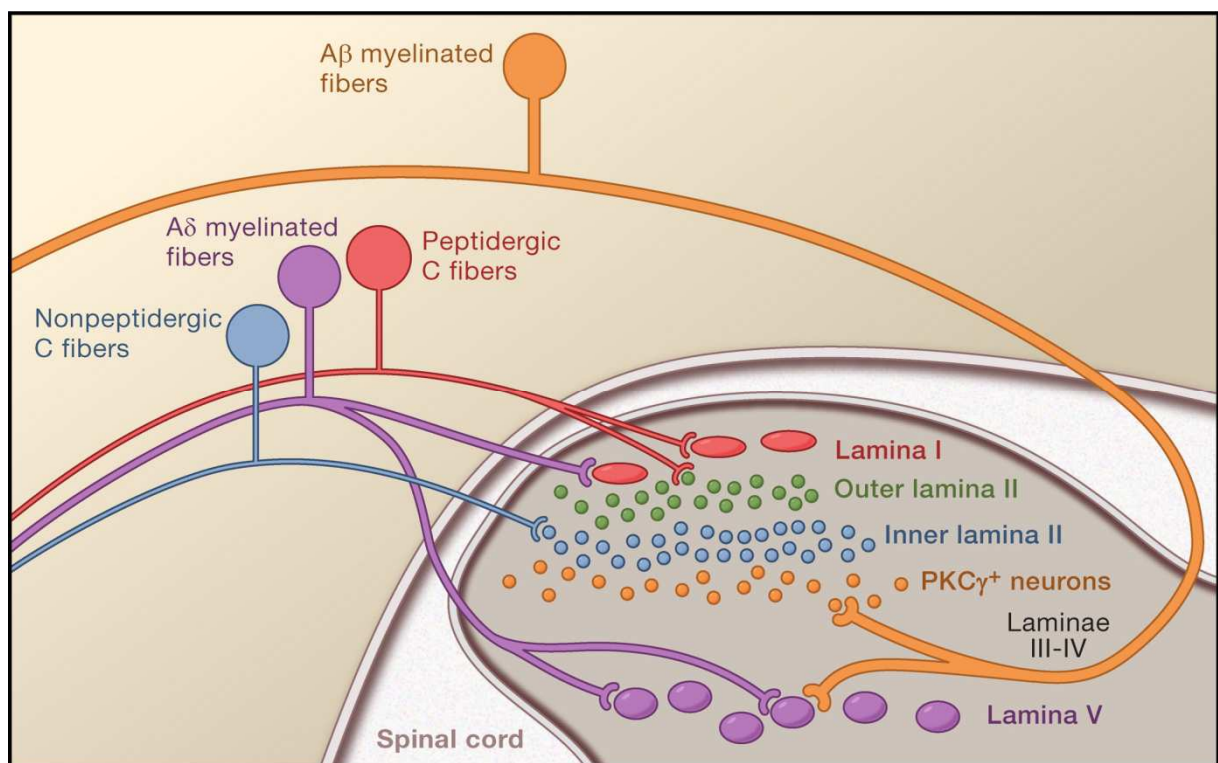
En ce qui concerne les fibres afférentes primaires d'origine cutanée, les fibres A $\beta$  se distribuent globalement dans les couches profondes III-V (Rexed, 1952). On a montré chez le rat que des collatérales de ces afférences primaires A $\beta$  contactent directement les neurones PKC $\gamma$  au niveau de la couche II<sub>i</sub> (Hughes et al., 2003; Neumann et al., 2008). Il existe deux types de fibres afférentes primaires A $\delta$ . Les premières, ayant un seuil mécanique bas, non nociceptives, innervent les follicules pileux (D-hair afferents) et se projettent dans la partie la plus superficielle de la couche III et de façon extensive dans la couche II interne (Light & Perl, 1979). Les secondes, nociceptives, se distribuent dans les couches I et II externes et également dans la couche V. Certaines collatérales se terminent également dans la partie ventrale de la couche IV. Les terminaisons des fibres afférentes primaires nociceptives de type C sont fonction de la nature neurochimique de ces fibres (Hunt & Rossi, 1985; Nagy & Hunt, 1982; Hunt & Mantyh, 2001; Julius & Basbaum, 2001; McMahon, 1998). Chez le rat, les fibres C peptidergiques se distribuent dans les couches I et II<sub>e</sub>, alors que les fibres C non-peptidergiques se terminent quasi exclusivement dans la couche II<sub>i</sub> (Ribeiro-Da-Silva et al., 1986; Guo et al., 1999; Silverman & Kruger, 1988; Bennett et al., 1998). Enfin les fibres C, qui expriment le transporteur vésiculaire glutamatergique de type 3 (VGLUT3) et qui sont fonctionnellement des mécanorécepteurs à bas seuil (toucher plaisant, voir ci-dessus), se terminent à la partie ventrale de la couche II<sub>i</sub>, là où se concentrent les neurones PKC $\gamma$  (Seal et al., 2009). Ainsi, il est intéressant de noter que cette couche de neurones PKC $\gamma$  forme une limite entre les projections des fibres afférentes primaires, ventrales, qui véhiculent la sensibilité tactile, et celles des fibres afférentes primaires, dorsales, qui véhiculent la sensibilité douloureuse et thermique, et ce, quelle que soit la nature anatomique de ces fibres afférentes primaires.

En ce qui concerne les fibres afférentes primaires d'origine profonde (viscérale, méningée), elles sont toutes nociceptives. Les fibres A $\delta$  se terminent dans les couches I, IV et V et les fibres C, toutes de type peptidergique, se terminent dans les couches I, II, V et X. De façon générale, les projections centrales des fibres nociceptives d'origine cutanée se font de façon dense et focalisée alors que celles des fibres profondes sont beaucoup plus diffuses. Ces différences pourraient expliquer le caractère diffus des douleurs d'origine profonde (Sugiura et al., 1989).

D'un point de vue fonctionnel, l'entrée synaptique des fibres nociceptives dans les couches superficielles doit être considérée schématiquement selon deux régions différentes. Dans la couche I, les contacts interviennent sur des neurones de projection participant aux

voies spino-réticulaire et spino-thalamique impliquées dans la nociception et la thermoception (Craig & Kniffki, 1985; Ikeda et al., 2003; Perl, 1984). Dans la couche II, les entrées activent un circuit polysynaptique local (Szentagotai, 1964; Pearson, 1952; Light, 1992) (Figure 6). Cette ségrégation suggère que les processus ayant lieu dans la couche II permettent un traitement concomitant de l'information sensorielle et une modulation du message (Lu & Perl, 2005).

Des études électrophysiologiques confirment ces données anatomiques. Les neurones spinaux de la couche I répondent généralement aux stimulations nociceptives (via les fibres A $\delta$  et C), les neurones des couches III et IV répondent de manière préférentielle aux stimulations non nociceptives (via les fibres A $\beta$ ), et les neurones de la couche V reçoivent à la fois des afférences nociceptives et non nociceptives (via des afférences monosynaptiques A $\beta$  et A $\delta$  et polysynaptiques C). Cette couche est donc une zone de convergence (afférences nociceptives, non nociceptives, viscérales, somatiques).



**Figure 6 : Projections centrales des afférences primaires**

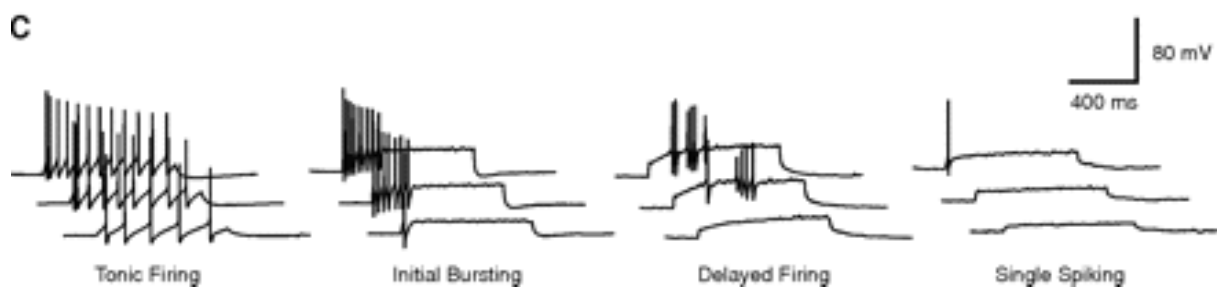
Il existe une organisation laminaire très précise de la corne dorsale de la moelle épinière. Les groupes de fibres afférentes primaires contactent les neurones spinaux dans les différentes couches. Les fibres fines C non-myélinisées, peptidergiques (rouge) et myélinisées de type A $\delta$  (violet) se terminent majoritairement dans les couches superficielles, faisant synapse sur les gros neurones de projection (rouge) localisés dans la couche I et les interneurons (verts) localisés dans la couche II<sub>e</sub>. Les fibres fines C non-myélinisées, non-peptidergiques (bleu) se terminent sur les interneurons (bleu) dans la partie interne de la couche II (II<sub>i</sub>). Par contre, les afférences non nociceptives véhiculées par les fibres myélinisées de type A $\beta$  (orange) se terminent sur les interneurons PKC $\gamma$  dans la partie ventrale de la couche II<sub>i</sub>. Un second groupe de neurones de projection dans couche V (violet) reçoit des afférences des fibres A $\delta$  et A $\beta$  (d'après Basbaum et al., 2009).

### 3. Interneurones

#### 3.1. Types d'interneurones dans la corne dorsale superficielle

Avec l'avènement des techniques d'enregistrement *in vitro*, il est devenu possible de corréler les propriétés électrophysiologiques et morphologiques des neurones enregistrés. Ces études ont souligné la grande hétérogénéité de ces interneurones. La classification la plus généralement admise a été développée par Grudt et Perl (2002).

La classification électrophysiologique est basée sur la réponse des neurones à l'injection d'un courant dépolarisant. Quatre types de réponses neuronales ont pu ainsi être identifiés : « tonic firing », « initial bursting », « delayed firing », et « single spiking » (Grudt & Perl, 2002; Prescott & De Koninck, 2002; Ruscheweyh & Sandkühler, 2002; Thomson et al., 1989; Lopez-Garcia & King, 1994) (Figure 7).

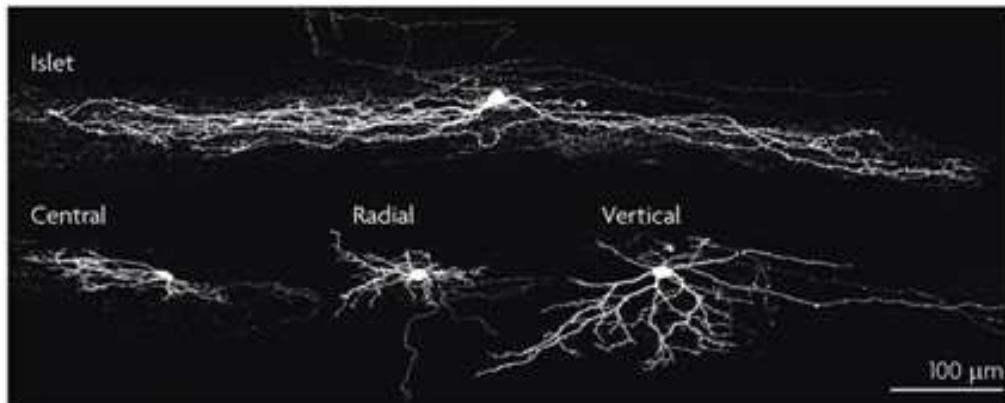


**Figure 7 : Réponses de quatre types de neurones à des courants dépolarisants croissants (de bas en haut)**

De la gauche vers la droite : Les neurones « Tonic firing » déchargent continuellement pendant le courant dépolarisant et la fréquence des potentiels d'action (PA) augmente avec l'intensité du courant ; les neurones « Initial bursting » adaptent au cours du courant dépolarisant et la décharge de PAs reste limitée au début de l'impulsion du courant ; les neurones « delayed firing » présentent une longue latence avant d'initier une décharge de PAs ; les neurones « single spiking » ne donnent qu'un, voir deux PAs quelque soit l'intensité du courant dépolarisant.

Au niveau de la couche II, quatre types morphologiques distincts sont généralement identifiés : « islet, central, vertical, et radial cells » (Grudt & Perl, 2002; Heinke et al., 2004; Melnick, Santos, Szokol, et al., 2004; Melnick, Santos & Safronov, 2004). Ces différents types de cellules diffèrent par la taille de leur corps cellulaire et l'orientation et l'étendue de leur arbre dendritique (Figure 8). Cependant, il est important de noter que beaucoup de ces études morphologiques incluent une proportion importante (~30%) de cellules non classées.





**Figure 8 : Classification des interneurons de la couche II par Grudt et Perl**

Typiquement les neurones de type « Islet » ont des arbres dendritiques allongés ( $>400\mu\text{m}$ ) dans l'axe rostro-caudal, avec des petites extensions dorso-ventrales et medio-latérales. Les neurones de type « central » sont similaires mais ont un arbre dendritique beaucoup plus court ( $<400\mu\text{m}$ ). Les neurones de type « radial » présentent une arborisation dendritique compacte avec des dendrites irradiant dans toutes les directions. Les neurones de type « vertical » ont un corps cellulaire en position dorsale et des dendrites qui se déploient ventralement. Des colorations immunohistochimiques des axones avec des anticorps contre les transporteurs de vésicules glutamatergiques (VGLUT2) et les transporteurs des vésicules GABA (VGAT) montrent que les cellules « islet » sont GABAergiques alors que les autres cellules sont glutamatergiques, les cellules « verticales » étant GABAergiques ou glutamatergiques.

Jusqu'à maintenant, aucune corrélation entre les types électrophysiologiques et morphologiques n'a pu être établie pour les interneurons de la couche II. Par contre, une corrélation entre le type anatomique et le neurotransmetteur utilisé par le neurone a été récemment retrouvée : les neurones de type « islet » sont invariablement GABAergiques, les neurones de types « radial » et la plupart des neurones de type « vertical » sont glutamatergiques et les neurones de type « central » sont GABA- ou glutamatergiques (Maxwell et al., 2007 ; Yasaka et al., 2007).

Au niveau de la couche I, on a décrit trois types morphologiques de neurones : pyramidal, fusiforme et multipolaire (Lima & Coimbra, 1986; Han et al., 1998). Là, une corrélation claire entre les types électrophysiologiques et morphologiques pour les interneurons de cette couche a pu être établie avec les neurones « toniques » typiquement « fusiformes », les neurones « phasiques » « pyramidaux », et les neurones de type « delayed onset » et « single spike » « multipolaires » (Prescott & De Koninck, 2002).

### 3.2. Interneurones : une organisation modulaire ?

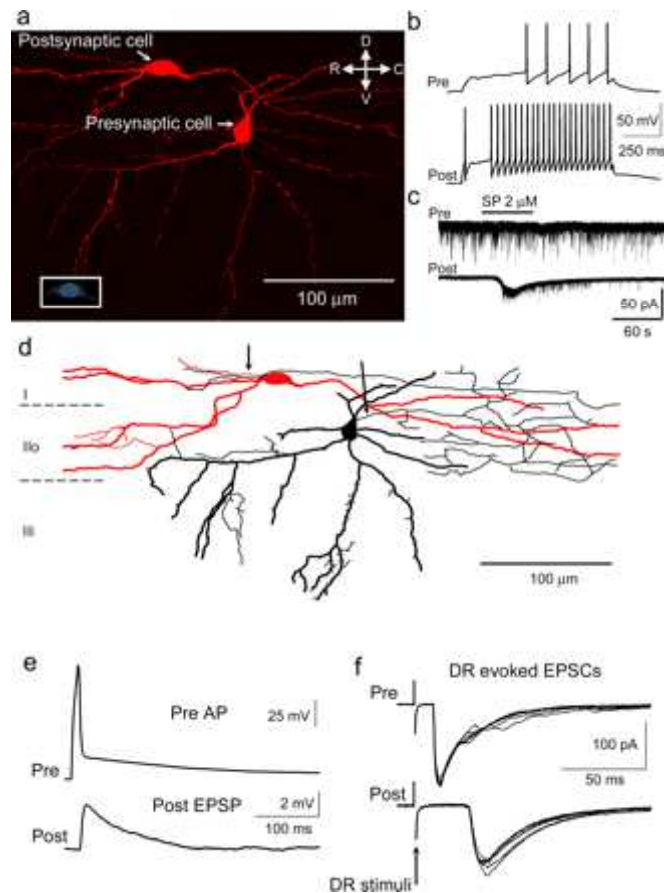
La majorité des neurones de cornes dorsales sont des interneurones, dont la densité est particulièrement importante dans les couches I-III. Ils représentent la totalité des neurones de la couche II et la grande majorité des neurones des couches I et III. On peut les diviser en deux classes distinctes, les interneurones excitateurs glutamatergiques et les interneurones inhibiteurs GABAergiques et /ou glycinergiques (Todd & Spike, 1993). La plupart sont de petits neurones dont les axones arborisent dans le même segment, en général à proximité de leur corps cellulaire (Beal & Cooper, 1978; Bennett et al., 1980; Gobel, 1978; Light & Perl, 1979; Lima & Coimbra, 1986; Scheibel & Scheibel, 1968; Schneider, 1992). Toutefois, il existe aussi au sein de la couche II une proportion notable de neurones projetant leurs axones rostralement ou caudalement à travers un ou deux segments de moelle épinière (Cervero & Iggo, 1980) et parfois davantage (Bice & Beal, 1997). Certains interneurones émettent des axones en direction d'autres couches des cornes dorsales. Par exemple, des interneurones de la couche II projettent sur la couche I ou sur les couches III-IV et des neurones des couches III-V projettent sur les cornes antérieures.

Un des moyens de caractériser les fonctions d'un réseau neuronal, est d'établir des classes d'interneurones dans la corne dorsale en fonction de la morphologie, du neurotransmetteur utilisé, des inputs synaptiques, des propriétés électrophysiologiques, et du phénotype moléculaire (chapitre précédent).

Une fois une population spécifique de neurones de la corne dorsale bien individualisée avec des propriétés bien définies, la question suivante est : quel est le rôle fonctionnel de ces neurones dans le réseau de la corne dorsale ? En particulier, quelles sont leurs connexions synaptiques ? La technique la plus achevée pour étudier cette connectivité est d'enregistrer simultanément des neurones (enregistrements en patch-clamp dans des tranches de moelle épinière). Cela permet de déterminer si ces neurones sont synaptiquement couplés tout en établissant leurs propriétés morphologiques et électrophysiologiques et leurs afférences synaptiques (Figure 9).

Lu et Perl ont décrit le résultat d'enregistrements de paires de neurones dans la corne dorsale (Lu & Perl, 2005; Lu & Perl, 2003). Seuls 10% des paires de neurones enregistrées étaient connectées. Ces connexions étaient unidirectionnelles avec approximativement la même proportion de connexions inhibitrices et excitatrices. Ces auteurs ont identifié une seule configuration de connexions inhibitrices (GABAergique monosynaptique) : entre un neurone de type « islet » et un neurone de type « central » dans la couche II (Lu & Perl, 2003). Ces deux neurones, pré- et postsynaptiques, reçoivent tous deux des afférences monosynaptiques

de type C. Cependant cette afférence primaire active toujours le neurone présynaptique en avance par rapport au neurone postsynaptique. Il est tentant de conclure que cette connexion permet à un neurone inhibiteur de type « islet » de réduire l'excitation du neurone postsynaptique de type « central » en cas d'activation massive par les afférences primaires.

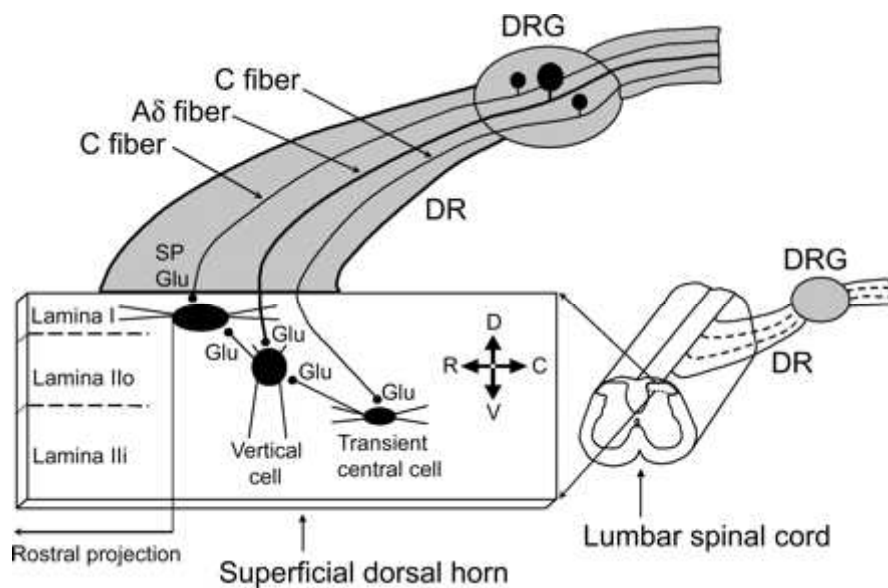


**Figure 9 : Connexion monosynaptique excitatrice entre un neurone de type « vertical » de la couche II<sub>c</sub> et un neurone de projection de la couche I**

**a.** Images confocales des cellules connectées. Le neurone vertical de la couche II<sub>c</sub>, présynaptique et le neurone de la couche I, postsynaptique. Insert en bas à gauche : le fluorogold transporté rétrogradement depuis la moelle thoracique marque la cellule de la couche I. **b.** Réponses (potentiels d'action) à un courant dépolarisant des deux neurones connectés. **c.** Enregistrements simultanés des deux neurones (voltage-clamp) montrant un courant entrant dans le neurone de la couche I, mais non dans le neurone de la couche II, évoqué par la substance P (2 μM). **d.** Reconstruction des neurones : neurone de type « vertical » de la couche II<sub>c</sub>, présynaptique (noir) et neurone de la couche I, postsynaptique (rouge). Les flèches désignent les axones. **e.** Enregistrements simultanés des deux neurones (voltage-clamp) montrant les connexions synaptiques entre les deux neurones (moyenne de 50 traces successives; potentiel de membrane : -60 mV pour les deux cellules). **f.** Enregistrements simultanés des deux neurones (voltage-clamp) montrant les CPSEs évoqués par stimulation de la racine dorsale (potentiel de membrane : -60 mV pour les deux cellules). Superposition de cinq réponses. Le neurone vertical reçoit une afférence monosynaptique de type Aδ ; le neurone de la couche I reçoit une afférence monosynaptique de type C. C : Caudal; D : dorsal; R : rostral; V : ventral; Pre : pré-synaptic; Post : post-synaptic; AP : potentiel d'action (D'après Lu et Perl, 2005).

En plus de ce type unique de connexion inhibitrice (d'un neurone de type « islet » vers un neurone de type « central »), Lu et Perl identifient deux types de connexions excitatrices : des neurones de type « central » de la couche II excitent des neurones de type « vertical » de

la couche II<sub>e</sub> qui, à leur tour, excitent des neurones dans la couche I, certains étant vraisemblablement des neurones de projection (Lu & Perl, 2005) (Figure 9). Les neurones de type « central » et les neurones de la couche I reçoivent des afférences primaires de type C, alors que les neurones de type « vertical » reçoivent des afférences primaires de type Aδ. Notons que la connexion inhibitrice (d'un neurone de type « islet » vers un neurone de type « central ») est compatible avec ce circuit excitateur disynaptique, le neurone de type « central » étant commun à ces deux circuits. La répétition de ce circuit de quatre neurones connectés entre eux constituerait un module récurrent (Lu & Perl, 2005).



**Figure 10 : Schéma représentant le « module » dans la corne dorsale superficielle** capable d'amplifier et moduler les informations véhiculées par les afférences primaires de type Aδ et C avant leur transfert vers le cerveau (d'après Lu et Perl, 2005)

Certains neurones de type « central » de la couche II ont une connexion monosynaptique glutamatergique vers des neurones de type vertical dans la couche II<sub>e</sub>. Certains neurones de type « vertical » de la couche II<sub>e</sub> établissent des connexions monosynaptiques glutamatergiques avec des neurones de la couche I, dont quelques uns ont des récepteurs à la substance P et contribuent aux projections rostrales. Tous ces neurones reçoivent des inputs monosynaptiques glutamatergiques des afférences primaires : les cellules « verticales », de type Aδ, et les cellules de la couche I et celles de type « central » de la couche II, de type C.

La fonction d'un tel module n'est encore que spéculative. Cependant on peut imaginer que les deux connexions excitatrices (d'un neurone de type « central » vers un neurone de projection de la couche I, en passant par un neurone de type « vertical ») forment un circuit

capable de combiner le traitement d'inputs de modalités différentes et d'envoyer vers le cerveau une synthèse de ces signaux par l'intermédiaire des neurones de projection de la couche I. Le traitement du message nociceptif pourrait être modulé par une diminution de l'excitation des neurones de type vertical – dans la mesure où ces neurones paraissent primordiaux dans la transmission de l'information vers les neurones de projection de la couche I – et/ou une augmentation de celle des neurones de type « islet ».

#### **IV. INHIBITION SYNAPTIQUE DANS LA CORNE DORSALE**

Le traitement du message nociceptif par le réseau neuronal de la corne dorsale et son passage vers le cerveau sont contrôlés par deux types de mécanismes : segmentaires et supra-segmentaires.

Au niveau segmentaire, la balance entre excitation et inhibition est cruciale pour maintenir une fonction sensorielle normale. Ainsi l'augmentation de l'activité des neurones et réseaux neuronaux responsables de la transmission du message nociceptif – ou « sensibilisation centrale » (Woolf, 1983) – associerait trois types de phénomènes : une potentialisation de synapses excitatrices, des modifications des propriétés membranaires des neurones et une réduction de l'inhibition synaptique (pour revue voir : Latremoliere & Woolf, 2009; Ji et al., 2003).

Les projections descendantes, provenant de diverses régions du cerveau, inhibent, ou au contraire facilitent, le transfert de l'information nociceptive de la corne dorsale vers le cerveau (pour revue, voir Millan, 2002) . Ces projections descendantes utilisent plutôt des neuromodulateurs – noradrénaline, sérotonine et dopamine – mais aussi le GABA (Antal et al., 1996). Elles peuvent exercer une inhibition tonique sur la transmission nociceptive dans la corne postérieure de la moelle comme les projections dopaminergiques descendantes provenant du noyau A11 de l'hypothalamus (Charbit et al., 2009; Lapirot et al., 2011).

Il est maintenant bien établi que, parmi tous ces mécanismes, une réduction de l'inhibition segmentaire joue un rôle primordial dans les manifestations cliniques des douleurs chroniques. On sait depuis les années 1980 que bloquer les récepteurs spinaux GABA<sub>A</sub> et/ou glycine, avec de la bicuculline et de la strychnine, respectivement, provoque une allodynie mécanique chez l'animal (Beyer et al., 1985; Roberts et al., 1986; Yaksh, 1989; Miraucourt et al., 2007; Miraucourt et al., 2009). Au contraire, l'injection intrathécale de GABA (Eaton et al., 1999; Hwang & Yaksh, 1997) ou de benzodiazépines (Knabl et al., 2008) diminue considérablement les douleurs inflammatoires et neuropathiques.

# 1. Neurotransmission inhibitrice dans la corne dorsale

## 1.1. Différents types de récepteurs

Les interneurons inhibiteurs de la corne dorsale de la moelle utilisent deux acides aminés,  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) et glycine, pour la transmission inhibitrice. Les récepteurs à la glycine (GlyR) sont uniquement postsynaptiques. Les récepteurs au GABA (GABAR) – qui sont de deux types : GABA<sub>A</sub> (GABA<sub>A</sub>R) et GABA<sub>B</sub> (GABA<sub>B</sub>R) – peuvent être pré- et postsynaptiques. Les GABARs présynaptiques sont présents (1) sur la terminaison inhibitrice elle-même, où ils réduisent la libération de neurotransmetteurs inhibiteurs, vraisemblablement en fonction de la fréquence de la stimulation (comme dans l'hippocampe : (Davies et al., 1991; Davies & Collingridge, 1993) mais aussi (2) sur les afférences excitatrices se terminant sur les neurones qu'ils contrôlent (synapses axo-axoniques). Ainsi le contrôle de la libération de neurotransmetteurs par les GABARs présynaptiques s'exerce, non seulement sur la synapse inhibitrice elle-même (autorécepteurs) mais aussi sur d'autres synapses (hétérorécepteurs), notamment la synapse excitatrice fibre afférente primaire-neurone de second ordre dans la corne dorsale.

D'un point de vue mécanistique, on distingue deux types de récepteurs : ionotropiques – GABA<sub>A</sub>R et GlyR – et métabotropiques - GABA<sub>B</sub>R.

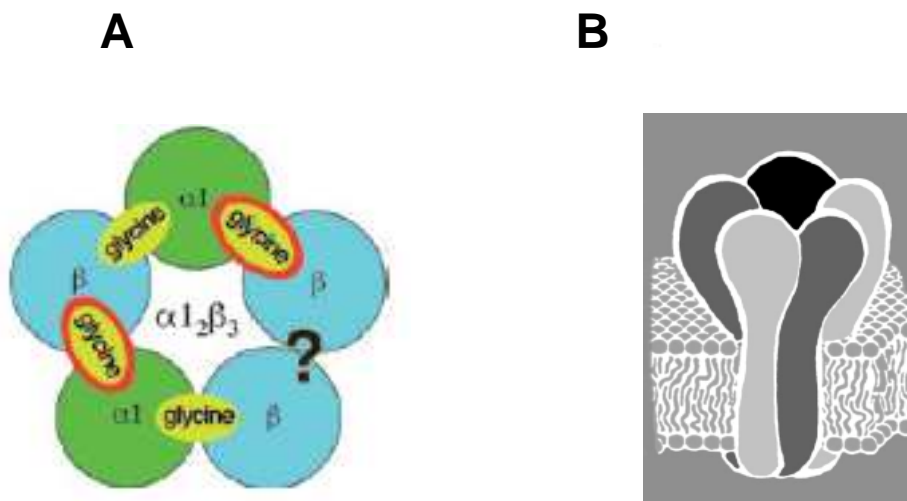
### 1.1.1. Récepteurs ionotropiques

Les GlyRs (sensibles à la strychnine) et GABA<sub>A</sub>R (sensibles à la bicuculline) appartiennent à la famille Cys-loop de canaux pentamériques déclenchés par un ligand. Les canaux GlyRs et GABA<sub>A</sub>Rs sont sélectifs pour les anions : principalement le Cl<sup>-</sup>, mais aussi le HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Ils résultent de l'association de cinq sous-unités différentes (hétéropentamères) (Figure 11). Ces sous-unités présentent une structure générale identique comportant (1) un long domaine N-terminal extracellulaire incluant le site de liaison pour le ligand – en fait à l'interface entre deux sous-unités (Figure 11) – et une boucle caractéristique due à une liaison disulfite entre deux cysteines (Cys-loop), (2) quatre domaines transmembranaires – le 2nd bordant le canal ionique – avec une longue boucle intracellulaire entre les 3èmes et 4èmes domaines transmembranaires et (3) un domaine C-terminal extracellulaire relativement court.

Concernant, les GlyRs, quatre sous-unités ( $\alpha$ 1–4) et une seule sous-unité  $\beta$  ont été identifiées jusqu'à présent. Dans la moelle adulte, les GlyRs associent, le plus souvent, deux sous-unités  $\alpha$ , de type  $\alpha$ 1, à trois sous-unités  $\beta$  (Figure 11A). On trouve aussi la sous-unité de

type  $\alpha 3$ , mais à un niveau moindre que la sous-unité de type  $\alpha 1$ . La sous-unité de type  $\alpha 3$  semble cependant jouer un rôle clé dans la douleur inflammatoire (voir ci-dessous 2.1).

Seize sous-unités ( $\alpha 1-6$ ,  $\beta 1-3$ ,  $\gamma 1-3$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  et  $\pi$ ) ont été identifiées pour former des  $GABA_A R$ . Les combinaisons les plus fréquentes associent deux sous-unités  $\alpha$ , deux sous-unités  $\beta$  à une sous-unité  $\gamma 2$ , notamment  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  (Figure 11B). Les propriétés pharmacologiques des  $GABA_A R$ s dépendent de leur composition. Le site aux benzodiazépines se situe entre la sous-unité  $\gamma 2$  et une sous-unité  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ , ou  $\alpha 5$ . Les  $GABA_A R$ s contenant des sous-unités  $\alpha 4$  et  $\alpha 6$  ne sont donc pas sensibles aux benzodiazépines.



**Figure 11 : Schémas des récepteurs glycinergiques et  $GABA_A$ ergiques**

**A.** Schéma de l'arrangement pentamérique des sous-unités du GlyR hétéro-oligomère  $2\alpha 1 : 3\beta$ . Les sites de liaison pour la glycine sont situés à chaque interface entre les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  (interfaces  $\alpha\beta$  et  $\beta\alpha$ ). Seules les interfaces  $\beta\alpha$  (entourées de rouge) sont capables de fixer aussi la strychnine. La pharmacologie de l'interface  $\beta\beta$  n'est pas actuellement connue (indiqué par ?). (Adapté de Betz & Laube, 2006). **B.** Schéma de l'arrangement pentamérique des sous-unités du  $GABA_A R$  hétéro-oligomère. Les différents niveaux de gris représentent les différentes sous-unités (non spécifiées ici) : deux sous-unités  $\alpha$ , deux sous-unités  $\beta$  et une seule sous-unité  $\gamma 2$  (Adapté de Olsen & Sieghart, 2008).

L'activation des GlyRs et  $GABA_A R$ s provoque l'ouverture d'un canal  $Cl^-$ . La concentration de  $Cl^-$  dans le neurone ( $[Cl^-]_i$ ) est contrôlée par l'activité de deux co-transporteurs : le co-transporteur  $Na^+ - K^+ - 2 Cl^-$  (NKCC1), qui transporte  $Na^+$ ,  $K^+$  et  $Cl^-$  vers l'intérieur de la cellule, et le co-transporteur  $K^+ - Cl^-$  (KCC2), qui, au contraire, transporte  $K^+$  et  $Cl^-$  vers l'extérieur de la cellule. Dans la plupart des neurones (et dans les conditions physiologiques)  $[Cl^-]_i$  est très inférieure à la concentration de  $Cl^-$  dans le milieu extracellulaire

( $[Cl^-]_o$ ) (Martin and Olsen, 2000) et le potentiel d'équilibre du  $Cl^-$  (dans la plupart des neurones) proche du potentiel membranaire de repos. Une augmentation de la perméabilité au  $Cl^-$  produit donc un influx de cet ion - et réduit en général l'excitabilité neuronale (inhibition). Cependant, dans certains cas,  $[Cl^-]_i$  augmente, le potentiel d'équilibre du  $Cl^-$  s'élève et l'activation des GlyRs et GABA<sub>A</sub>Rs produit non plus un influx mais une sortie de  $Cl^-$ , entraînant non pas une hyperpolarisation mais, au contraire, une dépolarisation, un influx de  $Ca^{2+}$  et la genèse de potentiels d'action. C'est le cas notamment dans les conditions physiologiques, (1) au cours du développement embryonnaire et des premiers jours après la naissance, de l'ensemble des neurones (voir revue par Ben-Ari, 2002) et (2), chez l'adulte, des neurones ganglionnaires, et, dans des conditions pathologiques (après lésion d'un nerf périphérique) (3) de neurones de la couche I de la corne dorsale.

(1) Au cours du développement embryonnaire et des premiers jours après la naissance, les neurones de la corne dorsale sont dépolarisés par la glycine comme par le GABA (Reichling et al., 1994). Cette fonction excitatrice des GlyRs est importante pour la synaptogénèse puisque les élévations de  $Ca^{2+}$  intracellulaire qui en résultent paraissent nécessaires à une spécialisation correcte des membranes postsynaptiques glycinergiques (Kirsch & H Betz, 1998). Au cours de la première semaine, les neurones commencent à exprimer le co-transporteur membranaire KCC2,  $[Cl^-]_i$  diminue et l'activation des GlyRs et GABA<sub>A</sub>Rs hyperpolarise les neurones.

(2) A cause d'une expression particulière des co-transporteurs membranaires de  $Cl^-$  – expression élevée du NKCC1 (Sung et al., 2000; Price et al., 2006) et, au contraire, faible du KCC2 (Rivera et al., 1999) – la  $[Cl^-]_i$  des neurones ganglionnaires reste élevée chez l'adulte (pour revue voir Alvarez-Leefmans, 2009.). Ces neurones sont donc dépolarisés par le GABA (Labrakakis et al., 2003). Ainsi, l'activation des GABA<sub>A</sub>Rs présents sur les terminaisons dépolarise les afférences primaires et inhibe la propagation des potentiels d'action dans les terminaisons présynaptiques – et donc la libération présynaptique de glutamate, que ce soit par inactivation des canaux sodium présynaptiques et/ou effet shunt (Kullmann et al., 2005). L'inhibition présynaptique s'accompagne donc d'une dépolarisation des afférences présynaptiques (« dorsal root potentials » ou DRPs) que l'on peut enregistrer. Une dépolarisation au dessus du seuil peut déclencher des potentiels d'action dans les terminaisons spinales des afférences primaires et initier un réflexe de racine dorsale, qui contribue à l'inflammation neurogénique (Willis, 1999).

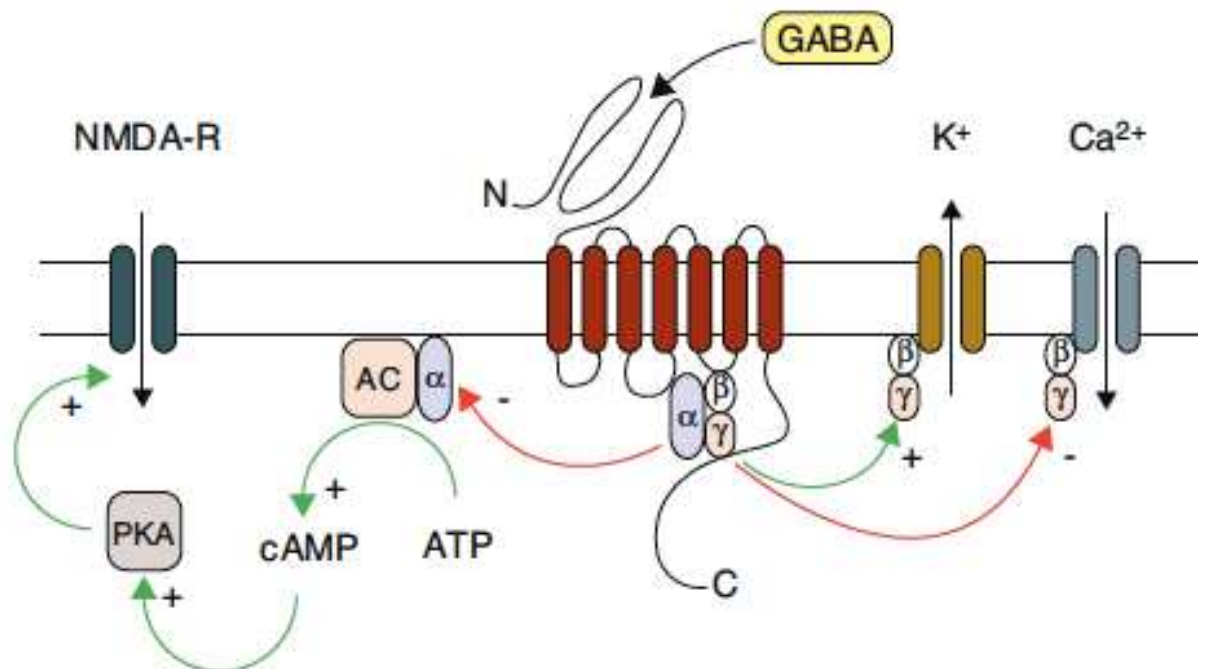
(3) Chez l'adulte, à la suite d'une lésion d'un nerf périphérique, les cellules microgliales, activées, libèrent du « brain derived neurotrophic factor » (BDNF), conduisant à une réduction de l'expression du co-transporteur membranaire KCC2 dans un sous-ensemble



des neurones de la couche I de la corne dorsale (Lu et al., 2008; Miletic & Miletic, 2008; Coull et al., 2003; Coull et al., 2005). GABA dépoliarise alors ces neurones, provoque une entrée de  $Ca^{2+}$  et déclenche des potentiels d'action.

### 1.1.2. Récepteurs $GABA_B$ métabotropiques

Le  $GABA_B R$  est un récepteur métabotropique, couplé à des protéines G. Il résulte de l'association de deux sous-unités,  $GABA_B1$  et  $GABA_B2$ . Ces sous-unités se caractérisent toutes deux par un haut poids moléculaire, une longue chaîne extracellulaire N terminale et sept domaines transmembranaires (Figure 12). L'agoniste se lie à la sous-unité  $GABA_B1$  induisant un changement de la conformation du complexe protéique qui permet à la sous-unité  $GABA_B2$  d'activer la protéine G couplée. Il existe deux variantes majeures de la sous-unité  $GABA_B1$  :  $GABA_B1a$  et  $GABA_B1b$  (voir revues par Bowery et al., 2002 et Chalifoux & Carter, 2011). Les récepteurs  $GABA_B1a,2$  sont principalement présynaptiques et les récepteurs  $GABA_B1b,2$ , postsynaptiques (Towers et al., 2000).



**Figure 12 : Signalisation intra cellulaire postsynaptique des récepteurs  $GABA_B$**

GABA, en se liant au  $GABA_B R$ , active les sous-unités  $G\beta\gamma$  qui diffusent localement pour ouvrir des canaux  $K^+$  et fermer des canaux  $Ca^{2+}$ . L'activation des sous-unités  $G\alpha i/G\alpha o$  inhibe l'adénylyl cyclase (AC). L'AC produisant continuellement de l'AMPc qui à son tour active la PKA, cela équivaut à une inhibition de l'action de la PKA sur ses nombreuses cibles incluant les récepteurs NMDA (Chalifoux & Carter, 2011).

L'activation des GABA<sub>B</sub>R produit plusieurs effets (Figure 12). Elle (1) inhibe l'activité de l'adénylate cyclase, aussi bien basale que stimulée par la forskolin, réduisant le niveau intracellulaire d'AMPc et donc l'activité de la protéine kinase A (PKA), (2) réduit les conductances Ca<sup>2+</sup> et (3) augmente les conductances K<sup>+</sup> des membranes neuronales. Les GABA<sub>B</sub>R postsynaptiques semblent plus particulièrement associés à la modulation de conductances K<sup>+</sup>, et les GABA<sub>B</sub>R présynaptiques, eux, à des canaux Ca<sup>2+</sup> voltage-dépendant de type P/Q et N. Il est important de noter que l'inhibition présynaptique produite par les GABA<sub>B</sub>R ne s'accompagne pas d'une dépolarisation des afférences présynaptiques.

## 1.2. Neurones GABAergiques et glycinergiques de la corne dorsale

Le marquage des neurones (plutôt de leurs corps cellulaires) qui libèrent du GABA et de la glycine (GABAergique et glycinergique) par l'utilisation d'anticorps contre le GABA et la glycine, montre une large distribution de neurones inhibiteurs à travers l'ensemble de la substance grise de la moelle épinière. D'après une étude pionnière de Todd & Sullivan (1990), environ 30% des neurones des couches I et II et 46% de ceux de la couche III sont immunoréactifs pour le GABA. Il existe aussi beaucoup de neurones immunoréactifs pour la glycine plutôt dans la couche III, moins dans les couches I et II. Cependant, des neurones purement glycinergiques sont rarement retrouvés dans les couches superficielles (I–III) où le marquage immunopositif pour la glycine reste limité, dans une large mesure, aux neurones contenant déjà du GABA (Todd & Sullivan, 1990; Polgár et al., 2003). Par contre, des neurones purement glycinergiques sont vus fréquemment dans les couches plus profondes de la corne dorsale (IV–V).

Avec l'avènement des techniques de génie génétique, il a été plus récemment possible de générer des souris où la protéine fluorescente verte (« enhanced green fluorescent protein » ou EGFP) est exprimée sous le contrôle transcriptionnel de gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme des neurotransmetteurs inhibiteurs : pour les neurones GABAergiques, l'enzyme de synthèse du GABA, la glutamic acid decarboxylase ou GAD67 (noté GABA-GFP : Tamamaki et al., 2003; Oliva et al., 2000), et pour les neurones glycinergiques, le transporteur de type 2 de la glycine (noté glycine-GFP : Zeilhofer, 2005). Des sections de moelle épinière provenant de souris GABA-GFP montrent de nombreux neurones marqués par l'EGFP dans les couches I–III et autour du canal central et un petit nombre dans la corne dorsale profonde (Heinke et al., 2004). Les neurones glycine-GFP ont

une distribution légèrement différente (Zeilhofer, 2005): abondants dans les couches profondes (laminae III–V) et relativement peu nombreux dans les couches I et II, une distribution similaire à celle mise en évidence par hybridation *in situ* (Hossaini et al., 2007).

Il est possible d'enregistrer directement ces neurones inhibiteurs dans des tranches de moelle. Ces neurones sont identifiés parce que leur stimulation génère les IPSCs GABAergiques dans les neurones auxquels ils sont connectés (enregistrements de paires de neurones dans la couche II : Lu and Perl, 2003) ou parce qu'ils expriment la GFP. Aux deux types d'animaux ci-dessus, il faut ajouter des souris exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur du gène codant pour la protéine du prion (prion-GFP). De façon inattendue, quelques neurones de la couche II sont marqués, ils se trouvent être exclusivement GABAergic (Hantman et al., 2004). Les types morphologiques reconnus pour les neurones GABAergiques sont principalement de type « islet » (Lu & Perl, 2003; Heinke et al., 2004) et dans une moindre mesure « central » (Hantman et al., 2004; Heinke et al., 2004). Ces résultats (Maxwell et al., 2007), combinés à ceux d'études plus anciennes (Todd & McKenzie, 1989), suggèrent que les cellules de type « islet » sont invariablement GABAergiques (voir revue par Todd, 2010). Par contre, les neurones inhibiteurs ont des types électrophysiologiques beaucoup plus variés. Ainsi les réponses des neurones GABAergiques à un stimulus dépolarisant sont de type « tonic firing » (Lu & Perl, 2003) ou « initial bursting » (Heinke et al., 2004), tandis que celles de neurones glycinergiques sont de type « tonic firing » ou « initial spiking » (Zeilhofer, 2005).

### 1.3. Activation des neurones inhibiteurs

Ces interneurons inhibiteurs sont activés par les afférences sensitives primaires. La stimulation électrique des racines dorsales, et plus particulièrement des afférences primaires de type A $\delta$ , évoque un potentiel synaptique excitateur (PPSE) suivi de potentiels synaptiques inhibiteurs (PPSI) dans des neurones de la couche II enregistrés dans des tranches de moelle de rat adulte (Yoshimura & Nishi, 1995). Ces PPSI sont de nature glycinergique – brefs et sensibles à la strychnine – et/ou GABA<sub>A</sub>ergique – plus longs que les précédents et sensibles à la bicuculline. Le délai de ces PPSIs suggère qu'ils sont disynaptiques. La majorité des interneurons inhibiteurs de la couche II recevrait donc un input direct des afférences sensorielles primaires, ici A $\delta$ .

La preuve de l'activation directe des interneurons inhibiteurs par des afférences primaires est venue de l'enregistrement de ces interneurons. Ainsi les neurones

GABAergiques, qu'ils soient de type « islet » (Yasaka et al., 2007; Lu & Perl, 2003) ou central (neurones prion-GFP : Hantman et al., 2004), sont activés directement par des afférences primaires de type C. Les neurones GABA-GFP reçoivent des inputs mono- (ou poly-) synaptiques d'afférences primaires de type A $\delta$  et/ou C (Heinke et al., 2004). De même que les cellules de type « islet » soient fortement activées par une application locale de capsaïcine, suggère qu'elles reçoivent directement des afférences primaires de type C, peptidergiques (Maxwell et al., 2007). Ainsi il est clair que des afférences primaires à haut seuil activent monosynaptiquement des interneurons inhibiteurs de la couche II.

Cela ne veut pas dire que les neurones GABAergiques sont uniquement activés par des stimuli nociceptifs. En effet, des fibres afférentes primaires de diamètre relativement grand – qui donc véhiculent plutôt une information tactile – se projettent sur ces neurones GABAergique (Lu & Perl, 2003). De plus, ces interneurons inhibiteurs sont activés par des inputs à bas seuil, de type A $\beta$ , chez l'animal adulte (Narikawa et al., 2000; Daniele & MacDermott, 2009). Chez l'animal anesthésié, c'est même une stimulation mécanique légère (pinceau) qui déclenche avant tout des potentiels inhibiteurs dans les neurones de la corne dorsale superficielle (Narikawa et al., 2000). Mais la connexion fibre primaire afférente de type A $\beta$ -neurone inhibiteur de la corne dorsale est vraisemblablement polysynaptique (Daniele & MacDermott, 2009). Ainsi, ces interneurons inhibiteurs de la couche II sur lesquels convergent des inputs à haut et à bas seuil pourraient jouer un rôle clé dans la modulation de l'information aussi bien douloureuse que tactile.

Pour l'instant, les neurones glycinergiques dans la corne dorsale profonde n'ont pas été étudiés de façon similaire (voir Zeilhofer, 2005). Cependant, d'après l'organisation bien connue des projections des fibres afférentes primaires (voir plus haut), ces neurones devraient recevoir principalement des inputs des fibres sensibles aux stimuli mécaniques à bas seuil.

Les interneurons représentent plus de 95% de l'ensemble des neurones de la corne dorsale (Polgár et al., 2004; Spike et al., 2003; Willis & Coggeshall, 2004). Les interneurons inhibiteurs de la corne dorsale superficielle sont donc vraisemblablement aussi activés par d'autres interneurons de la corne dorsale, notamment inhibiteurs (Labrakakis et al., 2009; Takazawa & MacDermott, 2010).

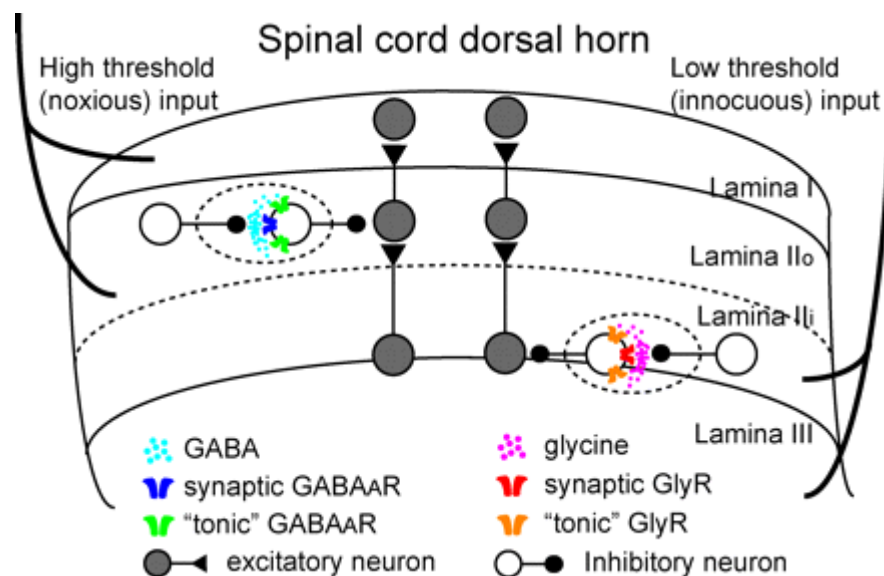
#### 1.4. Inputs inhibiteurs sur les neurones de la corne dorsale

Il est maintenant fonctionnellement bien établi que glycine et GABA sont contenus dans les mêmes vésicules présynaptiques et libérés concomitamment par les mêmes synapses (Jonas et al., 1998; Chéry & De Koninck, 1999). GABA et glycine sont stockés dans les mêmes vésicules parce qu'ils y sont transportés par le même transporteur vésiculaire d'acides aminés inhibiteurs (Wojcik et al., 2006; Dumoulin et al., 1999; Chaudhry et al., 1998). Cependant, si les deux neurotransmetteurs sont bien libérés simultanément, il existe une spécialisation des récepteurs présents aussi bien sur la membrane postsynaptique des synapses inhibitrices que sur les terminaisons des fibres afférentes primaires (hétérorécepteurs), en fonction du stade de développement et de la couche anatomique de la corne dorsale.

Il est possible de distinguer les PPSIs (ou CPSIs) dûs à l'activation des GlyRs et GABA<sub>A</sub>Rs en fonction de leur cinétique et de leur pharmacologie. GlyRs et GABA<sub>A</sub>Rs activés provoquent tous deux un influx de Cl<sup>-</sup> (voir 1.1). Mais les PPSIs (ou CPSIs) – spontanés, en présence de tétrodothine (miniPPSI/CPSI) comme évoqués par une stimulation électrique des afférences – dûs aux GlyRs sont brefs et sensibles à la strychnine alors que ceux dûs aux GABA<sub>A</sub>Rs sont plus longs que les précédents et sensibles à la bicuculline. Utilisant cette méthode, le groupe de De Koninck montre que des miniCPSIs de cinétique intermédiaire entre celles des miniCPSIs glycinergiques et GABA<sub>A</sub>ergiques, signe d'une activation conjointe des deux types de récepteurs, fréquents peu après la naissance, se raréfient au cours du développement postnatal pour avoir complètement disparu trente jours après la naissance (P30) (tout au moins dans les couches I-II) (Keller et al., 2001). Chez le rat adulte (P30), les CPSIs enregistrés dans les neurones de la couche I ne sont plus que purement glycinergiques et ceux dans la couche II et la corne dorsale profonde (couches III-IV), purement glycinergiques ou purement GABA<sub>A</sub>ergiques (avec une fréquence égale : Keller et al., 2001; Baccei & Fitzgerald, 2004). Cependant, l'évolution vers des événements purement glycinergiques dans la couche I, semble plus dûe à une spécialisation postsynaptique qu'à une disparition des GABA<sub>A</sub>Rs de la synapse. En effet, l'application de benzodiazépines – qui potentialisent la réponse des GABA<sub>A</sub>Rs au GABA (voir 1.1.) – démasque un composant GABAergique dans ces neurones (Chéry & De Koninck, 1999; Keller et al., 2001). Et l'amplitude de ce composant augmente avec l'intensité de la stimulation (Chéry & De Koninck, 1999). Le groupe de De Koninck suggère que les boutons inhibiteurs contactant les neurones de la couche I libèrent toujours du GABA et de la glycine chez l'adulte, mais que seuls les GlyRs sont localisés sur la membrane postsynaptique, les GABA<sub>A</sub>Rs étant principalement extra-synaptiques. Dans ce cas, les GABA<sub>B</sub>Rs et non GABA<sub>A</sub>Rs

constitueraient la première cible pour le GABA libéré dans les synapses de la couche I (Chéry & De Koninck, 2000) (voir plus bas).

Il existe aussi une spécialisation des récepteurs postsynaptiques dans les synapses inhibitrices sur les neurones inhibiteurs (neurones GABA-EGFP). Les neurones inhibiteurs à la limite entre les couches II et III reçoivent des synapses à prédominance glycinergique, alors que les neurones inhibiteurs plus dorsaux (couches I-II<sub>c</sub>) reçoivent des synapses à prédominance GABA<sub>A</sub>ergique (Figure 13). Et cette dissociation se perpétue chez la souris adulte (Takazawa & MacDermott, 2010; Labrakakis et al., 2009).



**Figure 13 : Des récepteurs inhibiteurs différents, synaptiques et extra-synaptiques, modulent des sous-populations de neurones inhibiteurs dans différentes régions de la corne dorsale**

Les neurones inhibiteurs entre couches II et III reçoivent une inhibition (tonique et synaptique) principalement glycinergique. Ceux des couches I et II<sub>c</sub> reçoivent, au contraire, une inhibition (tonique et synaptique) GABA<sub>A</sub>ergique. Ce diagramme schématisé traduit des résultats obtenus chez des souris âgées de 5 semaines. La différence des symboles représentant les récepteurs toniques ou les récepteurs synaptiques ne correspond pas nécessairement à des récepteurs de sous-types différents. (D'après Takazawa & MacDermott, 2010)

Il existe aussi une spécialisation des hétéro-récepteurs dans la corne dorsale superficielle où les GABA<sub>B</sub>Rs prédominent. En effet, si la présence de GABA<sub>A</sub>Rs est bien établie sur les grosses fibres afférentes primaires myélinisées où ils produisent des DRPs, elle l'est beaucoup moins sur les fibres afférentes primaires de plus petit diamètre, myélinisées ou non (pour revue voir Rudomin & Schmidt, 1999). La stimulation de récepteurs sensibles au frottement (Hentall & Fields, 1979) ou de nerfs, à une intensité juste suffisante pour activer les fibres afférentes primaires de type A $\beta$  (Fitzgerald & Woolf, 1981; Calvillo et al., 1982),

produit bien une (très) légère augmentation de l'excitabilité des fibres afférentes primaires de type C, signe de l'activation de GABA<sub>A</sub>Rs présynaptiques. Mais cet effet est bien plus faible que celui obtenu dans les fibres afférentes primaires myélinisées de gros diamètre. Il faut noter ici que la présence de GABA<sub>A</sub>Rs contenant la sous-unité  $\alpha 2$  (sensibles aux benzodiazépines, voir 1.1) sur les fibres afférentes primaires nociceptives pourrait avoir une grande importance fonctionnelle. En effet, ces récepteurs seraient responsables de l'action anti-nociceptive des benzodiazépines lorsqu'elles sont appliquées localement (Witschi et al., 2011). L'inhibition présynaptique des afférences primaires dans la corne postérieure est principalement le fait des GABA<sub>B</sub>Rs. Ces récepteurs sont majoritairement présents dans les couches I-IV de la corne postérieure (Price et al., 1984; Price et al., 1987; Towers et al., 2000). Une rhizotomie (Price et al., 1987) ou un traitement à la capsaïcine (Price et al., 1984) réduit leur nombre de moitié, indiquant qu'ils sont localisés, au moins pour moitié, sur les fibres afférentes primaires de type C peptidergiques, où ils modulent la transmission excitatrice. L'activation des GABA<sub>B</sub>Rs segmentaires déprime les réponses neuronales à une stimulation mécanique douloureuse, mais non tactile (Dickenson et al., 1985; Hao et al., 1992), et davantage les réponses synaptiques évoquées par la stimulation des fibres afférentes primaires de type C que celles évoquées par la stimulation des fibres afférentes primaires de type A $\delta$ - (Ataka et al., 2000) et A $\beta$  (Dickenson et al., 1985). Finalement, l'activation des GABA<sub>B</sub>Rs, mais non GABA<sub>A</sub>Rs, inhibe la libération de substance P par les fibres afférentes primaires de type C (Marvizón et al., 1997).

Il ne faut pas oublier ici qu'une partie des inputs inhibiteurs de la corne dorsale spinale provient des fibres descendantes qui ont leur origine dans la région de la rostral ventromedial medulla (RVM ; Antal et al., 1996) et forment des connexions monosynaptiques avec les neurones de la corne dorsale (Kato et al., 2006). Il faut aussi noter la contribution de neuro-modulateurs tels que la noradrénaline et la sérotonine qui peuvent dépolariser des neurones identifiés comme GABAergiques dans la corne dorsale par l'intermédiaire de l'activation de récepteurs couplés à une protéine G (Hantman & Perl, 2005) et ainsi contribuer à l'action anti-nociceptive des projections descendantes sérotoninergiques et noradrénergiques.

## **2. Mécanismes de la perte de l'inhibition synaptique dans la corne dorsale au cours de la douleur chronique**

Il est maintenant clair qu'une perte de l'inhibition synaptique contribue de façon significative à la genèse de la douleur chronique. Plusieurs mécanismes ont été identifiés en fonction de l'origine – inflammatoire, neuropathique et sensibilisation centrale – de la douleur.

### **2.1. Douleur inflammatoire**

Une inflammation périphérique induit une augmentation prononcée de la production spinale de prostaglandine E2 (PGE2), un médiateur clé de l'hyperalgie centrale inflammatoire. Au niveau spinal, les PGE2 sont principalement produites par la cyclooxygénase-2 (COX-2) qui est activée dans les heures qui suivent le début de l'inflammation périphérique (Beiche et al., 1996; Samad et al., 2001). Un effet majeur de cette production spinale de PGE2 est de réduire la transmission glycinergique dans la corne dorsale superficielle. On observe une diminution de la transmission glycinergique dans des tranches de moelle prélevées sur des animaux présentant une inflammation périphérique (Müller et al., 2003). Cette inhibition passe par une activation des récepteurs de la PGE2 de type EP2, la production d'AMPC et l'activation de la PKA (Ahmadi et al., 2002). La PKA activée phosphoryle et inhibe une forme spécifique du récepteur glycine contenant la sous-unité  $\alpha 3$ , exprimée dans les couches superficielles de la corne dorsale (Harvey et al., 2004) (voir ci-dessus 1.1). Cette cascade moléculaire est confirmée par la dissociation qui existe entre douleur inflammatoire (notamment par injection intrathécale de PGE2) et douleur neuropathique (constriction du nerf) chez des souris génétiquement déficientes en récepteur EP2 (Reinold et al., 2005; Hösl et al., 2006), en sous-unité  $\alpha 3$  du GlyR (Harvey et al., 2004; Hösl et al., 2006) et sous-unité régulatrice pour la PKA neuronale (Malmberg, et al., 1997). Chez tous ces animaux, la première est virtuellement absente lorsque la seconde n'est pas altérée.

### **2.2. Douleur neuropathique**

La lésion d'un nerf périphérique s'accompagne d'une forte réduction de l'immuno-réactivité GABAergique dans la corne dorsale (Ibuki et al., 1997; Eaton et al., 1998), de la transmission synaptique GABAergique (dans des tranches de moelle prélevées sur des rats neuropathiques) et de l'immuno-réactivité GAD65 du côté de la lésion neuropathique (Moore



et al., 2002). Pour le groupe de Clifford Woolf, cette diminution de la transmission synaptique GABAergique serait due à une apoptose dans la corne dorsale qui toucherait préférentiellement les neurones GABAergiques (Moore et al., 2002; Scholz et al., 2005). Mais cette interprétation est controversée. Pour le groupe d'Andrew Todd (Polgár et al., 2004; 2005), il y aurait effectivement apoptose chez le rat neuropathique mais ce processus intéresserait plutôt les cellules microgliales. Il n'y aurait donc pas de perte neuronale dans la corne dorsale.

Une autre explication pour cette réduction de l'inhibition synaptique, est une activation de la microglie médullaire, reconnue comme un événement clé de la génération de la douleur neuropathique à la suite d'une lésion nerveuse périphérique (Tsuda et al., 2003; Woolf, 2007). Le lien entre activation de la microglie et altération du traitement neuronal de l'information sensorielle a été établi : les cellules microgliales activées libèrent du BDNF qui, en activant son récepteur *trkB* sur les neurones, réduit l'expression du co-transporteur KCC2 dans ces neurones et élève  $[Cl^-]_i$  et le potentiel d'inversion du  $Cl^-$  (Coull et al., 2003; 2005) (voir ci-dessus 1.1). L'injection intra-spinale de cellules microgliales activées *in vitro* est seule suffisante pour élever le potentiel d'inversion du  $Cl^-$  dans les neurones de la couche I. Et cet effet est bloqué, de même que l'allodynie, si cette microglie a été pré-incubée avec des siRNA contre le BDNF (Coull et al., 2005). Les cellules microgliales sont elles-même activées par les médiateurs libérés – en particulier de l'ATP mais aussi des chemokines, – par les fibres afférentes primaires actives (pour revue, voir Zeilhofer et al., 2009). Ainsi l'activation du récepteur purinergique P2X4 par l'ATP augmente la synthèse de BDNF par l'intermédiaire de la voie des MAPkinases (Trang et al., 2009).

### **2.3. Sensibilisation centrale**

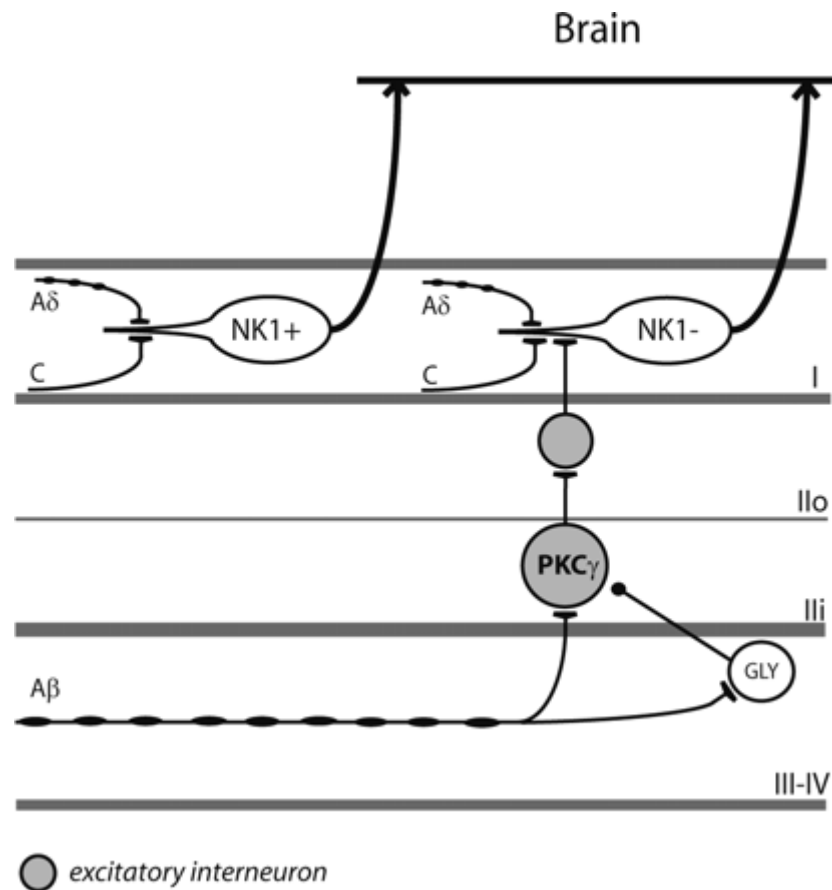
Une perte d'inhibition synaptique dans la corne dorsale peut aussi s'observer en l'absence d'inflammation ou de lésion nerveuse, à la suite d'une activation sélective des afférences primaires de type C. Ainsi la capsaïcine induit une hyperalgie mécanique et thermique au niveau du site d'injection (hyperalgie primaire) associées à une sensibilisation exclusivement mécanique (hyperalgie secondaire) dans la peau saine autour du point d'injection (Treede & Magerl, 2000). Cette hyperalgie secondaire d'origine centrale (spinale) (Woolf, 1983), implique une diminution de l'inhibition synaptique (Sivilotti & Woolf, 1994a) et peut ainsi être considérée comme une forme de plasticité hétéro-synaptique (Zieglgänsberger & Herz, 1971). Le groupe de Zeilhofer a récemment suggéré que cette

stimulation intense des afférences primaires réduit la libération synaptique de glycine et de GABA via la production spinale d'endocannabinoïdes et l'activation des récepteurs cannabinoïdes 1 (CB1) sur les terminaisons présynaptiques des interneurons inhibiteurs de la corne dorsale (Pernía-Andrade et al., 2009). De même l'activation de récepteurs CB1 facilite la libération de substance P – mesurée par l'internalisation du récepteur neurokinine 1 – dans la moelle épinière de rat (Zhang et al., 2010). Dans un tel scénario, les endocannabinoïdes et récepteurs CB1 spinaux auraient un rôle pro-nociceptif (Naef et al., 2003; Kraft et al., 2008); mais cette hypothèse est controversée (Zeilhofer, 2010).

### **3. Conséquences fonctionnelles d'une réduction de la transmission inhibitrice**

La plupart des neurones de la corne dorsale superficielle reçoivent en plus d'un input exciteur monosynaptique, un input inhibiteur disynaptique (Yoshimura & Nishi, 1995). Cette inhibition synchrone avec l'excitation joue un rôle primordial dans le contrôle de l'excitation des neurones de la corne dorsale par les inputs provenant de la périphérie. Une diminution de cette inhibition se manifestera donc avant tout par une augmentation des inputs excitateurs sur ces neurones. C'est ce que montrent les études sur les neurones de la substantia gelatinosa et les neurones de projection de la couche I, *in vitro*, sur tranches de moelle, comme *in vivo*, chez les rongeurs. Le blocage des récepteurs GABA<sub>A</sub> avec de la bicuculline conduit à une très forte augmentation de l'input exciteur sur les neurones de la substantia gelatinosa (Baba et al., 2003). De même, les neurones de projection de la couche I ne sont normalement activés que par des inputs monosynaptiques provenant uniquement d'afférences primaires à haut seuil, de type C A $\delta$  et C. Le blocage de la neurotransmission GABAergique et/ou glycinergique révèle un input de type A $\beta$  (Torsney & MacDermott, 2006; Keller et al., 2007; Miraucourt et al., 2007). Il s'agit d'un réseau polysynaptique capable de transférer l'information tactile non nociceptive – véhiculée par les afférences A $\beta$  – des couches profondes vers les neurones nociceptifs de la couche I. Cependant, dans les conditions physiologiques, ce réseau n'est pas fonctionnel. C'est la perte d'inhibition qui permet son expression et la transformation d'un message indolore en message douloureux (Miraucourt et al., 2007). Cette voie implique des interneurons exprimant la PKC $\gamma$  et opère par l'intermédiaire de neurones nociceptifs spécifiques qui ne portent pas le récepteur à la neurokinine 1 (Figure 14) ; (Miraucourt et al., 2009). Les interneurons PKC $\gamma^+$ , localisés dans

la couche II<sub>i</sub> (Malmberg et al., 1997), sont directement activés par les fibres myélinisées A $\beta$  (Neumann et al., 2008).



**Figure 14 : Circuit hypothétique du Sp5C à l'origine de l'allodynie mécanique dynamique**

Les interneurons PKC $\gamma$ <sup>+</sup> de la couche II<sub>i</sub> forment une connexion monosynaptique excitatrice (glutamatergique) avec des neurones de la couche II<sub>e</sub>. Eux-mêmes ont une connexion monosynaptique excitatrice avec des neurones de projection NK1 négatifs de la couche I. Les interneurons PKC $\gamma$ <sup>+</sup> sont directement activés par des afférences myélinisées de type A $\beta$ . (D'après Miraucourt et al., 2009)

## V. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MIGRAINE

Historiquement, de nombreuses théories se sont succédées sur les mécanismes des crises migraineuses. Durant les années 1960-1980, la migraine était attribuée à une dysrégulation vasculaire selon le schéma suivant : l'aura résulte d'une ischémie cérébrale transitoire induite par une vasoconstriction artérielle et la céphalée, d'une vasodilatation « rebond » qui active les nocicepteurs périvasculaires (Wolff, 1963). Puis les premières études en neuro-imagerie fonctionnelle ont suggéré que la migraine résulte en fait d'un dysfonctionnement des neurones corticaux et que les événements vasculaires ne sont que des phénomènes secondaires. Dans cette dernière théorie, l'aura est liée à une dépression corticale envahissante (cortical spreading depression ou CSD), mais les mécanismes de la céphalée ne sont pas expliqués. Aucune de ces deux théories dites « vasculaire » et « neuronale » ne permet d'expliquer toute la symptomatologie migraineuse.

La physiopathologie de la migraine est loin d'être complètement comprise. Lors de la crise migraineuse, plusieurs événements ont pu être observés, comme la vasodilatation des vaisseaux méningés, la dépression corticale envahissante, l'augmentation de l'activité de certaines zones du tronc cérébral. Mais les résultats sont souvent controversés. De plus, le lien entre ces différents événements n'est souvent pas connu.

### 1. Vasodilatation des vaisseaux et inflammation neurogène

Dans la région crânienne, la douleur est générée principalement dans les vaisseaux sanguins de gros calibre et les méninges, deux tissus ayant une innervation très riche appartenant aux afférences primaires nociceptives de la division ophtalmique du nerf trijumeau (Strassman et al., 2004). Le développement de la douleur migraineuse serait lié à l'activation de ces afférences.

D'après la théorie vasculaire de la migraine, la dilatation des artères de la dure-mère et de la pie-mère active les afférences primaires et induit ainsi la céphalée migraineuse. Une dilatation de l'artère méningée moyenne a été observée lors d'une crise de migraine spontanée (Wolff et al., 1963) ou provoquée par l'administration systémique de CGRP ou histamine, connus pour induire des crises de migraine ( Iversen et al., 1989; Lassen et al., 1995; 2002;). Différentes techniques ont confirmé cette observation, comme le doppler (Nichols et al., 1990), ou très récemment l'angiographie par résonance magnétique (Asghar et al., 2011).

Enfin, un argument en faveur de cette théorie est l'efficacité des molécules entraînant une vasoconstriction comme l'ergotamine et les triptans.

Mais cette théorie est remise en question par plusieurs études. Il n'y a pas d'évidence claire d'augmentation significative du diamètre des artères de la pie-mère (Zwetsloot et al., 1993) ou de la dure-mère lors de la crise migraineuse provoquée par sildenafil (Kruuse et al., 2003), la nitroglycérine (Zwetsloot et al., 1993), le polypeptide intestinal vasoactif (Hansen et al., 2006) ou l'adrénomedulline (Petersen et al., 2009). De plus, les agonistes sélectifs des récepteurs 5HT<sub>1F</sub>, n'ont pas d'effet vasoconstricteur et n'inhibent pas la vasodilatation neurogénique dure-mérienne induite par le CGRP chez le porc (Williamson et al., 2001), mais s'avèrent pourtant efficaces contre la douleur migraineuse (Goldstein et al., 2001).

Donc, à ce jour, nous ne savons toujours pas si une vasodilatation des vaisseaux méningés intervient dans la physiopathologie de la migraine, ni à quel moment elle intervient. Théoriquement, une vasodilatation méningée peut induire ou être induite par l'activation des nocicepteurs méningés. L'activation des nocicepteurs méningés par la vasodilatation peut résulter de la stimulation des mécano-récepteurs présents dans les vaisseaux dilatés. Inversement, initialement activés, les nocicepteurs méningés peuvent induire secondairement une vasodilatation par relargage de peptides tels que le CGRP, qui est le principal neuropeptide libéré lors de l'activation des afférences trigémino-vasculaires pendant la migraine (Sarchielli et al., 2000; Goadsby et al., 1990). Il serait un des éléments libérés lors de l'inflammation des méninges. Le terme « inflammation neurogène » désigne une cascade de réactions inflammatoires, en l'absence de lésion tissulaire, déclenchées par l'activation des afférences primaires entraînant la libération de neuropeptides vasoactifs contenus dans ces terminaisons (CGRP, SP et autres neurokinines) (Lassen et al., 1995; Iversen et al., 1989).

## 2. Sensibilisation périphérique et centrale

La douleur pulsatile caractéristique de la migraine et son aggravation en condition d'augmentation de pression intra-crânienne, telle que la toux ou l'activité physique, seraient dûes à la sensibilisation périphérique des afférences trigéminales (Strassman et al., 1996). Cette sensibilisation provoquerait une allodynie méningée, rendant sensible les fibres des parois vasculaires aux pulsations.

Les afférences périphériques sensibilisées vont activer et sensibiliser les neurones du Sp5C, provoquant une baisse de leur seuil d'activation, une augmentation de leur réponse aux stimuli périphériques et un accroissement de la taille de leurs champs récepteurs méningé et cutané (Burstein et al., 1998). Cette sensibilisation centrale s'exprime au niveau clinique par la présence d'une allodynie cutanée de la région périorbitaire (Burstein et al., 2000; Guy et al., 2010) chez la majorité des patients migraineux. Lorsque la migraine persiste, cette allodynie peut atteindre des régions extra-trigéminales incluant le cou et les membres supérieurs (Burstein et al., 2000; Guy et al., 2010). Ce type d'allodynie extra-trigéminal résulterait d'une sensibilisation centrale des neurones thalamo-corticaux (Burstein et al., 2000). Le maintien de la sensibilisation centrale semble être indépendant des afférences périphériques. En effet, le blocage par anesthésie des afférences primaires de la dure-mère suite à une stimulation chimique de la dure-mère n'inhibe pas l'hypersensibilité cutanée chez le rat (Burstein et al., 1998). De plus, chez le rat, les triptans n'ont plus d'effet lorsque les neurones de second ordre sont sensibilisés (Levy et al., 2004). Les triptans peuvent prévenir, mais pas contrebalancer la sensibilisation centrale une fois celle-ci établie au sein des neurones du Sp5C (Burstein & Jakubowski, 2004).

Cette sensibilisation centrale serait plutôt liée à un phénomène de plasticité synaptique au niveau notamment des neurones du Sp5C (Pietrobon & Striessnig, 2003) et/ou une altération des voies de modulation endogène du message douloureux (PAG par exemple) (Knight & Goadsby, 2001).

Si la céphalée migraineuse est induite par l'activation et la sensibilisation des nocicepteurs méningés, quel mécanisme entraîne cette activation/sensibilisation? Deux mécanismes ont été proposés : la présence d'un générateur endogène situé au niveau du tronc cérébral et la CSD.

### 3. Générateur endogène dans le tronc cérébral ?

L'origine de la migraine serait un dysfonctionnement temporaire dans les noyaux de tronc cérébral qui sont impliqués dans le contrôle central de la nociception (May & Goadsby, 1999; Goadsby, 2001).

Le premier élément en faveur de cette hypothèse est que le positionnement d'électrodes de stimulation dans la PAG dans le but de traiter des douleurs chroniques rebelles peut induire des douleurs de type migraine chez des patients non migraineux (Raskin et al., 1987).

Le second élément réside dans l'observation d'une augmentation du flux sanguin cérébral confiné dans plusieurs régions du tronc cérébral pendant les attaques de migraine (Cao et al., 2002; Weiller et al., 1995; Bahra et al., 2001). Bien que la résolution spatiale des techniques d'imagerie ne permette pas une différenciation précise des noyaux du tronc cérébral, en tomographie par émission de positrons, les foyers où le flux sanguin est le plus augmenté correspondent au noyau dorsal du raphé et au locus coeruleus, chez les patients sans aura (Weiller et al., 1995) et au noyau rouge et la substance noire chez un patient présentant une migraine avec aura lors d'une crise spontanée (Welch et al., 1998). Le noyau rouge et la substance noire sont les régions présentant l'augmentation de flux sanguin la plus importante chez des patients migraineux avec ou sans aura lors d'études en IRM fonctionnelle lors de migraines provoquées par des stimulations visuelles (Cao et al., 2002).

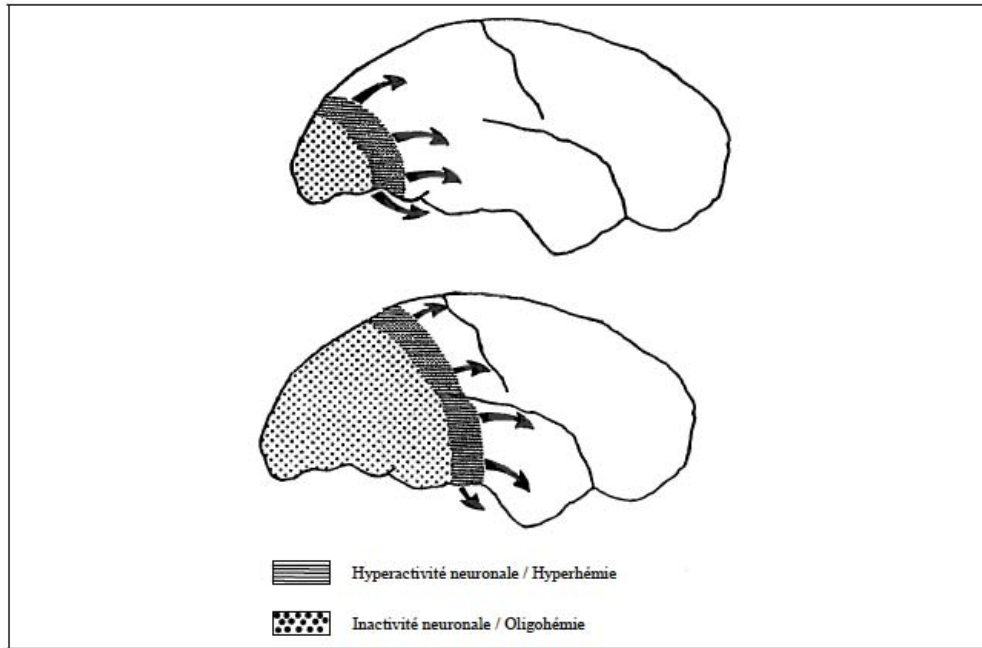
Cependant, l'activation de noyaux du tronc cérébral n'est pas observée chez tous les patients lorsque l'on provoque une crise de migraine par stimulation visuelle (Cao et al., 2002). De plus, l'activation de la substance noire et du noyau rouge n'est que de courte durée et disparaît avant la fin de l'aura lors d'une crise de migraine spontanée avec aura (Welch et al., 1998). Toutes ces observations semblent donc contradictoires. De plus, elles n'expliquent pas comment le système trigémino-vasculaire est activé. En effet, aucun lien direct entre « générateur de la migraine » et activation du système trigémino-vasculaire n'a été démontré. Il est possible qu'un dysfonctionnement des noyaux du tronc cérébral facilite simplement l'activation du système (Goadsby et al., 2002). En effet, un défaut des contrôles descendants entrainerait une diminution de l'inhibition des neurones du complexe sensitif du trijumeau et les rendrait ainsi plus sensibles aux afférences trigémino-vasculaires. Un dysfonctionnement dans le tronc cérébral pourrait donc être nécessaire à la survenue de la migraine, par l'effet permissif qu'il a sur l'excitabilité trigéminale centrale (Pietrobon & Striessnig, 2003).

## 4. Dépression corticale envahissante (CSD)

Elle a été mise en évidence par Leao dans le cortex du lapin (Leao, 1944). Elle est caractérisée par une vague de dépolarisation neuronale intense et soutenue qui se propage de façon lente (2 à 6 mm.min<sup>-1</sup>) et génère de façon transitoire (de l'ordre de quelques secondes) une activité électrique intense. Cette forte dépolarisation est suivie d'une phase de dépression de l'activité neuronale qui peut durer quelques minutes (Lauritzen, 1994). La phase de dépolarisation est associée à une augmentation du flux sanguin cérébral ou hyperhémie, tandis que la phase de dépression est liée à une réduction du flux ou oligémie (Lauritzen, 1994) (Figure 15). Les corrélations entre aura migraineuse et CSD amènent à proposer que la CSD est à l'origine de l'aura (Lauritzen, 1994; Olesen et al., 1981). L'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle, dépendante du niveau d'oxygénation du sang (BOLD fMRI) (Hadjikhani et al., 2001; Welch et al., 1998) et la magnéto-encéphalographie (Bowyer et al., 2001) mettent en évidence des changements cérébro-vasculaires de type CSD dans le cortex occipital des migraineux pendant la phase d'aura visuelle. En effet, il existe une corrélation temporelle étroite, entre d'une part, les manifestations initiales de l'aura (scintillements) et l'augmentation initiale du signal BOLD liée à une hyperhémie corticale, et, d'autre part, le scotome qui suit les scintillations et la diminution subséquente du signal BOLD (Hadjikhani et al., 2001).

On peut penser que les auras avec des symptômes moteurs ou sensoriels peuvent résulter d'événement de type CSD mais qui auraient lieu dans les parties corticales motrices ou sensorielles. De même que la CSD pourrait se produire dans des régions du cortex cliniquement silencieuses (Woods et al., 1994; Cao et al., 2002; Géraud et al., 2005).





**Figure 15 : Propagation des modifications de l'activité neuronale et du débit sanguin au cours d'une CSD**

La CSD produit des modifications ioniques importantes, comme l'augmentation de la concentration en ions  $K^+$ ,  $H^+$ , en NO, en acide arachidonique et en prostaglandines. Ces substances sont susceptibles d'entraîner une activation et/ou une sensibilisation des afférences trigémino-vasculaires (Strassman, et al., 1996). Induite expérimentalement par piqure ou stimulation électrique, une CSD peut activer les afférences trigémino-vasculaires et produire les manifestations de la crise migraineuse (Bolay et al., 2002). Chez le rat, on peut observer que la CSD produit une extravasation des protéines plasmatiques à partir des vaisseaux sanguins de la dure-mère et une augmentation de l'expression de Fos dans les neurones du Sp5C.

Comment le cortex d'un patient migraineux serait-il prédisposé au développement d'une CSD ?

## 5. Altération de l'excitabilité corticale chez les patients migraineux

Comme une hyperexcitation neuronale transitoire précède la CSD, on peut penser que des modifications d'excitabilité corticale sous-tendent les crises de migraine.

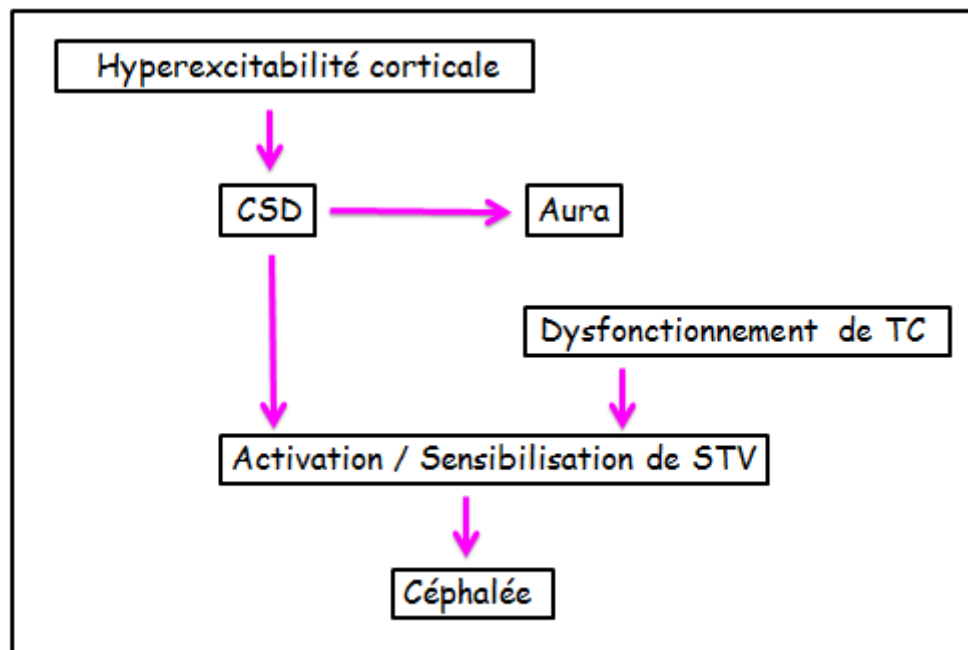
Des signes de dysfonctionnement des cortex visuel, auditif et somatosensoriel, compatibles avec une hyperexcitabilité corticale ont été détectés chez des patients migraineux avec ou sans aura. Lors d'une stimulation visuelle capable d'induire une migraine, les patients migraineux présentent des malaises et des illusions visuelles accrues par rapport aux sujets contrôles, notamment chez les patients avec aura (Chronicle & Mulleners, 1996). Lors d'une stimulation magnétique trans-crânienne dans le cortex visuel, le seuil d'induction des phosphènes est diminué pour une proportion élevée de patients migraineux avec ou sans aura (Giffin & Kaube, 2002; Brighina et al., 2002). Cette hyperexcitabilité inter-ictale du cortex visuel pourrait être due à une diminution de l'inhibition intra-corticale (Giffin & Kaube, 2002; Brighina et al., 2002). Par ailleurs, d'autres études de stimulation magnétique trans-crânienne montrent que l'hyperexcitabilité serait plutôt restreinte au cortex occipital car elle n'a pas été mise en évidence dans le cortex moteur (Gunaydin et al., 2006). L'enregistrement des potentiels évoqués montre (Giffin & Kaube, 2002) qu'il existerait une déficience des capacités d'habituation<sup>1</sup> chez les patients migraineux. Ce phénomène d'habituation pourrait refléter un mécanisme d'adaptation visant à protéger le cortex contre une « surcharge » d'afférences sensorielles, déficient chez les patients migraineux. L'étude de l'évolution de ce déficit est intéressante. On remarque qu'il augmente 5 jours avant la crise, qu'il est maximal la veille de la crise et revient et se normalise 2 ou 3 jours après la crise (Giffin & Kaube, 2002). Cette « périodicité neurophysiologique » (Siniatchkin et al., 1999) pourrait être à l'origine de la CSD lorsque l'augmentation de l'excitabilité corticale coïncide avec d'autres facteurs favorisants (Figure 16). Elle pourrait aussi expliquer d'une part les modifications cliniques observées chez les patients migraineux quelques jours avant une crise (changements d'humeur, de la vigilance, de l'appétit) mais aussi la sensibilisation accrue aux stimuli sensoriels observés chez la plupart des patients migraineux. Ce phénomène d'habituation se produit plus rapidement au niveau cortical qu'au niveau du neurone de premier ou de second

---

<sup>1</sup> Lors de stimulations visuelles ou auditives répétées à une certaine fréquence, les potentiels évoqués chez les patients contrôles ont une amplitude qui décroît et une latence augmentée, ce que l'on appelle habituation.

ordre. Ces défauts d'habituation reflèteraient alors bien un dysfonctionnement cortical et plus exactement une hyperexcitabilité corticale (Giffin & Kaube, 2002).

Des anomalies de l'activité corticale pourraient être à l'origine de la CSD (Pietrobon & Striessnig, 2003), qui est l'évènement le plus probable à l'origine de l'activation du système trigémino-vasculaire de la migraine avec aura et peut être aussi de la migraine sans aura. Des dysfonctionnements des noyaux du tronc cérébral impliqués dans les contrôles descendants de la douleur peuvent exercer un rôle permissif en favorisant l'hyperexcitabilité trigéminale.



**Figure 16 : Proposition de mécanisme physiopathologique de la céphalée migraineuse (d'après Pietrobon et Striessnig, 2003)**

## VI. OBJECTIFS DE TRAVAIL

L'étude des modèles animaux de douleur chronique montre qu'une altération de l'inhibition synaptique segmentaire contribue à l'émergence de symptômes cliniques tels que l'allodynie ou l'hyperalgésie. L'inhibition synaptique participe donc, au traitement normal de l'information sensitive nociceptive. Cependant, quel est son rôle exact ? L'inhibition synaptique ne semble pas seulement prévenir une trop grande excitation des neurones de la corne dorsale. D'une part, la spécialisation des différents types récepteurs inhibiteurs, GlyRs, GABA<sub>A</sub>Rs et GABA<sub>B</sub>Rs, en fonction des couches de la corne dorsale suggère que chaque type d'inhibition joue un rôle bien particulier. D'autre part, le blocage pharmacologique de l'inhibition synaptique dans la corne dorsale a un effet qui varie en fonction de la modalité sensorielle. A la suite du blocage des GlyRs et GABA<sub>A</sub>Rs au niveau segmentaire, le tact provoque une douleur (allodynie mécanique), alors que la perception d'une stimulation douloureuse, qu'elle soit mécanique ou thermique, est peu ou pas affectée (Beyer et al., 1985; Sivilotti & Woolf, 1994b; Roberts et al., 1986; Yaksh, 1989; Sherman & Loomis, 1996). De la même façon, au niveau des neurones WDRs (enregistrés dans la corne dorsale profonde), seules les réponses aux stimuli tactiles – mais non aux stimuli mécaniques nociceptifs – sont augmentées après désinhibition (Sorkin & Puig, 1996; Sorkin et al., 1998; Reeve et al., 1998; Drew et al., 2004). Enfin, aussi bien pour les neurones NS de la couche I (Seagrove et al., 2004) que les neurones WDR (Duggan et al., 1981; Reeve et al., 1998; Kontinen et al., 2001), les réponses à la stimulation des fibres afférentes primaires de type A sont fortement potentialisées alors que celles à la stimulation des fibres afférentes primaires de type C ne sont pas modifiées ou même diminuées. Dans ce scénario, l'inhibition contrôlerait plutôt le changement de fonction du système sensoriel qui, lors du processus de sensibilisation centrale, passe d'une nociception à haut seuil à une hypersensibilité à bas seuil (pour revue, voir Latremoliere & Woolf, 2009). La première question est donc :

**Comment l'inhibition synaptique segmentaire peut-elle moduler différemment les inputs A et C cutanés ?**

L'existence chez de nombreux patients d'une allodynie mécanique au niveau de la face lors de la crise de migraine mais également entre les crises (Guy et al., 2010; Burstein et al., 2000) signe une altération de l'inhibition synaptique segmentaire. Donc, l'inhibition synaptique participe aussi au traitement de l'information sensitive nociceptive méningée. La susceptibilité à la douleur migraineuse serait-elle due à un traitement particulier – notamment

une moindre efficacité ou un rôle différent de l'inhibition synaptique segmentaire – de l'information nociceptive méningée par rapport à celle du reste du corps ? La deuxième question est donc :

### **Comment l'inhibition synaptique module-t-elle les inputs A et C méningés?**

Pour répondre à ces questions, il est impératif de mesurer les inputs synaptiques des fibres afférentes primaires dans les couches superficielles du Sp5C, *in vivo*. Nous avons donc développé une technique d'enregistrement des potentiels de champs trigéminaux évoqués par la stimulation des afférences primaires cutanées et méningées dans le Sp5C chez l'animal anesthésié. Ces potentiels traduisent l'activation des neurones de second ordre autour de l'électrode par les fibres afférentes primaires, soit l'activité de la première synapse excitatrice sur les voies des sensibilités nociceptives cutanées et méningées (Baldissera et al., 1981.; Schouenborg, 1984; Shreckengost et al., 2010). Cette technique a été utilisée pour étudier les propriétés de la potentialisation à long-terme de la synapse excitatrice fibre afférente primaire de type C-neurone de la corne dorsale de la moelle lombaire (Liu et Sandkhuler, 1997 ; Ikeda et al., 2006). Nous avons préféré ces enregistrements de potentiels de champs aux enregistrements en « single unit » de neurones de la couche I/II. De tels enregistrements se révèlent très instables. De plus, il s'agit de la réponse d'un seul neurone. Enfin, cette réponse neuronale est la résultante non seulement d'inputs synaptiques, excitateurs et inhibiteurs, sur cette cellule mais aussi de propriétés membranaires, les uns comme les autres pouvant contribuer aux modifications de la réponse neuronale.

Nous avons comparé l'effet des désinhibitions GABAergique et/ou glycinergique sur les potentiels de champs évoqués par la stimulation des afférences primaires cutanées et méningées dans le Sp5C.

## **B. ARTICLE1**

**DISINHIBITION OF A-FIBER INPUTS CLOSES THE GATE TO C-FIBER  
INPUTS VIA THE ACTIVATION OF GABA<sub>B</sub> RECEPTORS IN THE RAT  
SUPERFICIAL MEDULLARY DORSAL HORN.**

**Céline Melin<sup>a,b,c</sup>, Floriant Jacquot<sup>a,b</sup>, Radhouane Dallel<sup>a,b,c</sup>, Alain Artola<sup>a,b</sup>**

*<sup>a</sup>Clermont Université, Université d'Auvergne, Neurobiologie de la Douleur  
Trigéminal, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France*

*<sup>b</sup>Inserm, U1017, F-63000 Clermont-Ferrand, France*

*<sup>c</sup>CHU Clermont-Ferrand, Service d'Odontologie, F-63003 Clermont-Ferrand,  
France*

Author to whom correspondence should be sent:

Pr. Alain ARTOLA.  
Inserm U 929 – Neurobiologie de la Douleur Trigéminal  
Faculté de Chirurgie Dentaire, Université d'Auvergne CLERMONT-FD1  
11, boulevard Charles de Gaulle  
F-63000 CLERMONT-FERRAND  
FRANCE  
Tel. + (33) 4 73 17 73 17  
Fax + (33) 4 73 17 73 06  
Mail : [alain.artola@u-clermont1.fr](mailto:alain.artola@u-clermont1.fr)

Running title: A-fiber inputs gate C-fiber ones via GABA<sub>B</sub> receptors

Keywords: Trigeminal nerve; Glycine receptors; GABA<sub>A</sub> receptors; GABA<sub>B</sub> receptors;  
synaptic inhibition;

## Abstract

Pathological disruption of local dorsal horn (DH) inhibition is thought to contribute to persistent pain hypersensitivity. Inhibition in DH is mediated by glycine and GABA acting upon glycine, GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors. This raises the issue as to which very function serve these different inhibitory systems. We investigated the impact of segmental glycinergic, GABA<sub>A</sub>ergic and GABA<sub>B</sub>ergic disinhibition upon A and C-fiber-evoked field potentials in the rat superficial medullary dorsal horn (MDH) *in vivo*. Pharmacological glycinergic and/or GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition strongly facilitates polysynaptic A-fiber-evoked field potentials but, surprisingly, inhibits the whole C-fiber-evoked field potential. The GABA<sub>B</sub> receptor antagonist, phaclofen, reverses such disinhibition-induced suppression of C-fiber-evoked field potentials. Moreover, the GABA<sub>B</sub> receptor agonist, baclofen, at low doses, can similarly selectively inhibit C-fiber-evoked field potentials whereas, at higher doses, it depresses both A- and C-fiber-evoked field potentials. Together, these results suggest that disinhibition-induced suppression of C-fiber-evoked field potentials is due to the activation of presynaptic GABA<sub>B</sub> receptors on C-fiber terminals. Glycinergic and/or GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition are known to reveal polysynaptic A-fiber inputs onto superficial DH/MDH neurons. Such A-fiber-evoked polysynaptic pathways might simultaneously inhibit C-fiber inputs to DH/MDH neurons by the way of last-order GABAergic interneurons and presynaptic GABA<sub>B</sub> receptors.

## Perspectives

Blocking local DH/MDH inhibition mimics the major characteristics of chronic pain states. However, glycinergic/GABA<sub>A</sub>ergic and GABA<sub>B</sub>ergic disinhibition produce different pain syndroms. We show here that these two inhibition systems actually serve



**different functions in the DH/MDH, characterizing mechanisms that may account for these two different pain phenotypes.**

## INTRODUCTION

Clinical pain associated either with peripheral tissue damage and inflammation (inflammatory pain) or with lesions to the nervous system (neuropathic pain) is characterized by persistent pain hypersensitivity, including spontaneous pain (pain in the absence of any obvious peripheral stimulus), hyperalgesia (increased responsiveness to noxious stimuli) and allodynia (pain in response to normally innocuous stimuli).

It is widely held that impaired synaptic inhibition within the spinal and medullary dorsal horns (DH) – the first relays on noxious pathways – contributes to such persistent pain hypersensitivity. There is evidence for reduced inhibitory mechanisms in many chronic pain states, including those resulting from inflammation<sup>32</sup>, nerve injury<sup>14,38,50,60</sup>, and spinal cord injury<sup>21</sup>. Synaptic inhibition in spinal and medullary DHs is mediated through activation of ionotropic – glycine and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) A – and metabotropic – GABA<sub>B</sub> – receptors. And, activation of local GABA<sub>A</sub><sup>23,35,39</sup> as well as GABA<sub>B</sub> receptors<sup>20,23,35,36,45,79</sup> has proved to be highly effective against both inflammatory and neuropathic pain.

Synaptic inhibition in DH has been shown to serve several functions. Sensory modalities are associated to DH lamination. Fine myelinated A $\delta$ - and unmyelinated C-fiber primary afferents, including most nociceptors, terminate in superficial DH (laminae I/II), whereas thick myelinated A $\beta$ -fibers, that transmit non-nociceptive information, terminate in deeper laminae (III/IV) (for review see<sup>76</sup>). And inhibitory systems in DH are assumed to, at least, attenuate nociceptive responses to an appropriate level to prevent hyperalgesia, mute nociceptive neurons in the absence of any sensory stimulus to prevent spontaneous pain, and functionally separate pathways for different sensory modalities (see<sup>59</sup>). However, glycine, GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors might not equally contribute to all these functions. Indeed, disruption of glycine, GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> synaptic inhibition differentially affect sensory

modalities. On the one hand, following pharmacological blockade of local glycine and GABA<sub>A</sub> receptors, touch can elicit a pain behavior (allodynia), while noxious mechanical and heat perceptions are little or not affected<sup>5,48,49,55,64,67,85</sup>. Similarly, responses of deep DH wide dynamic range (WDR) neurons to innocuous, but not noxious, mechanical stimulations are enhanced<sup>21,53,72,73</sup>. Finally, responses of lamina I<sup>38,48,63,78</sup> and WDR<sup>22,40,53</sup> neurons to A-fiber inputs are strongly potentiated whereas those to C-fiber inputs remain unaffected or even depressed.

Conversely, pharmacological blockade of local GABA<sub>B</sub> receptors produces tactile allodynia as well as thermal hyperalgesia<sup>45</sup> (but see<sup>35</sup>). Similarly, both acute thermal and mechanical thresholds are reduced in GABA<sub>B</sub> receptor knock-out mice<sup>28,62</sup>. And local application of GABA<sub>B</sub> receptor antagonists has no effect on the neuronal or field potential responses to A-fiber activation but facilitates those to C-fiber activation<sup>8,70</sup>. That disrupting, on the one hand, glycine and GABA<sub>A</sub> and, on the other hand, GABA<sub>B</sub> synaptic inhibitions have different functional consequences strongly suggests that glycine, GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors have distinct physiological roles.

To investigate how glycine, GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor-mediated inhibition act *in vivo* on A $\beta$ -, A $\delta$ - and C-fiber-evoked activation of neuronal circuits in superficial DH, we characterized the effect of locally applied glycine, GABA<sub>A</sub> and/or GABA<sub>B</sub> receptor-antagonists on A $\beta$ -, A $\delta$ - and C-fiber-evoked field potentials in superficial (laminae I-II) medullary dorsal horn (MDH), the major target to small diameter A $\delta$ - and C-fiber primary afferents from the face, mouth and meninges, in anaesthetized rats. A $\beta$ -, A $\delta$ - and C-fiber primary afferents to superficial MDH were activated by transcutaneous electrical stimulation of the face.

## MATERIAL AND METHODS

### *Animal preparation*

Animals were prepared as previously described<sup>13,16</sup>. Briefly, animals were anesthetized with 2% halothane (66% NO<sub>2</sub>/33% O<sub>2</sub>). After intramuscular injection of 100 µg atropine sulfate, the trachea was cannulated and the carotid artery and external jugular vein catheterized. Animals were then paralyzed by an intravenous perfusion of vecuronium bromide (2.4 mg/h) and artificially ventilated with a volume-controlled pump (54–55 strokes/min). Levels of halothane, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, and end-tidal CO<sub>2</sub> (3.5–4.5%) were measured by an anesthetic gas analyser (Vamos, Dräger, Lübeck, Germany) during the entire experimental period. These parameters were digitally displayed and under the control of alarms. The arterial catheter was attached to a calibrated pressure transducer (UFI, Morro Bay, CA, USA) connected to an amplifier (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) for continuous monitoring of the mean arterial blood pressure (90–110 mm Hg). The analog output from the blood pressure amplifier was connected to a computer data sampling system (Cambridge Electronics Design 1401 computer interface; Cambridge, UK). Heart rate was continuously monitored and cutaneous vascularization periodically checked by observing the color of the paw extremities and the rapidity by which they regained normal color after pressure application. Colorectal temperature was kept constant at 38 ± 0.5 °C by means of a feedback-controlled heating blanket. Surgical level of anesthesia was verified by a stable mean arterial blood pressure and a constant heart rate during noxious stimulation.

The animals were placed in a stereotaxic frame with the head fixed in a ventroflexed position (incisor bar dropped 5 mm under the standard position) by means of an adapted metallic bar. To expose the MDH, the overlying musculature, atlanto-occipital membrane and dura mater were removed. After surgery, halothane was reduced to 0.6-0.7% and maintained at this level during recordings. All exposed nervous tissues were maintained wet with warm

ACSF (pH 7.4) containing (in mM): 125 NaCl, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgSO<sub>4</sub>, and 25 glucose.

#### *Drug preparation and delivery*

In this study, receptor agonists and antagonists were applied either locally, directly into the cisterna magna over the MDH which had been previously exposed (see above) or intravenously (i.v.). Drugs used for intracisternal (i.c.) application included strychnine, bicuculline, phaclofen, baclofen and 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), all purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA). Stock solutions were obtained by dissolving drug powder in distilled water (strychnine, bicuculline) or DMSO (CNQX, phaclofen, baclofen). A fixed 10 µl volume was used for i.c. administration. Stock solutions were diluted in ACSF (see above) immediately before delivery at final concentrations (strychnine: 2 mM; bicuculline: 1 mM; phaclofen: 10 mM; baclofen: 0.07-7 mM; CNQX: 1 mM). I.c. applied doses were selected according to those used in previous experiments: strychnine (i.c. 20 nmol compared with intrathecal 2-550 nmol)<sup>40,48,49,53,63,67</sup>, bicuculline (i.c. 10 nmol compared with intrathecal 3-300 nmol)<sup>40,67</sup>, phaclofen (100 nmol compared with intrathecal 4-80 nmol)<sup>29,45,66</sup> and baclofen (0.007-0.7 nmol compared with intrathecal 0.05-17-5 nmol)<sup>19</sup>.

Both morphine (3 mg.kg<sup>-1</sup>; morphine chlorhydrate, CMD Lavoisier, Paris, France)<sup>18</sup> and naloxone (0.4 mg.kg<sup>-1</sup>; naloxone chlorhydrate, Narcan®, Bristol-Myers-Squibb, Italia)<sup>18</sup> were i.v. applied.

#### *Cutaneous stimulation and electrophysiological recordings*

Field potentials were evoked by electrical stimulation (1 ms, 0.066 Hz) of the upper lip – innervated by the maxillary trigeminal nerve (V2) –, using two subcutaneous needles, and recorded using a tungsten microelectrode (0.5 MΩ, World Precision Instruments, Sarasota, Florida). Recording sites within MDH were adjusted to yield maximal C-fiber field potentials.

As shown in Fig. 1A, sites were consistently within superficial MDH<sup>44,61</sup> in the area where V2 primary afferents terminate. Data were captured using two bandwidths to concomitantly record field potentials (300–10<sup>4</sup> Hz) and action potentials (1–10<sup>4</sup> Hz) of nearby neurons at the same site. Data were analyzed by a CED 1401 interface coupled to a Pentium computer with Spike 2 software (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK).

When stimulus intensity was appropriate to recruit both A- and C-fibers (5–20 mA), test stimuli evoked three different field potentials. It is now well established that, in control conditions, the extracellular field potentials evoked by afferent stimulation predominantly reflect the population monosynaptic EPSPs of nearby neurons<sup>4,61,65</sup> likely because neurons in superficial DH receive monosynaptic excitatory connections from primary afferents as well as closely timed disynaptic inhibition<sup>87</sup>. Such synchronized synaptic inhibitory input precludes large diffusion of excitation through local polysynaptic circuits. The conduction velocities of the primary afferent fibers initiating these field potentials could thus be easily computed on the basis of measurements of (1) the distance between the cutaneous stimulation site and the trigeminal ganglion (~30 mm) and between the trigeminal ganglion and the central recording site (~15 mm) and (2) latencies (including the 1 ms synaptic delay). These calculations assume a straight line between the trigeminal ganglion and MDH; without a loop through the trigeminal subnuclei oralis and interpolaris. The relative contribution of MDH population postsynaptic potentials or the afferent volley to the field potential with the shortest latency was tested by examining the effects of i.c. application of the antagonist of AMPA/kainate glutamate receptors, CNQX (1 mM; n=2) on field potentials. Blockade of AMPA-mediated fast excitatory synaptic transmission resulted in a dramatic decrease in the amplitude of all three field potentials, including the earliest one, arguing that this early potential represents the population monosynaptic EPSPs of nearby neurons rather than the afferent volley. That, at high dose (0.7 nmol; n = 3), the GABA<sub>B</sub> receptor antagonist, baclofen, similarly depresses this early potential is also consistent with this conclusion (Fig. 6C).

### *Data analysis and statistics*

Blockade of segmental glycine and GABA<sub>A</sub> receptors is known to enhance electrical responses evoked polysynaptically by A-fiber primary afferents in both DH and MDH, *in vitro*<sup>78</sup> as well as *in vivo*<sup>8,48</sup>. Therefore, to determine which parts – early (monosynaptic) and/or late part (polysynaptic) – of A-fiber-evoked field potentials are potentiated, we measured the amplitude of the field potentials at different delays – peak of 1<sup>st</sup> potential, minimum between the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> potentials, peak of the 3<sup>rd</sup> potential – and times to peak of the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> potentials. The 3<sup>rd</sup> potential was assessed as the area between the recorded wave-form signal and a straight line tangential to it, before and after the field potential (see Fig. 1D). Data were normalized to the averaged value obtained during the 10 min period before drug application. Student *t*-test, paired *t*-test and Mann-Whitney rank sum test were used for statistical analysis and  $p < 0.05$  was considered significant. Means are given as means  $\pm$  s.e.m..

### *Histology*

At the end of experiments, electrolytic lesions were performed at the recording sites by passing through the tip of the recording electrode a direct anodal current (20  $\mu$ A for 20 s). Rats were killed by an overdose of halothane, brains removed and put into fixative (formaldehyde: 25%) Ninety  $\mu$ m-thick transverse sections were cut from brainstems using a freezing microtome and observed under microscope.

## **RESULTS**

### *Properties of field potentials evoked in superficial MDH by cutaneous stimulation*

Electrical stimulation of the skin evoked two successive negative potentials in superficial MDH (latency to onset and to peak of the 1<sup>st</sup> potential:  $1.6 \pm 0.0$  and  $2.7 \pm 0.1$  ms, respectively, and 2<sup>nd</sup> potential:  $5.8 \pm 0.2$  and  $15.8 \pm 0.1$  ms, respectively;  $n = 16$ ; Fig. 1B). On

increasing stimulus intensity, an additional negative, long latency (latency to onset and to peak  $46.5 \pm 2.4$  and  $71.4 \pm 2.3$  ms, respectively;  $n = 16$ ) was observed. This late field potential was typically superimposed on the 2<sup>nd</sup> one. The amplitudes of the three negative field potentials plateaued as stimulation intensity was further increased (Fig. 1C). The 3<sup>rd</sup> field potentials had significantly higher thresholds ( $1.9 \pm 0.4$  mA compared with  $0.2 \pm 0.1$  mA for the two first field potentials,  $p < 0.001$ ;  $n = 14$ ) and reached its maximum amplitude at higher intensities than the two first ones. This resulted in a rightward shift in its stimulus-response curve compared with those of the two earlier field potentials (Fig. 1C).

The estimated conduction velocities of primary afferent fibers eliciting the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> potential ( $\leq 81.8$ ,  $\leq 9.4$  and  $\leq 1.0$  m.s<sup>-1</sup>, respectively; see Material and methods) corresponded to those expected for A $\beta$ -, A $\delta$ - and C-fiber primary afferents. Field potentials and action potentials of neighboring single neurons elicited by the same cutaneous stimulation, were recorded with the same electrode but with different filter settings (see Material and methods). From the example in Fig. 1D, it is clear that the 3<sup>rd</sup> field potential and late burst discharges have the same delay (about +50 ms) and that the amplitude of the field potential and number of spikes in the discharge are correlated. This was observed in all rats studied exhibiting spikes with large amplitudes ( $n = 8$ ). Since burst discharges at latencies  $>30$  ms are known to be elicited by C-fiber primary afferents<sup>17,34</sup>, these results strongly suggest that the 3<sup>rd</sup> field potential is evoked by C-fiber activation.

Therefore, our results suggest that 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> field potential reflect the excitatory response of nearby neurons in superficial MDH to activation of A $\beta$ -, A $\delta$ - and C-fiber primary afferents, respectively. These potentials will thus be referred to as A $\beta$ -, A $\delta$ - and C-fiber field potentials in the remainder of the paper.

*C-fiber field potential is selectively abolished by systemic morphine.*

The relatively high threshold current for evoking the 3<sup>rd</sup> field potential and its long latency already strongly suggests that this potential is evoked by C-fiber activation. To confirm this



hypothesis, we tested the effect of systemic application of the opioid receptor agonist, morphine, on field potentials in superficial MDH. Systemic morphine has previously been shown to reduce the responses of neurons to specifically C-fiber activation both in spinal DH<sup>9,42,75</sup> and MDH<sup>18</sup>. I.v. morphine (3 mg.kg<sup>-1</sup>) quickly reduced, if not completely suppressed (see example in Fig. 2A), C-fiber field potentials (+10 min after injection: 26.1 ± 11.7% of baseline; p < 0.01; n = 6; Fig. 2B). This effect was specific of C-fiber field potentials as neither Aβ- nor Aδ-fiber field potentials were affected (+10 min after injection: 110.4 ± 4.2% and 102.5 ± 1.7% of baseline, respectively; n = 6; Fig. 2B). Depression of C-fiber field potentials was reversed by i.v. injection of the opioid receptor antagonist, naloxone (Fig. 2 A, B), thus confirming that it was actually due to the activation of opioid receptors.

*Blocking segmental glycine and GABA<sub>A</sub> receptors potentiates A-fiber field potentials and concomitantly inhibits C-fiber ones*

The effect of blocking segmental glycinergic inhibition was assessed in 9 animals (Fig. 3). Following i.c. application of the glycine receptor antagonist, strychnine (20 nmol), Aβ- as well as Aδ-fiber field potentials were potentiated. The effect of strychnine was apparent as soon as 2 min after application and a complete potentiation was seen at 10-12 min (Fig. 3A). Such potentiation appeared to involve the late parts of both Aβ- and Aδ-fiber field potentials. The late part of the Aβ-fiber field potential was potentiated (226.9 ± 25.8% of baseline; see Material and methods) while its peak was not affected (amplitude: 106.0 ± 7.4% of baseline) (see example in Fig. 3A). Similarly, the peak of the Aδ-fiber field potential was potentiated (155.9 ± 8.1% of baseline; p<0.001) and concomitantly delayed (from 13.6 ± 0.4 to 21.8 ± 1.7 ms, p < 0.001) (Fig. 3A, C). On the other hand, the whole C-fiber field potential was concomitantly strongly, if not completely, inhibited (15.4 ± 7.2% of baseline; p<0.001; Fig. 3A, C). All these modifications were reversible upon washout (Fig. 3A).

That the response of MDH neurons to C-fiber activation was depressed whereas that to A-fiber activation was enhanced strongly suggests that the suppression of C-fiber field

potentials was due to presynaptic inhibition. Both GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors are present on primary afferent terminals in the spinal cord (for review see<sup>57</sup>). We first tested whether blocking GABA<sub>A</sub> receptors could prevent strychnine-induced suppression of C-fiber field potentials. Co-applied i.c. strychnine (20 nmol) and bicuculline (10 nmol) led to the very same effect as strychnine alone (n=3; not shown). I.c. bicuculline (10 nmol; n=7) alone, too, produced the very same changes in A $\beta$ -, A $\delta$ - and C-fiber field potentials as i.c. strychnine: no change in the peak of A $\beta$ -fiber field potentials (10-12 min after i.c. bicuculline:  $100.9 \pm 2.6\%$  of baseline), potentiation of the late part of A $\beta$ -fiber field potential ( $140.0 \pm 17.5\%$ ,  $p < 0.05$ ), potentiation of A $\delta$ -fiber field potential ( $139.1 \pm 12.4\%$ ,  $p < 0.05$ ) and strong, if not complete, inhibition of C-fiber field potentials ( $15.6 \pm 8.4$ ,  $p < 0.001$ ) (see example in Fig. 3B). It is noteworthy, however, that 10 nmol i.c. bicuculline produced a smaller potentiation in both A $\beta$ - and A $\delta$ -fiber field potentials than 20 nmol i.c. strychnine ( $p < 0.05$ ; Fig. 3C). On the other hand, bicuculline and strychnine similarly depressed C-fiber field potentials (Fig. 3C).

*Blocking GABA<sub>B</sub> receptor reverses strychnine-induced suppression of C-fiber field potentials.*

We thus tested whether strychnine-induced suppression of C-fiber field potentials was due to activation of GABA<sub>B</sub> receptors. We applied the GABA<sub>B</sub> receptor antagonist, phaclofen, together with strychnine (n=11; Fig. 4). Co-applied i.c. strychnine (20 nmol) and phaclofen (100 nmol) produced the very same potentiations of the late component of the A $\beta$ -fiber (10-12 min after i.c. application:  $214.3 \pm 2.4\%$  of baseline,  $p < 0.001$ ; compared with  $226.9 \pm 25.8\%$  following strychnine alone) and A $\delta$ -fiber field potentials (10-12 min after i.c. application:  $143.5 \pm 6.0$  of baseline,  $p < 0.001$ ; compared with  $155.9 \pm 8.1\%$  following strychnine alone; Fig. 4B). But phaclofen completely reversed strychnine-induced suppression of C-fiber field potentials (10-12 min after i.c. application:  $102.3 \pm 14.1\%$  of baseline; compared with  $15.4 \pm 7.2\%$  following strychnine alone,  $p < 0.001$ ; Fig. 4A, B).

*GABA<sub>B</sub> receptors preferentially modulate C-fiber field potentials.*

These results suggest that GABA<sub>B</sub> receptors are activated upon glycinergic and GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition and account for the suppression of C-fiber field potentials. To test this hypothesis we i.c. applied phaclofen, also in control conditions. I.c. phaclofen (100 nmol) selectively potentiated C-fiber field potentials (+5 min after i.c. application:  $144.8 \pm 6.7\%$  of baseline,  $p < 0.01$ ;  $n = 7$ ), A $\beta$ - and A $\delta$ -fiber field potentials being not affected ( $101.7 \pm 2.5\%$  and  $100.7 \pm 2.9\%$  of baseline, respectively; Fig. 3). Phaclofen-induced selective potentiation of C-fiber field potentials was progressively reversible upon washout.

We also tested whether pharmacological activation of segmental GABA<sub>B</sub> receptors can conversely selectively inhibit C-fiber field potentials. Local application of the GABA<sub>B</sub> receptor agonist, baclofen, is known to inhibit C fiber-evoked response in DH neurons<sup>19,71</sup>. However, such inhibition has been shown to be selective of C fiber-evoked neuronal responses<sup>19</sup> as well as to affect both C- and A-fiber-evoked ones<sup>71</sup>. We hypothesized that such difference in baclofen selectivity was dose-dependent. We therefore assessed the effect of increasing doses of i.c. baclofen (Fig. 6). Low doses of baclofen (0.007 nmol) had very little effect on only C-fiber field potentials ( $83.7 \pm 1.2\%$  of baseline,  $p < 0.001$ ;  $n = 4$ ), A $\beta$ - and A $\delta$ -fiber field potentials being not affected ( $95.1 \pm 2.9\%$  and  $95.6 \pm 1.2\%$  of baseline, respectively). I.c. application of 0.07 nmol of baclofen (Fig. 6A) produced a rapid and powerful, if not complete (Fig. 6A), reduction in C-fiber field potentials in all rats ( $25.9 \pm 10.5\%$  of baseline,  $p < 0.01$ ;  $n = 5$ ). This effect again preferentially involved C-fiber field potentials ( $p < 0.001$ ) since A $\beta$ - and A $\delta$ -fiber field potentials were hardly depressed ( $87.2 \pm 4.2\%$  of baseline, n.s.  $p = 0.065$  and  $86.3 \pm 3.8\%$  of baseline,  $p < 0.05$ ). The effects of 0.07 nmol i.c. baclofen progressively recovered, though incompletely, within 1 h (Fig. 6A). The effect of these low doses of baclofen on the A $\beta$ -, A $\delta$ - and C-fiber field potentials are summarized in figure 6B. Finally, i.c. application of higher doses of baclofen (0.7 nmol) led to a strong depression of the three field potentials of all rats ( $n = 3$ ; see example in Fig. 6C) and did not show any sign

of recovery during recording (not shown). It is clear that baclofen at these high concentrations produces extremely prolonged effects.

## DISCUSSION

We show that transcutaneous electrical stimulation of the face evokes three negative field potentials with different latencies in superficial MDH. The estimated conduction velocities of the primary afferent fibers eliciting these field potentials are within the A $\beta$ -, A $\delta$ - and C-fiber ranges, respectively. Systematic application of the opioid receptor agonist, morphine, suppresses specifically C-fiber field potentials and this is reversed by systematic naloxone. Following i.c. application of glycine or GABA<sub>A</sub> receptor antagonists, the late components of both A $\beta$ - and A $\delta$ -fiber field potentials are strongly enhanced whereas the whole C-fiber field potential is decreased, if not completely suppressed. Blocking segmental GABA<sub>B</sub> receptors reverses such suppression of C-fiber field potentials. Interestingly, it also selectively potentiates the whole C-fiber-evoked field potential under control conditions. Finally, at low doses, baclofen inhibits selectively C-fiber field potentials whereas, at higher doses, it depresses both A- and C-fiber field potentials.

Estimated conduction velocities suggest that the 3<sup>rd</sup> field potential is due to the activation of second order neurons by C-fiber primary afferents in superficial MDH. However, that this field potential is consistently superimposed on the 2<sup>nd</sup> one raises the question as to whether it is generated, as the 2<sup>nd</sup> field potential, by A $\delta$ -fiber primary afferents but with slower conduction velocities. This is unlikely. First, this 3<sup>rd</sup> field potential, in addition to a longer delay, has a higher threshold than the two first ones<sup>44,61</sup>. Such high threshold strengths are within the range of those eliciting C-fiber inputs to trigeminal neurons in comparable *in vivo* recordings ( $1.92 \pm 0.36$  mA vs.  $8.1 \pm 0.7$  mA in<sup>17</sup>). And the ratio between the thresholds for evoking the first two and the 3<sup>rd</sup> field potentials ( $\sim 10$ ) is similar to that between stimulus strengths for activating A $\delta$ - and C-fiber primary afferents ( $\sim 5$ ) both *in*

*vivo*<sup>8</sup> and *in vitro*<sup>77,78</sup>. Finally, this 3<sup>rd</sup> field potential, but not the two first, is completely abolished following systemic morphine. Either systemic or local application of morphine is known to predominantly reduce C-fiber-evoked neuronal responses or field potentials, with much less or no effect on A-fiber-evoked responses, both in spinal DH<sup>9,42,75</sup> and MDH<sup>16,18</sup>. Altogether, long latencies, high thresholds and susceptibility to opioid receptor activation are all consistent with our conclusion that the 3<sup>rd</sup> field potential is evoked by C-fiber primary afferents.

C-fiber field potentials are selectively decreased following i.c. applied low doses of baclofen and enhanced after i.c. phaclofen. This is in agreement with previous reports showing that baclofen can depress neuronal responses to noxious mechanical, but not to tactile, stimulations<sup>19,30</sup>, and more C- than A $\delta$ - and A $\beta$ -fiber-evoked neuronal responses<sup>1,19</sup>. And phaclofen is known to selectively potentiate C-fiber-evoked neuronal responses<sup>70</sup> and field potentials<sup>8</sup>. GABA<sub>B</sub> receptors are present at pre- and post-synaptic loci (for review see<sup>6</sup>). Activation of postsynaptic GABA<sub>B</sub> receptors can hardly account for our results. Most C-fiber primary afferents would have to terminate on a subpopulation of DH neurones which would exclusively receive C-fiber primary afferents. Most lamina I<sup>15,63</sup> and II<sup>3,86,88</sup> neurons are innervated by both C- and A $\delta$ -fiber primary afferents. The selective suppression of C-fiber field potentials is much more likely due to the activation of GABA<sub>B</sub> receptors on C-fiber terminals. First, that rhizotomy as well as neonatal treatment with capsaicin produce a similar 50% reduction in GABA<sub>B</sub> binding sites within superficial DH<sup>52,53</sup> suggests that GABA<sub>B</sub> receptors are mostly located on C-fiber terminals. Second, pre-synaptic GABA<sub>B</sub> receptors appear to be preferentially activated compared with postsynaptic ones. While baclofen, at low concentrations, attenuates synaptic transmission, larger concentrations are needed to also hyperpolarize postsynaptic motoneurons<sup>80</sup>. Similarly, under conditions where GABA released is insufficient to affect postsynaptic GABA<sub>A</sub> receptors at lamina I inhibitory synapses, significant activation of presynaptic GABA<sub>B</sub> receptors can still occur<sup>12</sup>. This suggests that, at

low doses, baclofen selectively decreases C-fiber field potentials because it preferentially activates presynaptic GABA<sub>B</sub> receptors on C-fiber terminals whereas, at higher doses, it also activates postsynaptic GABA<sub>B</sub> receptors, depressing both A- and C-fiber field potentials. This also further confirms our conclusion that C-fiber primary afferents initiate the 3<sup>rd</sup> field potentials.

Following glycinergic and GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition, the whole C-fiber field potential is selectively decreased, if not completely suppressed, while A-fiber field potentials are either not affected (early component) or potentiated (late component). Such selective depression of C-fiber field potentials is prevented by i.c. phaclofen. These C-fiber field potentials, were nevertheless not as potentiated as those following phaclofen alone ( $102.3 \pm 14.1\%$  compared with  $144.8 \pm 6.7\%$  of baseline,  $p < 0.05$ ), suggesting that 100 nmol phaclofen had not completely relieved strychnine-induced depression of C-fiber field potentials. One possible interpretation of our results is that disinhibition facilitates the recruitment of inhibitory interneurons and, in turn, the activation of GABA<sub>B</sub> receptors on C-fiber terminals, likely through local excitatory polysynaptic circuits. Neurons in superficial DH receive monosynaptic excitatory connections from primary afferents as well as closely timed disynaptic inhibition<sup>87</sup>. Synchronized synaptic inhibitory input precludes large diffusion of excitation through local polysynaptic circuits. Disruption of DH inhibition relieves polysynaptic circuits. Following glycinergic and/or GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition, the late parts of A-fiber field potentials considered as polysynaptic are enhanced (present results and<sup>7</sup>) and polysynaptic inputs onto lamina I<sup>48,78</sup> and II<sup>3</sup> neurons facilitated.

In addition, conditioning stimulation of A-fiber primary afferents is known to inhibit C-fiber inputs to DH via activation of GABA receptors. Repetitive stimulation of either peripheral nerves, at stimulus intensities sufficient to only excite large A $\beta$  myelinated afferent fibers<sup>11,31</sup>, or their collaterals in the dorsal column<sup>31</sup> suppresses noxious heat-evoked discharges in DH neurons. Repetitive stimulation of peripheral nerves also inhibits C-fiber-

evoked responses in DH neurons<sup>7,11</sup>. Similarly, long, repetitive transcutaneous electrical nerve stimulations (TENS), or TENS-like stimulations of adjacent nerves, that activate A fibers, increases tail-flick latency<sup>83,84</sup> and reduces both C-fiber-evoked flexion reflex<sup>68,69</sup> and responses of DH neurons<sup>25,27,43</sup>. Increasing intensity, to strengths that activate A $\delta$ -fiber primary afferents, might produce greater inhibition<sup>43,69</sup>. A-fiber-dependent control of C-fiber inputs involves segmental mechanisms as it also occurs in spinal animals<sup>7,11,26,31,84</sup>. It involves GABAergic inhibitory interneurons. Brushing skin hairs<sup>33</sup> or stimulating nerves, at stimulus intensities just enough to activate A-fiber primary afferents<sup>10,24</sup> can increase the excitability of C-fiber primary afferents, through presynaptic GABA<sub>A</sub> receptors. However, GABA<sub>A</sub> receptor-mediated excitability changes in C-fiber primary afferents appear to be much smaller than in A-fiber primary afferents<sup>10</sup> suggesting that other mechanisms are involved in presynaptic inhibition of C-fiber primary afferents (but see<sup>82</sup>; for review see<sup>57</sup>). Together with previous evidence that activation of GABA<sub>B</sub>, but not of GABA<sub>A</sub>, receptors inhibits substance P release from peptidergic C-fiber terminals<sup>46,54</sup> and mediates intersegmental A-fiber-dependent control of C-fiber<sup>37</sup>, our results suggest that A-fiber-dependent inhibition of C-fiber inputs rather acts via GABA<sub>B</sub> receptors.

That pharmacological and genetic impairment of GABA<sub>B</sub> receptors decreases thermal and mechanical thresholds<sup>28,45,62</sup> (but see<sup>35</sup>) facilitates C-fiber-evoked neuronal and field potential responses in DH (present results and<sup>8,70</sup>), suggest that there is an endogenous GABA<sub>B</sub> receptor tone. Tonic inhibition has been identified as a key regulator of inhibitory tone in DH<sup>2,74</sup>. Therefore, an alternative possibility to account for our results is that endogenous GABA<sub>B</sub> receptor tone is facilitated by glycinergic/GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition. However, it is noteworthy that such disinhibition-induced depression of C-fiber inputs has not been previously reported in DH (see for instance<sup>8</sup>). This suggests that a difference in the DH and MDH neuronal networks rather accounts for such discrepancy.

Trigeminal circuits appear particularly prone to A-fiber-dependent control of C-fiber inputs. First, such control is limited in time (maximum at 20-40 ms)<sup>7,11</sup>. Provided that the delay between A- and C-fiber-evoked activations of DH neurons is too long – 80-130 ms in lumbar DH<sup>44,61</sup> –, the A-fiber-evoked activation of polysynaptic circuits has already vanished when C-fiber primary afferents activate DH neurons. The distance skin-MDH (~4.5 cm), and thus the delay between A- and C-fiber-evoked activations of MDH neurons are much shorter. A- and C-fiber primary afferents will easier interfere with each other. Second, the A/C fiber ratio is larger in trigeminal sensory roots than in spinal dorsal ones (40-50% compared with up to 80% of unmyelinated fibers)<sup>58,81,89</sup>. A-fiber-dependent control of C-fiber inputs might thus be facilitated in upper segments of the body.

In conclusion, our results suggest that A-fiber primary afferents activate polysynaptic excitatory pathways which, in turn, activate GABAergic neurons, inhibiting C-fiber inputs via GABA<sub>B</sub> receptors. The two inhibitory systems, glycinergic/GABA<sub>A</sub>ergic and GABA<sub>B</sub>ergic, would thus serve very different functions. Such differences might account for the very different pain syndromes following impairment of these inhibitory systems. Though we cannot determine which A-fiber primary afferents (A $\beta$  and/or A $\delta$ ) activate polysynaptic circuits, our results might be interpreted in the view of the gate control theory<sup>47</sup>. However, it is noteworthy that glycinergic/GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition, as it inhibits C-fiber inputs, also unmasks innocuous inputs to superficial DH nociceptive specific neurons, turning touch into pain<sup>48,78</sup>. DH neuronal networks might thus be functionally reoriented to serve pain modalities with high sensory-discriminative information such as mechanical allodynia conveyed by rapidly conducting A $\beta$ -fiber primary afferents which, by preventing contacts with the damaged part, facilitates wound repair. Thus release of glutamate from a TRPV1 subpopulation of neurons has been shown to both transmit thermal pain and, simultaneously, prevent excessive scratching by activating inhibitory interneurons projecting onto second order neurons on itch pathways<sup>41,56</sup>.



### **Conflict of interest statement**

The authors have no conflict of interest to declare.

### **Acknowledgements**

We thank Jean-Louis Molat for technical help during electrophysiological experiments and Anne-Marie Gaydier for secretarial assistance. This work was supported by funding from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Université Clermont1 (France), and Région Auvergne (France).

## References

1. Ataka T, Kumamoto E, Shimoji K, Yoshimura M: Baclofen inhibits more effectively C-afferent than Adelta-afferent glutamatergic transmission in substantia gelatinosa neurons of adult rat spinal cord slices. *Pain* 86:273-282, 2000
2. Ataka T, Gu JG: Relationship between tonic inhibitory currents and phasic inhibitory activity in the spinal cord lamina II region of adult mice. *Mol Pain* 2: 36, 2006
3. Baba H, Ji RR, Kohno T, Moore KA, Ataka T, Wakai A, Okamoto M, Woolf CJ: Removal of GABAergic inhibition facilitates polysynaptic A fiber-mediated excitatory transmission to the superficial spinal dorsal horn. *Mol Cell Neurosci.* 24:818-830, 2003
4. Baldissera F, Hultborn H, Illert M: Integration in spinal neuronal systems. In: *Handbook of physiology, Section I: The nervous system*, Williams & Wilkins, Baltimore, 1981, pp 509–595
5. Beyer C, Roberts LA, Komisaruk BR: Hyperalgesia induced by altered glycinergic activity at th spinal cord. *Life Sci* 37:875–882, 1985
6. Bowery NG, Bettler B., Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ: International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian  $\gamma$ -Aminobutyric Acid<sub>B</sub> Receptors: Structure and Function. *Pharmacological reviews* 54(2): 247-264, 2002
7. Brown, AG, Kirk RJ, Martin HF: Descending and segmental inhibition of transmission through the spinocervical tract. *J. Physiol* 230:689-705, 1973
8. Buesa I, Ortiz V, Aguilera L, Torre F, Zimmermann M, Azkue JJ: Disinhibition of spinal responses to primary afferent input by antagonism at GABA receptors in urethane-anaesthetised rats is dependent on NMDA and metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 50:585-94, 2006
9. Buesa I, Urrutia A, Bilbao J, Aguilera L, Zimmermann M, Azkue JJ: Non-linear morphine-induced depression of spinal excitation following long-term potentiation of C fibre-evoked spinal field potentials. *Eur J Pain* 12:814-817, 2008

10. Calvillo O, Madrid J, Rudomin P: Presynaptic depolarization of unmyelinated primary afferent fibers in the spinal cord of the cat. *Neuroscience* 7:1389-1400, 1982
11. Cervero F, Iggo A, Ogawa H: Nociceptor-driven dorsal horn neurones in the lumbar spinal cord of the cat. *Pain* 2:5-24, 1976
12. Chéry N, De Koninck Y: GABA(B) receptors are the first target of released GABA at lamina I inhibitory synapses in the adult rat spinal cord. *J Neurophysiol.* 84:1006-1011, 2000
13. Coste J, Voisin DL, Miraucourt LS, Dallel R, Luccarini P: Dorsal horn NK1-expressing neurons control windup of downstream trigeminal nociceptive neurons. *Pain* 137:340-351, 2008
14. Coull JA, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sík A, De Koninck P, De Koninck Y: Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 424:938-942, 2003
15. Dahlhaus A, Ruscheweyh R, Sandkühler J: Synaptic input of rat spinal lamina I projection and unidentified neurons in vitro. *J Physiol* 566:355–368, 2005
16. Dallel R, Dualé C, Molat JL: Morphine administered in the substantia gelatinosa of the spinal trigeminal nucleus caudalis inhibits nociceptive activities in the spinal trigeminal nucleus oralis. *J Neurosci* 18:3529-3536, 1998
17. Dallel R, Duale C, Luccarini P, Molat JL: Stimulus-function, wind-up and modulation by diffuse noxious inhibitory controls of responses of convergent neurons of the spinal trigeminal nucleus oralis. *Eur J Neurosci* 11:31-40, 1999
18. Dallel R, Luccarini P, Molat JL, Woda A: Effects of systemic morphine on the activity of convergent neurons of spinal trigeminal nucleus oralis in the rat. *Eur J Pharmacol* 314:19-25, 1996
19. Dickenson AH, Brewer CM, Hayes NA: Effects of topical baclofen on C fibre-evoked neuronal activity in the rat dorsal horn. *Neuroscience* 14:557-562, 1985

20. Dirig DM, Yaksh TL: Intrathecal baclofen and muscimol, but not midazolam, are antinociceptive using the rat-formalin model. *J Pharmacol Exp Ther* 275:219-227, 1995
21. Drew GM, Siddall PJ, Duggan AW: Mechanical allodynia following contusion injury of the rat spinal cord is associated with loss of GABAergic inhibition in the dorsal horn. *Pain* 109:379-388, 2004
22. Duggan AW, Griersmith BT, Johnson SM: Supraspinal inhibition of the excitation of dorsal horn neurones by impulses in unmyelinated primary afferents: lack of effect by strychnine and bicuculline. *Brain Res* 210:231-241, 1981
23. Eaton MJ, Martinez MA, Karmally S: A single intrathecal injection of GABA permanently reverses neuropathic pain after nerve injury. *Brain Res* 835:334-339, 1999
24. Fitzgerald M, Woolf CJ: Effects of cutaneous nerve and intraspinal conditioning of C-fibre afferent terminal excitability in decerebrate spinal rats. *J Physiol* 318:25-39, 1981
25. Garrison DW, Foreman RD: Decreased activity of spontaneous and noxiously evoked dorsal horn cells during transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS). *Pain* 58:309-315, 1994
26. Garrison DW, Foreman RD: Effects of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) on spontaneous and noxiously evoked dorsal horn cell activity in cats with transected spinal cords. *Neurosci Lett*.216:125-128, 1996
27. Garrison DW, Foreman RD: Classification of dorsal horn neurons based on somatic receptive fields in cats with intact and transected spinal cords: neural plasticity. *Brain Res* 762:228-230, 1997
28. Gassmann M, Shaban H, Vigot R, Sansig G, Haller C, Barbieri S, Hameau Y, Schuler V, Muller M, Kinzel B, Klebs K, Schmutz M, Froestl W, Heid J, Kelly PH, Gentry C, Jatton AL, Van der Putten H, Mombereau C, Lecourtier L, Mosbacher J, Cryan JF, Fritschy JM,

Lüthi A, Kaupmann K, Bettler B. Redistribution of GABAB(1) protein and atypical

GABAB responses in GABAB(2)-deficient mice. *J Neurosci* 24, 6086–6097, 2004

29. Gwak YS, Tan HY, Nam TS, Paik KS, Hulsebosch CE, Leem JW: Activation of spinal GABA receptors attenuates chronic central neuropathic pain after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 23:1111-1124, 2006
30. Hao JX, Xu XJ, Yu YX, Seiger A, Wiesenfeld-Hallin Z: Baclofen reverses the hypersensitivity of dorsal horn wide dynamic range neurons to mechanical stimulation after transient spinal cord ischemia; implications for a tonic GABAergic inhibitory control of myelinated fiber input. *J Neurophysiol* 68:392-396, 1992
31. Handwerker HO, Iggo A, Zimmerman M: Segmental and supraspinal actions on dorsal horn neurones responding to noxious and non-noxious skin stimuli. *Pain* 1:147-65, 1975
32. Harvey RJ, Depner UB, Wässle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K, Schütz B, Abo-Salem OM, Zimmer A, Poisbeau P, Welzl H, Wolfer DP, Betz H, Zeilhofer HU, Müller U: GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* 304:884-887, 2004
33. Hentall ID, Fields HL: Segmental and descending influences on intraspinal thresholds of single C-fibers. *J Neurophysiol* 42:1527-1537, 1979
34. Hu JW: Response properties of nociceptive and non-nociceptive neurons in the rat's trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) related to cutaneous and deep craniofacial afferent stimulation and modulation by diffuse noxious inhibitory controls. *Pain* 41:331–345, 1990
35. Hwang JH, Yaksh TL: The effect of spinal GABA receptor agonists on tactile allodynia in a surgically-induced neuropathic pain model in the rat. *Pain* 70:15-22, 1997

36. Hwang JH, Hwang KS, Kim JU, Choi IC, Park PH, Han SM: The interaction between intrathecal neostigmine and GABA receptor agonists in rats with nerve ligation injury. *Anesth Analg* 93:1297–1303, 2001
37. Jones TL, Sweitzer SM, Peters MC, Wilson SP, Yeomans DC: GABA<sub>B</sub> receptors on central terminals of C-afferents mediate intersegmental Ad-afferent evoked hypoalgesia. *Eur J Pain* 9:233–242, 2005
38. Keller AF, Beggs S, Salter MW, De Koninck Y: Transformation of the output of spinal lamina I neurons after nerve injury and microglia stimulation underlying neuropathic pain. *Mol Pain* 27:3-27, 2007
39. Knabl J, Witschi R, Hösl K, Reinold H, Zeilhofer UB, Ahmadi S, Brockhaus J, Sergejeva M, Hess A, Brune K, Fritschy JM, Rudolph U, Möhler H, Zeilhofer HU: Reversal of pathological pain through specific spinal GABA<sub>A</sub> receptor subtypes. *Nature* 451:330-334, 2008
40. Kontinen VK, Stanfa LC, Basu A, Dickenson AH: Electrophysiologic evidence for increased endogenous GABAergic but not glycinergic inhibitory tone in the rat spinal nerve ligation model of neuropathy. *Anesthesiology* 94:333-339, 2001
41. Lagerström MC, Rogoz K, Abrahamsen B, Persson E, Reinius B, Nordenankar K, Olund C, Smith C, Mendez JA, Chen ZF, Wood JN, Wallén-Mackenzie A, Kullander K: VGLUT2-dependent sensory neurons in the TRPV1 population regulate pain and itch. *Neuron* 68:529-542, 2010
42. Le Bars D, Rivot JP, Guilbaud G, Menetrey D, Besson JM: The depressive effect of morphine on the C fibre response of dorsal horn neurones in the spinal rat pretreated or not by pCPA. *Brain Res* 176:337-353, 1979
43. Lee KH, Chung JM, Willis WD: Inhibition of primate spinothalamic tract cells by TENS. *J Neurosurg* 62:276-287, 1985

44. Liu X, Sandkühler J: Characterization of long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in spinal dorsal horn of adult rat: essential role of NK1 and NK2 receptors. *J Neurophysiol* 78:1973-1982, 1997
45. Malan TP, Mata HP, Porreca F: Spinal GABA(A) and GABA(B) receptor pharmacology in a rat model of neuropathic pain. *Anesthesiology* 96(5):1161-1167, 2002
46. Marvizón JC, Martínez V, Grady EF, Bunnett NW, Mayer EA: Neurokinin 1 receptor internalization in spinal cord slices induced by dorsal root stimulation is mediated by NMDA receptors. *J Neurosci* 17:8129-8136, 1997
47. Melzack R, Wall PD: Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150:971-979, 1965
48. Miraucourt LS, Dallel R, Voisin DL: Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through PKCgamma interneurons. *PLoS One* 2(11):e1116, 2007
49. Miraucourt LS, Moisset X, Dallel R, Voisin DL: Glycine inhibitory dysfunction induces a selectively dynamic, morphine-resistant, and neurokinin 1 receptor- independent mechanical allodynia. *J Neurosci* 29:2519-2527, 2009
50. Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ: Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci* 22:6724-6731, 2002
51. Price GW, Kelly JS, Bowery NG: The location of GABAB receptor binding sites in mammalian spinal cord. *Synapse* 1(6):530-538, 1987
52. Price GW, Wilkin GP, Turnbull MJ, Bowery NG: Are baclofen-sensitive GABAB receptors present on primary afferent terminals of the spinal cord? *Nature* 307:71-74, 1984
53. Reeve AJ, Dickenson AH, Kerr NC: Spinal effects of bicuculline: modulation of an allodynia-like state by an A1-receptor agonist, morphine, and an NMDA-receptor antagonist. *J Neurophysiol* 79:1494-1507, 1998

54. Riley RC, Trafton JA, Chi SI, Basbaum AI: Presynaptic regulation of spinal cord tachykinin signaling via GABA(B) but not GABA(A) receptor activation. *Neuroscience* 103:725-37, 2001
55. Roberts LA, Beyer C, Komisaruk BR: Nociceptive responses to altered GABAergic activity at the spinal cord. *Life Sci* 39:1667-1674, 1986
56. Ross SE, Mardinly AR, McCord AE, Zurawski J, Cohen S, Jung C, Hu L, Mok SI, Shah A, Savner EM, Tolias C, Corfas R, Chen S, Inquimbert P, Xu Y, McInnes RR, Rice FL, Corfas G, Ma Q, Woolf CJ, Greenberg ME: Loss of inhibitory interneurons in the dorsal spinal cord and elevated itch in *Bhlhb5* mutant mice. *Neuron* 65:886-898, 2010
57. Rudomin P, Schmidt RF: Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Exp Brain Res* 129:1-37, 1999
58. Samii M, Jannetta PJ. The cranial nerves: anatomy, pathology, pathophysiology, diagnosis, treatment. Springer-Verlag, Berlin, 1981.
59. Sandkühler J: Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev* 89:707–758, 2009
60. Scholz J, Woolf CJ: The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci* 10:1361-1368, 2007
61. Schouenborg J: Functional and topographical properties of field potentials evoked in rat dorsal horn by cutaneous C-fibre stimulation. *J Physiol* 356:169-192, 1984
62. Schuler V, Lüscher C, Blanchet C, Klix N, Sansig G, Klebs K, Schmutz M, Heid J, Gentry C, Urban L, Fox A, Spooren W, Jatou AL, Vigouret J, Pozza M, Kelly PH, Mosbacher J, Froestl W, Käslin E, Korn R, Bischoff S, Kaupmann K, van der Putten H, Bettler B: Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B1). *Neuron* 31:47-58, 2001



63. Seagrove LC, Suzuki R, Dickenson AH: Electrophysiological characterizations of rat lamina I dorsal horn neurones and the involvement of excitatory amino acid receptors. *Pain* 108:76-87, 2004
64. Sherman SE, Loomis CW: Strychnine-sensitive modulation is selective for non-noxious somatosensory input in the spinal cord of the rat. *Pain* 66:321-330, 1996
65. Shreckengost J, Calvo J, Quevedo J, Hochman S: Bicuculline-sensitive primary afferent depolarization remains after greatly restricting synaptic transmission in the mammalian spinal cord. *J Neurosci* 30:5283–5288, 2010
66. Silva JR, Silva ML, Prado WA: Analgesia induced by 2- or 100-Hz electroacupuncture in the rat tail-flick test depends on the activation of different descending pain inhibitory mechanisms. *J Pain* 12:51-60, 2011
67. Sivilotti L, Woolf CJ: The contribution of GABA<sub>A</sub> and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. *J Neurophysiol* 72:169-179, 1994
68. Sjölund BH: Peripheral nerve stimulation suppression of C-fiber-evoked flexion reflex in rats. Part 1: Parameters of continuous stimulation. *J Neurosurg* 63:612-616, 1985
69. Sjölund BH: Peripheral nerve stimulation suppression of C-fiber-evoked flexion reflex in rats. Part 2: Parameters of low-rate train stimulation of skin and muscle afferent nerves. *J Neurosurg* 68:279-283, 1988
70. Sokal DM, Chapman V: Spinal GABA(B)-receptor antagonism increases nociceptive transmission in vivo. *Neuroreport* 12:3247-3250, 2001
71. Sokal DM, Chapman V: Inhibitory effects of spinal baclofen on spinal dorsal horn neurones in inflamed and neuropathic rats in vivo. *Brain Res* 987(1):67-75, 2003
72. Sorkin LS, Puig S: Neuronal model of tactile allodynia produced by spinal strychnine: effects of excitatory amino acid receptor antagonists and a mu-opiate receptor agonist. *Pain* 68:283-292, 1996

73. Sorkin LS, Puig S, Jones DL: Spinal bicuculline produces hypersensitivity of dorsal horn neurons: effects of excitatory amino acid antagonists. *Pain* 77:181-190, 1998
74. Takazawa T, MacDermott AB: Glycinergic and GABAergic tonic inhibition fine tune inhibitory control in regionally distinct subpopulations of dorsal horn neurons. *J Physiol* 588(Pt 14):2571-2587, 2010
75. Tanabe M, Murakami H, Honda M, Ono H: Gabapentin depresses C-fiber-evoked field potentials in rat spinal dorsal horn only after induction of long-term potentiation. *Exp Neurol* 202:280-286, 2006
76. Todd AJ: Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci* 11:823-836, 2010
77. Torsney C: Inflammatory pain unmasks heterosynaptic facilitation in lamina I neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord. *J Neurosci* 31:5158-5168, 2011
78. Torsney C, MacDermott AB: Disinhibition opens the gate to pathological pain signaling in superficial neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord. *J Neurosci* 26:1833-1843, 2006
79. von Heijne M, Hao JX, Sollevi A, Xu XJ: Effects of intrathecal morphine, baclofen, clonidine and R-PIA on the acute allodynia-like behaviours after spinal cord ischaemia in rats. *Eur J Pain* 5: 1–10, 2001
80. Wang MY, Dun NJ: Phaclofen-insensitive presynaptic inhibitory action of ( $\pm$ )-baclofen in neonatal rat motoneurons in vitro. *Br J Pharmacol* 99: 413-421, 1990
81. Windle WF: The distribution and probable significance of unmyelinated nerve fibers in the trigeminal nerve of the cat. *J Comp Neurol* 41:453-477, 1926

82. Witschi R, Punnakkal P, Paul J, Walczak JS, Cervero F, Fritschy JM, Kuner R, Keist R, Rudolph U, Zeilhofer HU: Presynaptic alpha2-GABAA receptors in primary afferent depolarization and spinal pain control. *J Neurosci* 31:8134-8142, 2011
83. Woolf CJ, Barrett GD, Mitchell D, Myers RA/ Naloxonereversible peripheral electroanalgesia in intact and spinal rats. *Eur J Pharmacol* 45:311-314,1977
84. Woolf CJ, Mitchell D, Barrett GD: Antinociceptive effect of peripheral segmental electrical stimulation in the rat. *Pain* 8:237-252, 1980
85. Yaksh TL: Behavioral and autonomic correlates of the tactile evoked allodynia produced by spinal glycine inhibition: effects of modulatory receptor systems and excitatory amino acid antagonists. *Pain* 37:111-123, 1989
86. Yang K, Kumamoto E, Furue H, Li YQ, Yoshimura M: Action of capsaicin on dorsal root-evoked synaptic transmission to substantia gelatinosa neurons in adult rat spinal cord slices. *Brain Res* 830:268-73, 1999
87. Yoshimura M, Nishi S: Primary afferent-evoked glycine- and GABA-mediated IPSPs in substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord in vitro. *J Physiol* 482:29-38, 1995
88. Yoshimura M, Jessell T: Amino acid-mediated EPSPs at primary afferent synapses with substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord. *J Physiol* 430:315-335, 1990
89. Young RF, King RB: Fiber spectrum of trigeminal sensory root of baboon determined by electron-microscopy. *J Neurosurg* 38:65-72, 1973

## Legends to figures

**Figure 1. Field potentials evoked in the superficial MDH by electrical stimulation of the skin.** (A) Light micrograph of the MDH (frontal plane). Lamina II appears as a clear band. The electrolytic lesion corresponding to the recording site (arrow) is located in superficial MDH, right in the projection area of V2 primary afferents. Scale bar: 1 mm. (B) Left: Superimposed field potentials recorded in superficial MDH following electrical stimulation of the upper lip at increasing strength (from 0.05 to 30 mA; 1 ms duration). Each trace is the average of 10 successive responses (0.03 Hz). Middle: At expanded time scale to clearly show the earliest, A $\beta$ -fiber field potential. On increasing stimulation strength, the amplitudes of the two earliest, A $\beta$ - and A $\delta$ -fiber field potentials progressively increase and a third, C-fiber field potential appears superimposed on the repolarizing phase of the second one. Right: Superimposed C-fiber field potentials evoked by 5 (thin trace) and 30 mA (thick trace) stimulations. Note that the initial slope of the thick trace is steeper than that of the thin one. (C) Normalized – to each maximum – amplitudes of A $\beta$ - (empty diamonds) and A $\delta$ -fiber field potentials (empty squares) and area of the C-fiber field potential (solid diamonds) are plotted against stimulation strength (same experiment as A). Note that the amplitude/area of each field potential plateaus (left) and that the threshold for the C-fiber field potential is higher than those for A-fiber ones (right). (D) C-fiber evoked action potentials and field potentials are highly correlated (same experiment as A). The number of action potentials recorded between 30 and 300 ms post-stimulus is plotted against the area of the C-fiber-evoked field potential (left). Regression line (stipple line):  $y = 0.5875 x - 3.1585$  ( $R^2 = 0.8656$ ). Simultaneously recorded action potentials (upper right) and field potentials (lower right) to 5 and 30 mA stimulations.

**Figure 2. Morphine selectively depresses C-fiber field potentials in superficial MDH.** (A) Effect of i.v. injection of morphine ( $3 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) and naloxone ( $0.4 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) on the amplitudes of  $A\beta$ - (empty diamonds) and  $A\delta$ -fiber field potentials (empty squares) and area of C-fiber field potentials (solid triangles) in a typical experiment. The traces are superimposed field potentials (right: at expended time scale to clearly show  $A\beta$ -fiber field potentials; each trace is the average of 5 successive recordings, 0.03 Hz) recorded immediately before (solid thin trace), 10 min after i.v. morphine (solid thick trace) and 10 min after i.v. naloxone (stippled thick trace). Systemic morphine leads to a fast and complete suppression of the C-fiber field potential that reverses upon systemic naloxone,  $A\beta$ - and  $A\delta$ -fiber field potentials remaining unaffected. (B) Group data of the effect of i.v. morphine ( $3 \text{ mg.kg}^{-1}$ ; black bars;  $n=6$ ) and its reversal by i.v. naloxone ( $0.4 \text{ mg.kg}^{-1}$ ; light grey bars;  $n=4$ ) on  $A\beta$ -,  $A\delta$ - and C-fiber field potentials. Amplitudes/areas, measured 1 min before (dark grey), 10 min after i.v. morphine (black bars) and 10 min after i.v. naloxone (light grey) are normalized to the average amplitude/area during the 10 min before morphine. \*\* indicates statistical significance:  $p<0.01$ .

**Figure 3. Strychnine and bicuculline concomitantly potentiate A-fiber field potentials and inhibit, if not abolish, C-fiber field potentials in superficial MDH.** (A) Effect of i.c. strychnine (20 nmol) on the amplitudes of  $A\beta$ - peak (empty diamonds) and late component (empty triangles) – and  $A\delta$ -fiber field potentials (empty squares) and area of C-fiber field potentials (solid diamonds) in a typical experiment. The traces are superimposed field potentials (b, at expended time scale to clearly show  $A\beta$ - and  $A\delta$ -fiber field potentials; c, at expended time and amplitude scales to clearly show C-fiber field potentials; each trace is the average of 5 successive recordings, 0.03 Hz) recorded immediately before (solid thin trace) and 10-12 min (solid thick trace) and 55-57 min after i.c. strychnine (stippled thick trace). Application of strychnine leads to reversible concomitant potentiation of  $A\beta$ - and  $A\delta$ -fiber field potentials and depression of the C-fiber one. (B) The traces are superimposed field

potentials (average of 5 successive recordings, 0.03 Hz) recorded immediately before (solid thin trace) and 10-12 min (solid thick trace) after i.c. bicuculline (10 nmol). Application of bicuculline leads to concomitantly a potentiation of A $\beta$ - and A $\delta$ -fiber field potentials and, here, a complete suppression of the C-fiber field potential. (C) Cumulative histograms showing the effect of i.c. applied strychnine (20 nmol; n=9; solid lines) and bicuculline (10 nmol; n=7; dotted lines) on A $\delta$ - (thin lines) and C-fiber field potentials (thick lines) in every experiment.

**Figure 4. Phaclofen prevents strychnine-induced depression C-fiber field potentials in superficial MDH.** (A) Effect of i.c. co-application of phaclofen (100 nmol) and strychnine (20 nmol) on the amplitudes of A $\beta$ - peak (empty diamonds) and late component (empty triangles) – and A $\delta$ -fiber field potentials (empty squares) and area of C-fiber field potentials (solid diamonds) in a typical experiment. Traces are superimposed field potentials (b, at expended time scale to clearly show A $\beta$ - and A $\delta$ -fiber field potentials; c, at expended time and amplitude scales to clearly show C-fiber field potentials; each trace is the average of 5 successive recordings, 0.03 Hz) recorded immediately before (thin trace), 20 min (thick trace) after i.c. phaclofen + strychnine. Co-applied phaclofen and strychnine produce a strong potentiation of both A- and C-fiber field potentials. (B) Cumulative histograms showing the effect of i.c. applied strychnine (20 nmol; n = 9; dotted lines; the same as in Fig. 3) and phaclofen (100 nmol) + strychnine (20 nmol) (n = 11; solid lines) on A $\delta$ - (thin lines) and C-fiber-evoked field potentials (thick lines) in every experiment.

**Figure 5. Under control conditions, phaclofen selectively potentiates C-fiber field potential in superficial MDH.** Summary graph (mean  $\pm$  s.e.m.; n = 7) of the effect of i.c. applied phaclofen (100 nmol) on the amplitudes of A $\beta$ - (empty diamonds) and A $\delta$ -fiber field potentials (empty squares) and area of C-fiber field potentials (solid diamonds). Traces are superimposed field potentials (b, at expended time scale to clearly show A $\beta$ - and A $\delta$ -fiber field potentials; c: at expended time and amplitude scales to clearly show C-fiber field

potentials; each trace is the average of 5 successive recordings, 0.03 Hz) recorded immediately before (thin trace) and 5 min after phaclofen (thick trace) in a typical experiment.

**Figure 6. Baclofen preferentially inhibits C-fiber field potential in superficial MDH. (A)** Summary graph (mean  $\pm$  s.e.m.; n = 5) of the effect of i.c. applied baclofen (0.07 nmol) on the amplitudes of A $\beta$ - (empty diamonds) and A $\delta$ -fiber field potentials (empty squares) and area of C-fiber field potentials (solid diamonds). Traces are superimposed field potentials (each trace is the average of 5 successive recordings, 0.03 Hz) recorded immediately before (thin trace) and 2 min after baclofen (thick trace) in a typical experiment. Application of baclofen leads to a complete suppression of the C-fiber field potential (arrow head). (B) Summary of the effect (mean  $\pm$  s.e.m. of normalized inhibition) of the two lowest doses of baclofen (0.007 and 0.07 nmol) on the amplitudes of A $\beta$ - (empty diamonds) and A $\delta$ -fiber field potentials (empty squares) and area of C-fiber field potentials (solid diamonds). Numbers above are for the number of experiments. \* and \*\* indicate statistical significance: p < 0.05 and p < 0.01 between the effect on A- and C-fiber field potentials. (C) Traces are superimposed field potentials (each trace is the average of 5 successive recordings, 0.03 Hz) recorded immediately before (thin trace) and 2 min after 0.7 nmol i.c. baclofen (thick trace) in a typical experiment.

Figure 1

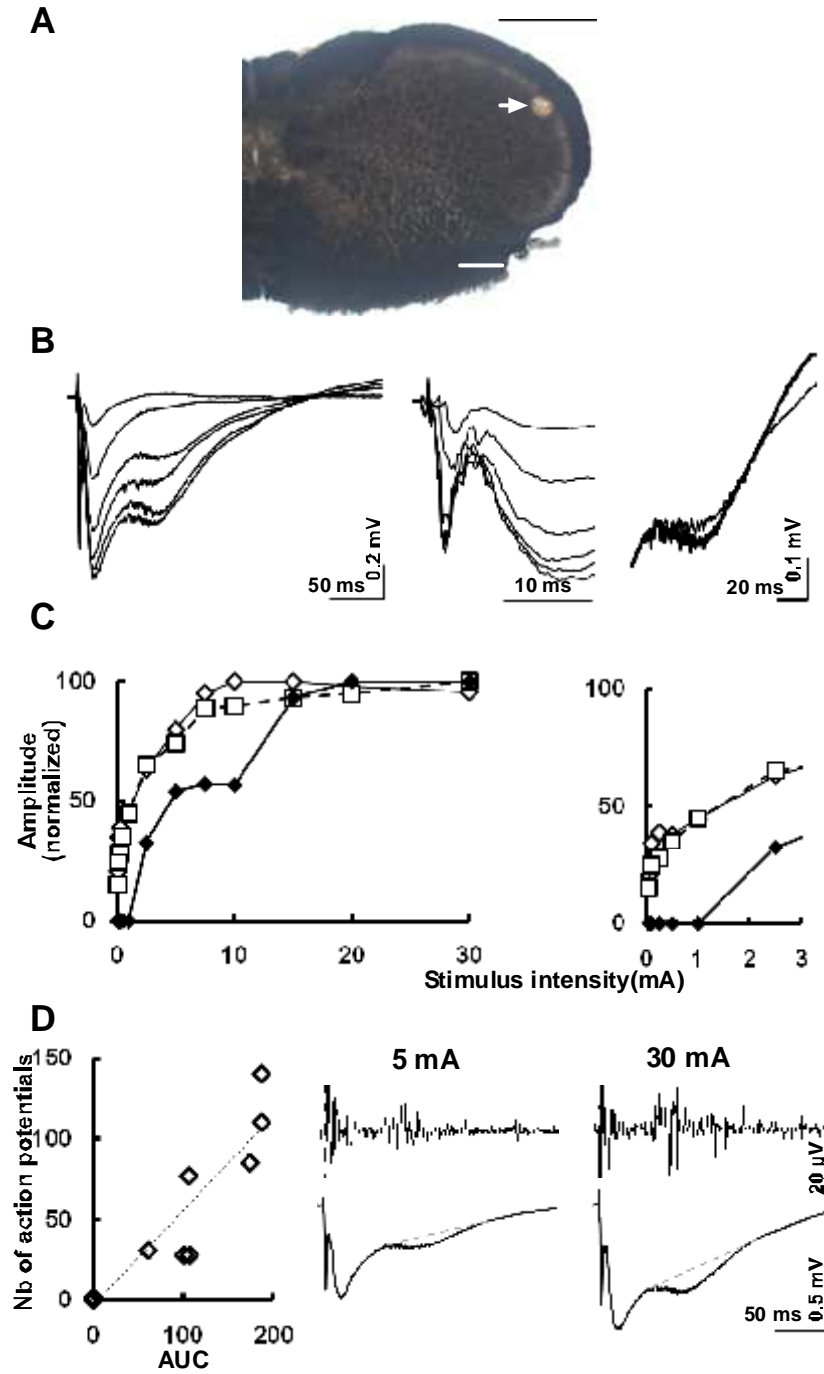




Figure 2

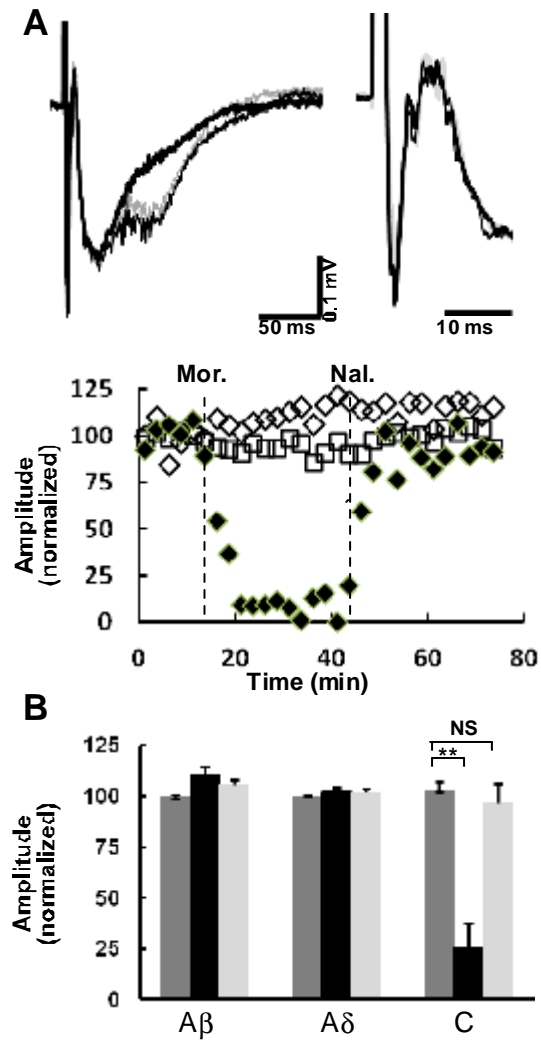


Figure 3

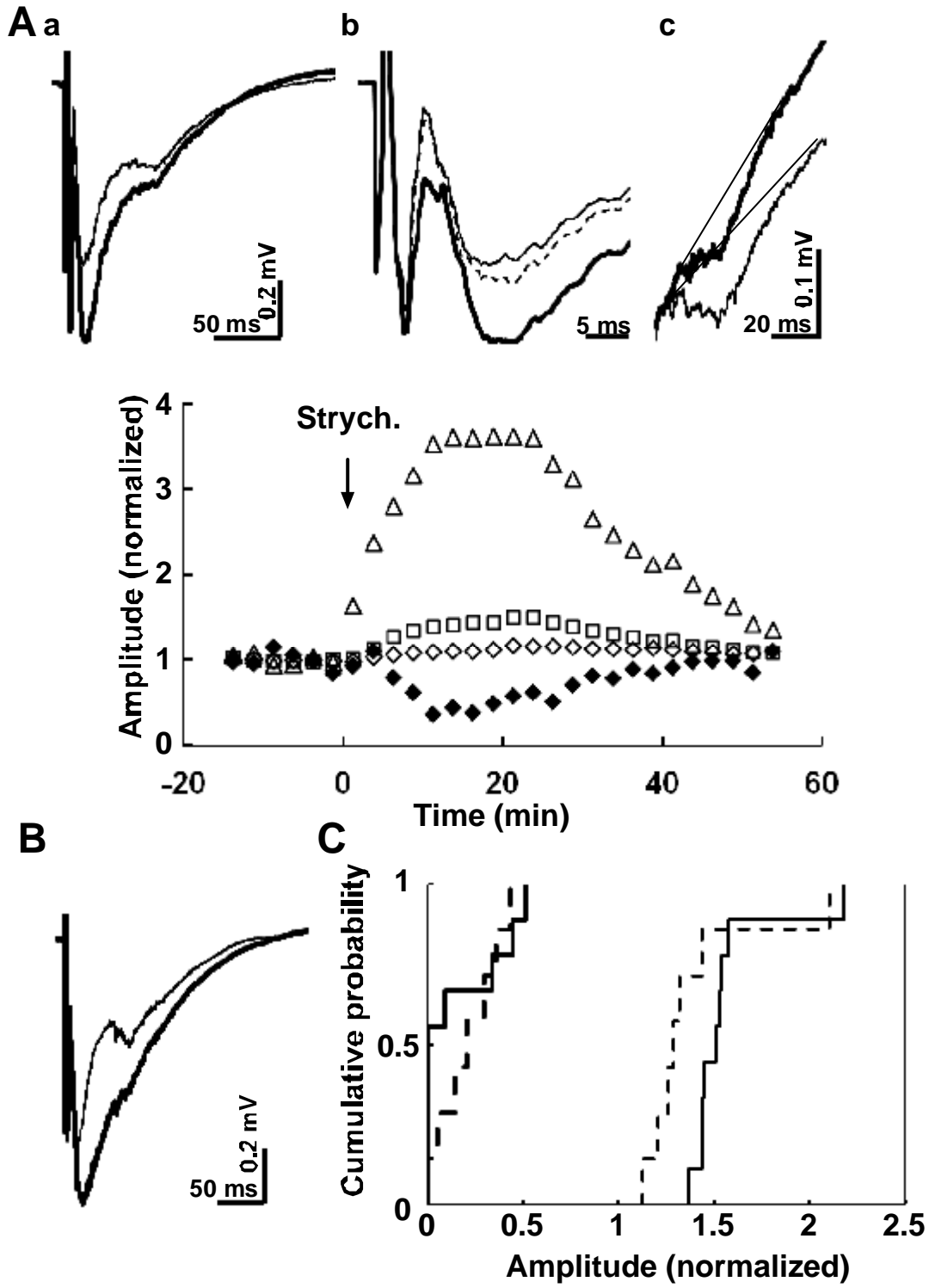


Figure 4

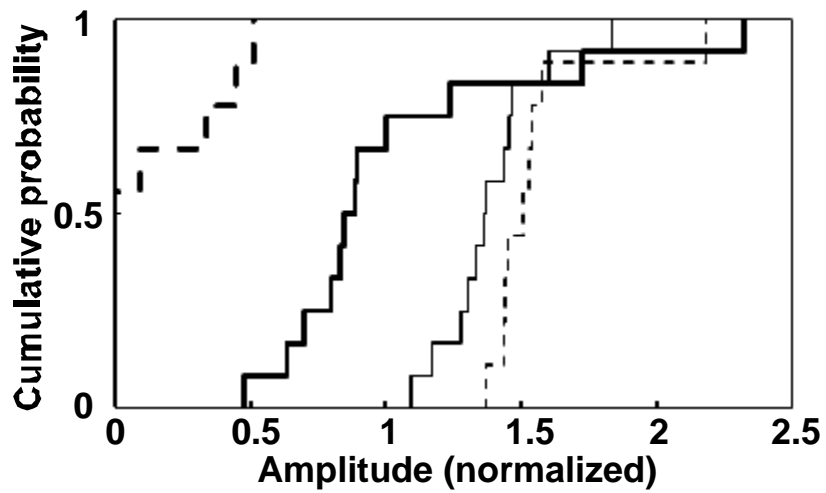
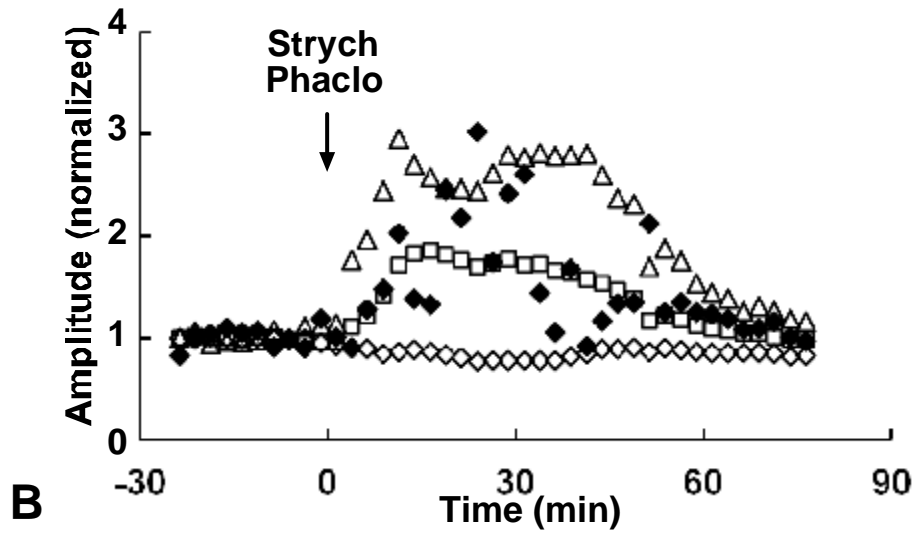
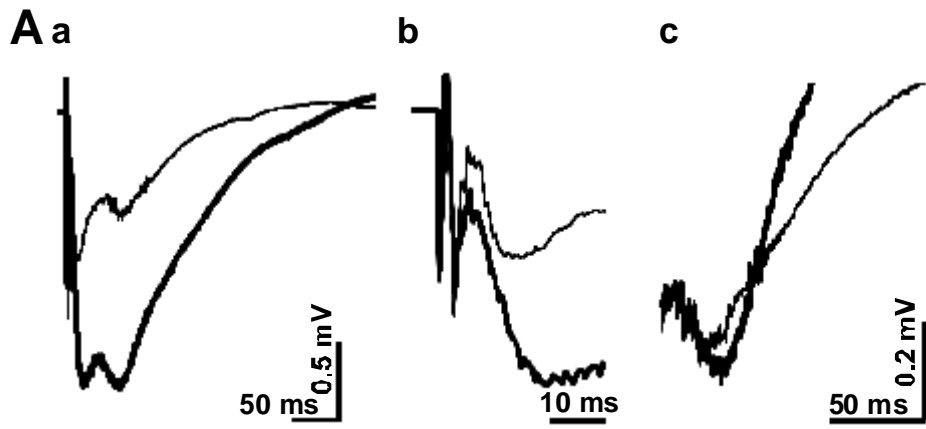


Figure 5

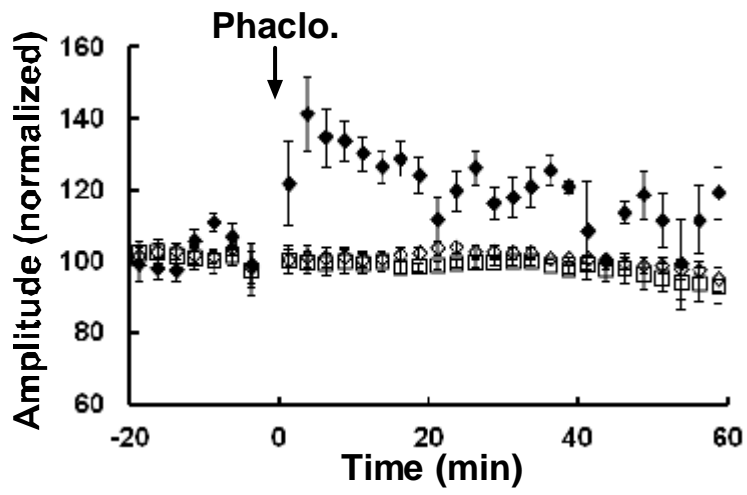
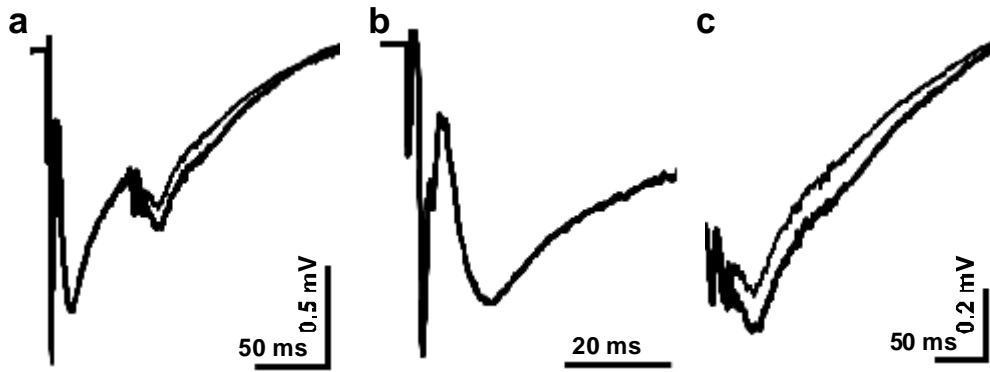
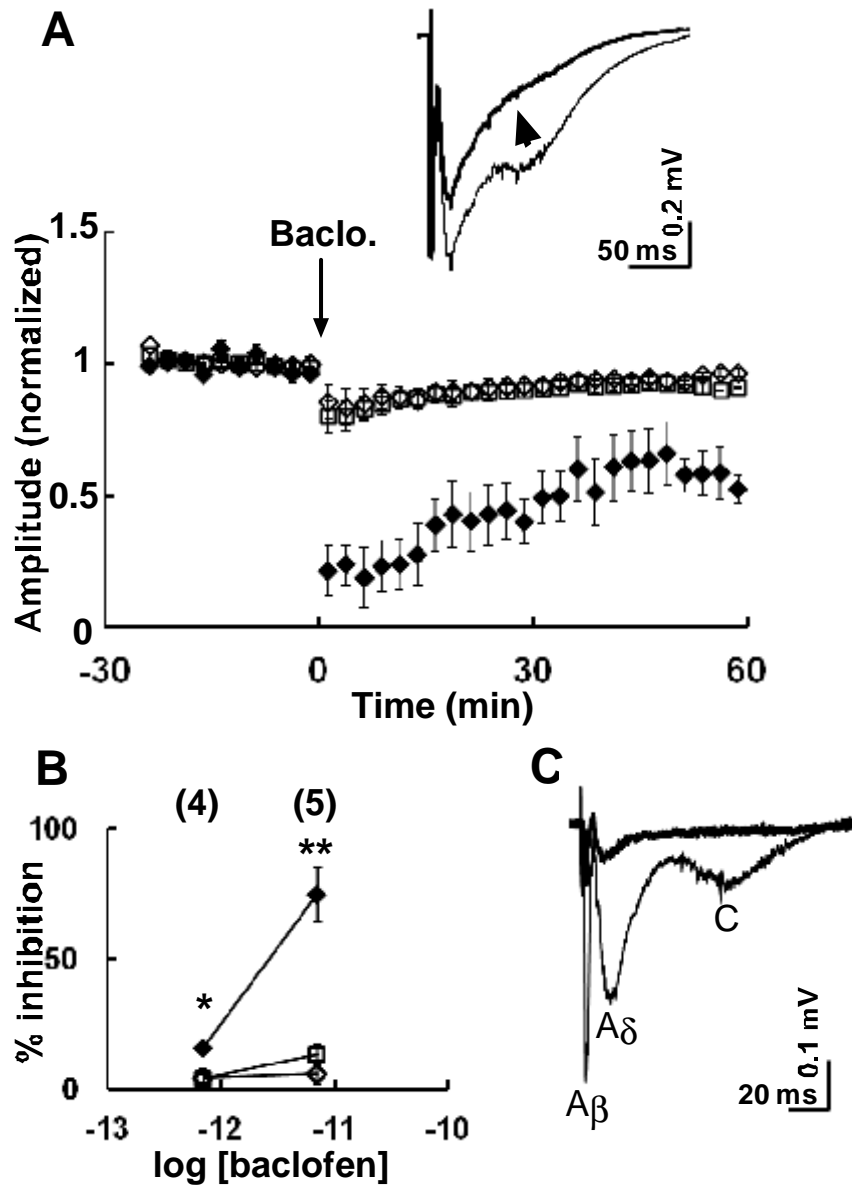


Figure 6



## **C. ARTICLE 2**

**PROPERTIES OF FIELD POTENTIALS EVOKED IN THE RAT MEDULLARY  
DORSAL HORN BY ELECTRICAL STIMULATION OF THE MENINGES**

**Céline Melin<sup>a,b,c</sup>, Nicolas Vitello<sup>a,b,d</sup>, Floriant Jacquot<sup>a,b</sup>, Radhouane Dallel<sup>a,b,c</sup>,  
Alain Artola<sup>a,b</sup>**

*<sup>a</sup>Clermont Université, Université d'Auvergne, Neurobiologie de la Douleur Trigéminal, BP  
10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France*

*<sup>b</sup>Inserm, U929, F-63000 Clermont-Ferrand, France*

*<sup>c</sup>CHU Clermont-Ferrand, Service d'Odontologie, F-63003 Clermont-Ferrand, France*

*<sup>d</sup>CHU Clermont-Ferrand, Service de Neurologie, F-63003 Clermont-Ferrand, France*

Number of text pages of the entire manuscript (including figures): **29**

Number of figures: **4**

Author to whom correspondence should be sent:

Pr. Alain ARTOLA.

Inserm U 929 – Neurobiologie de la Douleur Trigéminal

Faculté de Chirurgie Dentaire, Université d'Auvergne CLERMONT-FD1

11, boulevard Charles de Gaulle

F-63000 CLERMONT-FERRAND

FRANCE

Tel. + (33) 4 73 17 73 17

Fax + (33) 4 73 17 73 06

Mail : [alain.artola@u-clermont1.fr](mailto:alain.artola@u-clermont1.fr)

Keywords : Migraine; meninges; trigeminal nerve; Glycine receptors ; GABA<sub>A</sub> receptors ;  
trigeminal nerve;

## Abstract

Pathological disruption of segmental inhibition is thought to contribute to persistent pain hypersensitivity – including hyperalgesia, allodynia and spontaneous pain – that occurs during chronic pain states. That allodynia is also often associated with migraine – an episodic headache – suggests that a loss of synaptic inhibition is also involved in the manifestation of headache pain.

We have previously provided functional evidence that when synaptic inhibition within superficial medullary dorsal horn (MDH) is disrupted, trigeminal cutaneous A-fiber primary afferents activate polysynaptic excitatory pathways which, in turn, activate GABAergic neurons, inhibiting trigeminal cutaneous C-fiber inputs via GABA<sub>B</sub> receptors. Here, we sought to characterize how pharmacological blockade of glycine and GABA<sub>A</sub> receptors modifies synaptic transmission between meningeous primary afferent fibers and second order neurons by recording field potentials in the rat superficial MDH. Electrical stimulation of the dura evokes two negative field potentials elicited by, from the earliest to the latest, A $\delta$ - and C-fiber primary afferents. Systematic application of the opioid receptor agonist, morphine, suppresses specifically C-fiber-evoked field potentials and this is reversed by systematic naloxone. Blocking segmental glycine and/or GABA<sub>A</sub> receptors strongly potentiates C-fiber-evoked field potentials whereas A $\delta$ -fiber-evoked ones are not modified.

Thus disruption of segmental inhibition leads to the very opposite effects on cutaneous and meningeous C-fiber inputs, suggesting that the processing of cutaneous and meningeous inputs by MDH neuronal networks are different.



## 1. Introduction

Migraine — an episodic headache — affects more than 10% of the general population. Despite recent progress, mechanisms underlying migraine headache remain poorly understood. One of the important open questions includes the mechanisms of pain generation (for review see Pietrobon D, Striessnig J, 2003; Akerman et al., 2011).

It has been recognized that most patients experience cephalic and extracephalic cutaneous allodynia over the course of their migraine or primary headache episode (Burstein et al., 2000; Guy et al., 2010). Migraine-associated allodynia has attracted intense interest because it is recognized as a sign of central sensitization that occurs during chronic pain syndroms.

Loss of segmental synaptic inhibition is widely accepted as an important factor contributing to the generation and maintenance of chronic pain. Inhibitory mechanisms appear to be disrupted in a variety of chronic pain states, including those resulting from inflammation (Harvey et al., 2004), nerve injury (Moore et al., 2002; Coull et al., 2003; Scholz and Woolf, 2007), and spinal cord injury (Drew et al., 2004). Disinhibition can be due to reduced inhibitory transmitter synthesis and/or release (Castro-Lopes et al., 1993; Wiesenfeld-Hallin and Xu, 1996; Ibuki et al., 1997), loss of inhibitory interneurons (Moore et al., 2002; Scholz et al., 2005; but see Polgar et al., 2005), prostaglandine E<sub>2</sub>-mediated block of inhibitory glycinergic neurotransmission (Ahmadi et al., 2002) or shift in anion gradient (Coull et al., 2003, 2005; Keller et al., 2007). And intrathecal administration of GABA (in rats: Eaton et al., 1998) or benzodiazepines (in mice: Knabl et al., 2008) is highly effective against inflammatory and neuropathic pain. Conversely, allodynia can be experimentally induced by intrathecal administration of GABA<sub>A</sub> (bicuculline) or glycine (strychnine) receptor antagonists (Yaksh, 1989; Sivilotti and Woolf 1994; Miraucourt et al. 2007). Diminished segmental synaptic inhibition appears to be decisive for the generation allodynia.

That migraine patients often demonstrate cephalic cutaneous allodynia and that this cephalic allodynia is mostly mechanical (Guy et al., 2010) strongly suggests that synaptic inhibition is impaired during migraine attacks. It has been suggested that synaptic inhibitory input synchronized with incoming excitatory input plays a critical role influencing neuronal excitability when the neuron receives evoked excitatory input (Yoshimura & Nishi, 1995). Can features of meningeous primary afferent-evoked synaptic inhibitory inputs account for the high prevalence to migraine?

We have recorded extracellular field potentials within the superficial (lamina I-II) medullary dorsal horn (MDH) evoked by stimulating the dura *in vivo*. Under control conditions, field potentials reflect the population monosynaptic EPSPs of nearby neurons (Baldissera et al., 1981; Schouenborg, 1984; Shreckengost et al., 2010). Using this approach, we assessed the effect of segmental glycinergic and/or GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition on meningeous primary afferent-second order neuron synapses.

## **2. Material and methods**

Adult male Sprague Dawley rats (200–300 g; Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) were housed in a temperature-controlled room (22 °C; lights on at 07:00–21:00 h) with food and water *ad libitum*. All procedures followed the guidelines under the International Association for the Study of Pain and the European Community Council (86/609/EEC) and were approved by the local animal care and use committee (UFR d'Odontologie, Université d'Auvergne-Clermont 1). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

### *2.1. Animal preparation*

Animals were prepared as previously described (Dallel et al., 1998; Coste et al., 2008). Briefly, animals were anesthetized with 2% halothane (66% NO<sub>2</sub>/33% O<sub>2</sub>). After

intramuscular injection of 100 µg atropine sulfate, the trachea was cannulated and the carotid artery and external jugular vein catheterized. Animals were then paralyzed by an intravenous perfusion of vecuronium bromide (2.4 mg/h) and artificially ventilated with a volume-controlled pump (54–55 strokes/min). Levels of halothane, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, and end-tidal CO<sub>2</sub> (3.5–4.5%) were measured by an anesthetic gas analyser (Vamos, Dräger, Lübeck, Germany) during the entire experimental period. These parameters were digitally displayed and under the control of alarms. The arterial catheter was attached to a calibrated pressure transducer (UFI, Morro Bay, CA, USA) connected to an amplifier (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) for continuous monitoring of the mean arterial blood pressure (90–110 mm Hg). The analog output from the blood pressure amplifier was connected to a computer data sampling system (Cambridge Electronics Design 1401 computer interface; Cambridge, UK). Heart rate was continuously monitored and cutaneous vascularization periodically checked by observing the color of the paw extremities and the rapidity with which they regained normal color after pressure application. Colorectal temperature was kept constant at 38 ± 0.5 °C by means of a feedback-controlled heating blanket. Surgical level of anesthesia was verified by a stable mean arterial blood pressure and a constant heart rate during noxious stimulation.

The animals were placed in a stereotaxic frame with the head fixed in a ventroflexed position (incisor bar dropped 5 mm under the standard position) by means of an adapted metallic bar. To expose the MDH, the overlying musculature, atlanto-occipital membrane and dura mater were removed. Large portions of the parietal bones were removed on one side to expose the dura overlying the medial ipsilateral transverse sinus and allow the introduction of the bipolar stimulating electrode. The dura overlying the dorsal surface of the brain was covered with warm saline. After surgery, halothane was reduced to 0.6–0.7% and maintained at this level during recordings. All exposed nervous tissues were maintained wet with warm ACSF (pH 7.4) containing (in mM): 125 NaCl, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgSO<sub>4</sub>, and 25 glucose).

## 2.2. *Microinjections*

Drugs were delivered in the MDH by 3-barrel glass micropipettes fixed on the micromanipulator and connected to Hamilton syringes (1  $\mu$ l) by means of polyethylene tubing (Dallel et al., 1998). Micropipettes and tubing were filled with either strychnine, bicuculline or 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) solutions (see below). Injections of drugs were performed with a manual injector over a period of 2 min and monitored by observing the movement of an air bubble in the tubing. The slow rate of injection was chosen to minimize tissue damage. The micropipette was positioned stereotaxically within the MDH 1 h before the injection. The micropipette tip was first lowered 1 mm below the pial surface. The medulla was then covered by placing 2% Ringer-agar gel. The coordinates used for microinjection sites were 5.3 mm posterior to interaural plane (approximately obex) and 1.0–2.8 mm lateral to midline (Paxinos & Watson, 1997).

## 2.3. *Drug preparation and delivery*

In this study, receptor agonists and antagonists were applied either locally, directly into MDH which had been previously exposed (see above) or intravenously (i.v.). Drugs used for intracerebral application included strychnine, bicuculline and CNQX, all purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA). Stock solutions were obtained by dissolving drug powder in distilled water (strychnine, bicuculline) or DMSO (CNQX, phaclofen). A fixed 0.25  $\mu$ l volume was used for i.c. administration. Stock solutions were diluted in ACSF (see above) immediately before delivery at final concentrations (strychnine: 4 mM; bicuculline: 1 mM; CNQX: 1 mM).

Both morphine (3 mg.kg<sup>-1</sup>; morphine chlorhydrate, CMD Lavoisier, Paris, France) and naloxone (0.4 mg.kg<sup>-1</sup>; naloxone chlorhydrate, Narcan®, Bristol-Myers-Squibb, Italia) were i.v. applied (Dallel et al., 1996).

## 2.2. *Stimulation and electrophysiological recordings*

Field potentials were evoked by electrical stimulation (1 ms, 0.03 Hz) of the dura, using a bipolar stimulating electrode placed on it, and recorded using a tungsten microelectrode (0.5 M $\Omega$ , World Precision Instruments, Sarasota, Florida). Recording sites within MDH were adjusted to yield maximal C-fiber field potentials. Data were captured using two bandwidths to concomitantly record field potentials (300–10<sup>4</sup> Hz) and action potentials (1–10<sup>4</sup> Hz) of nearby neurons at the same site. Data were analyzed by a CED 1401 interface coupled to a Pentium computer with Spike 2 software (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK).

When stimulus intensity was appropriate to recruit both A- and C-fibers (5–20 mA), test stimuli evoked two negative field potentials. Since, under physiological conditions, extracellular field potentials evoked by afferent stimulation predominantly reflect the population monosynaptic EPSPs of nearby neurons (Baldissera et al., 1981; Schouenborg, 1984; Shreckengost et al., 2010), the conduction velocities of the primary afferent fibers initiating these field potentials could thus be easily computed on the basis of measurements of (a) the distance between the stimulation site on the dura and the trigeminal ganglion (12.5 mm) and between the trigeminal ganglion and the central recording site (15–17 mm) (see Burstein et al., 1998) and (b) latencies (including the 1 ms synaptic delay). These calculations assume a straight line between the trigeminal ganglion and MDH; without a loop through the trigeminal subnuclei oralis and interpolaris. The relative contribution of MDH population postsynaptic potentials or the afferent volley to the field potential with the shortest latency was tested by examining the effects of intracerebral application of the antagonist of AMPA/kainate glutamate receptors, CNQX (1 mM; n=2) on field potentials. CNQX resulted in a dramatic decrease in the amplitude of the two negative field potentials, including the earliest one. This indicates that such early potential is largely elicited by a population monosynaptic EPSPs of nearby neurons rather than by the afferent volley.

### 2.3. *Data analysis and statistics*

A $\delta$ -fiber field potentials were measured at peak. C-fiber field potentials were assessed as

the area between the recorded wave-form signal and a straight line tangential to it, before and after the field potential (see Fig. 1D). Data were normalized to the averaged value obtained during the 10 min period before drug application. Student *t*-test, paired *t*-test and Mann-Whitney rank sum test were used for statistical analysis and  $p < 0.05$  was considered significant. Means are given as means  $\pm$  s.e.m..

### 3. Results

#### 3.1. Properties of field potentials evoked in superficial MDH by meningeous stimulation

Electrical stimulation of the meninges evoked two successive negative field potentials in superficial MDH: an early, short (latency to peak:  $7.2 \pm 0.3$  ms and duration:  $\sim 5-7$  ms,  $n=10$ ) and late, long (latency to peak:  $36.4 \pm 1.5$  ms and duration:  $\sim 30-50$  ms,  $n=10$ ) (referred to as peak 1 and peak 3, respectively, in Fig. 1A-C). This late field potential was typically superimposed on a long positive field potential (duration 300-500 ms) that increased with stimulus intensity (see examples in Fig. 1 and 2) (referred to as peak 2 and peak 4, respectively in Fig. 1A-C). The effect of increasing stimulation intensity on the magnitude of the two negative potentials (peaks 1 and 3) was examined in ten rats. In Fig. 1 (D-E) is shown an example of such input-output curve. The magnitude of the two negative field potentials increased and then plateaued with stimulation intensity (Fig. 1D) and the threshold for eliciting the second negative field negative was higher than that of the first one (Fig. 1E). This same was observed in all our recordings.

The computed conduction velocities of primary afferent fibers eliciting the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> negative field potential ( $4.5$  and  $1.0$  m.s<sup>-1</sup>, respectively; see Material and methods) corresponded to those expected for A $\delta$ - and C-fiber primary afferents. Therefore, our results suggest that the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> field potentials reflect the monosynaptic excitatory response of nearby neurons in superficial MDH to activation of A $\delta$ - and C-fiber primary afferents,

respectively. These potentials will thus be referred to as A $\delta$ - and C-fiber field potentials in the remainder of the paper.

### *3.2. C-fiber field potential is selectively abolished by systemic morphine*

The relatively high current for evoking the 2<sup>nd</sup> field potential and its long latency already strongly suggests that this potential is evoked by C-fiber activation. To confirm this hypothesis, we tested the effect of systemic application of the  $\mu$  opioid receptor agonist, morphine, on field potentials in superficial MDH.

Systemic morphine has previously been shown to specifically reduce the responses of neurons to the activation of cutaneous C-fibers both in spinal DH (Le Bars et al., 1976; Tanabe et al., 2006; Buesa et al., 2008) and MDH (Dallel et al., 1996). I.v. morphine (3 mg.kg<sup>-1</sup>) quickly reduced, if not completely suppressed (see example in Fig. 2A), C-fiber field potentials (+5 min after injection:  $37.0 \pm 13.6\%$  of baseline;  $p < 0.01$ ;  $n = 5$ ; Fig. 2C). This effect was specific of C-fiber field potentials as A $\delta$ -fiber field potentials were not affected (+5 min after injection:  $106.4 \pm 6.1\%$  of baseline;  $n = 5$ ; Fig. 2C). Depression of C-fiber field potentials was quickly reversed by i.v. injection of the opioid receptor antagonist, naloxone (Fig. 2), thus confirming that it was actually due to the activation of opioid receptors.

### *3.3. C-fiber field potential is selectively potentiated after blocking segmental glycine and GABA<sub>A</sub> receptors*

The effect of blocking segmental glycinergic inhibition was tested in seven animals (Fig. 3, A-C). Following intracerebral strychnine (0.25  $\mu$ l; 4 mM), C-fiber field potential was potentiated in five animals. The potentiation was maximum at  $15 \pm 2$  min after microinjection ( $580.2 \pm 140.1\%$  of baseline;  $p < 0.02$ ) and reversed upon washout (Fig. 3, A-B). In only two animals was C-fiber field potential completely suppressed following intracerebral strychnine. Interestingly though, in one out of these two animals, C-fiber field potential was first strongly potentiated and only subsequently suppressed (Fig. 3C). It has to be noted that in the two

animals in which microinjected strychnine suppressed C-fiber field potentials, there was a strong potentiation of peak 2 (see example in Fig. 3C). These changes were selective of C-fiber field potentials as A $\delta$ -fiber field potentials were not changed (amplitude at peak:  $91,6 \pm 4,8\%$ ;  $n = 7$ ) (see examples in Fig. 3 A and C).

The effect of blocking segmental GABA<sub>A</sub>ergic inhibition was tested in five animals. There was a tendency of increase of the C-fiber field potential following bicuculline microinjection (0.25  $\mu$ l; 1 mM). When C-fiber field potential could be evoked before microinjection ( $n = 3$ ), it tended to potentiate ( $319.6 \pm 129.4\%$ ) (not shown). When only a A $\delta$ -fiber field potential was recorded before microinjection ( $n = 2$ ), a second potential appeared at the delay of the C-fiber field potential (not shown).

Actually, the C-fiber-evoked field potential was not the only part of the recorded field potential to change with glycinergic and GABA<sub>A</sub>ergic disinhibition. We noted that the positive peak 2 tended to have strongly increased when the C-fiber-evoked field potential was suppressed (see example in 3C). We therefore plotted the changes in the C-fiber-evoked field potential versus those of peak 2 (Fig. 4). They were highly negatively correlated with those of peak 2.

#### **4. Discussion**

We show that electrical stimulation of the dura evokes two negative field potentials with different latencies in superficial MDH. The conduction velocities of the primary afferent fibers eliciting these field potentials are within the A $\delta$ - and C-fiber ranges, respectively. Systematic application of the opioid receptor agonist, morphine, suppresses specifically C-fiber field potentials and this is reversed by systematic naloxone. Blocking segmental glycine and/or GABA<sub>A</sub> receptors strongly potentiates C-fiber field potentials, A $\delta$ -fiber field potentials being not modified.

##### *4.1. Two fields potentials: A $\delta$ - and C-fiber-evoked field potentials*



We have inferred from the computed conduction velocities that the two field potentials recorded in the MDH following stimulation of the meninges were A $\delta$ - and C-fiber-evoked. Such a conclusion is consistent with results obtained with single unit recordings. Two types of meningeous afferences, A $\delta$  et C, have also been identified according to the delay of the responses recorded either in the trigeminal ganglion (Strassman *et al.*, 1996), or the MDH (Burstein *et al.*, 1998; Schepelmann *et al.*, 1999; Levy & Strassman, 2002; Panteleev *et al.*, 2005). Responses of MFH neurons to an electrical stimulation of the meninges includes two components, corresponding to primary afferent fibers with conduction velocities in the A $\delta$  (Burstein *et al.*, 1998 :  $> 2.0 \text{ m.s}^{-1}$ ; Panteleev *et al.*, 2005 :  $1,5\text{--}3,5 \text{ m.s}^{-1}$ ) and C ranges (Burstein *et al.*, 1998 :  $0.5\text{--}2.0 \text{ m.s}^{-1}$ ; Panteleev *et al.*, 2005 :  $0,5\text{--}1 \text{ m.s}^{-1}$ ). It has to be, however, that there are indications for meningeous afferents with higher conduction velocities (Strassman *et al.*, 1996:  $11,6 \pm 4,1 \text{ m.s}^{-1}$ ; Levy & Strassman, 2002 :  $>5 \text{ m.s}^{-1}$ ), that is in the upper A $\delta$  and even A $\beta$  range.

That the second field potential, but not the first, is completely abolished following systemic morphine is also consistent with C-fiber primary afferents eliciting this potential. There is extensive evidence regarding cutaneous primary afferents that C-fiber-evoked responses are preferentially depressed by morphine. I.v. morphine selectively depresses the responses of trigeminal neurons (Dallel *et al.*, 1996) and field potentials in the lumbar dorsal horn (DH) (Tanabe *et al.*, 2006) to cutaneous C-fibers primary afferents. Activation of opiate receptors within superficial MDH can account for such selective suppression of C-fiber-evoked neuronal responses (Dallel *et al.*, 1998). The effect of locally applied morphine appears to be also considerably stronger at C- than at A $\delta$ -fiber synapses within the lumbar spinal cord (*in vivo*: Buesa *et al.*, 2008). Finally, the potency and efficacy of locally applied  $\mu$  opioid receptor agonists is higher at C- than at A $\delta$ -fiber synapses in the lumbar DH (*in vitro* slices: Khono *et al.*, 1999; Ikoma *et al.*, 2007; Heinke *et al.*, 2011). Activation of opioid receptors in supraspinal areas, particularly those from which descending controls arise,

including the periaqueductal gray (Yaksch et al., 1976), may also account for the selective suppression of C-fiber field potentials. The periaqueductal gray projects to the rostral ventral medulla which in turn sends outputs to DH, where they control spinal processing of noxious, but not innocuous, inputs (for review see Millan, 2002; Heinricher et al., 2009). Our results are thus consistent with the conclusion that the last potential is evoked by stimulation of C primary afferents from the meninges.

#### *4.2. Segmental influences on the C-fiber inputs from the meninges*

Our results indicate that both glycinergic and GABA<sub>A</sub>ergic disinhibitions lead to a potentiation of the field potential response to selectively C-fiber primary afferents from the meninges. This is exactly the opposite of what we obtained with cutaneous afferents (Melin et al., previous paper). There, disruption of segmental inhibition leads to an inhibition, or even a suppression, of C-fiber field potentials when all – A $\beta$ -, A $\delta$ - and C-fiber – primary afferents are concomitantly activated. We hypothesized that cutaneous A-fiber primary afferents activate polysynaptic excitatory pathways which, in turn, activate GABAergic neurons, inhibiting cutaneous C-fiber inputs via GABA<sub>B</sub> receptors, a kind of ‘gate control’ (Melzack and Wall, 1965). Therefore, why are meningeous C-fiber inputs potentiated following disruption of segmental inhibition?

Cutaneous (Melin et al., previous paper and unpublished results) and meningeous (present results) C-fiber primary afferents exhibit much the same electrophysiological and pharmacological properties. They are evoked by slow conducting and high threshold primary afferent fibers. And opioid and GABA<sub>B</sub> receptors are present on both terminals.

That there is no A $\beta$ -fiber primary afferent from the meninges raises the question as to whether A $\delta$ -fiber primary afferents alone are able to recruit polysynaptic excitatory pathways and last-order GABAergic interneurons. Indeed, it has been shown that repetitive stimulation of either peripheral nerves, at stimulus intensities sufficient to only excite large A $\beta$  myelinated afferent fibers (Handwerker et al., 1975; Cervero et al., 1976), or their collaterals

in the dorsal column (Handwerker et al., 1975) suppress noxious heat-evoked sustained discharges in DH neurons. And repetitive stimulation of peripheral nerves also inhibits C-fiber-evoked responses in DH neurons (Brown et al., 1973; Cervero et al., 1976). Similarly, long, repetitive transcutaneous electrical nerve stimulations (TENS), or TENS-like stimulations of adjacent nerves, that activate A fibers, increases tail-flick latency (Woolf et al., 1977; 1980) and reduces both C-fiber-evoked flexion reflex (Sjölund, 1985; 1988) and responses of DH neurons (Lee et al., 1985; Garrison and Foreman, 1994; 1997). But it has also been noted that increasing intensity, to strengths that activate A $\delta$ -fiber primary afferents, produces greater inhibition (Lee et al., 1985; Sjölund, 1988). And tonic activation of sciatic A $\delta$ -fiber primary afferents can reduce the saphenous C-fiber-evoked behavioural response (Jones et al., 2004).

In addition, we have some indication that GABA<sub>B</sub> receptors can be activated and that this might account for the few examples where C-fiber-evoked field potentials were suppressed. Indeed, microinjection of the GABA<sub>B</sub> receptor agonist, baclofen (0.25  $\mu$ l, 0.1 mM; n = 3; not shown) leads to the concomittant potentiation of peak 2 and suppression of the C-fiber-evoked field potential. Accordingly, changes in the C-fiber-evoked field potential and peak 2 are negatively correlated, suggesting that when GABA<sub>B</sub> receptor are recruited, they successfully inhibit synaptic transmission between meningeous C-fiber primary afferents and second order neurons as between cutaneous C-fiber primary afferents and second order neurons (Melin et al., previous paper).

#### 4.2. *Concluding remarks*

Disrupting segmental synaptic inhibition produces opposite changes on C-fiber field potentials evoked by stimulation of the skin and the meninges. There is no indication for the two type of C-fiber afferent fibers being different. Our results rather suggest that the processing of meningeous and cutaneous afferents within the MDH are different. This raises the question as to whether a barrage of afferent inputs from the meninges and the skin will

produce the same changes, i.e. central sensitization, within DH/MDH. It is interesting to note that inflammation of these two types of tissue is able to potentiate the neuronal responses. Inflammation of the meninges produces a lasting increase in the activity of wide dynamic range neurons in layer V of the MDH (Burstein et al., 1998 ; Levy et al., 2004 ; Burstein & Jakubowski, 2004 ; Jakubowski et al., 2007). Similarly, injection of formol or capsaicine in the hind paw induces a long-term potentiation of C-fiber-evoked field potentials in the DH (Ikeda et al., 2006).

## References

- Ahmadi L, Lippross S, Neuhuber W and Zeilhofer H (2001) PGE2 selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons, *nature neuroscience* 5: 34-40
- Akerman S, Holland PR, Goadsby PJ. (2011) Diencephalic and brainstem mechanisms in migraine. *Nat Rev Neurosci.* 12(10):570-84.
- Baldissera F, Hultborn H, Illert M. Integration in spinal neuronal systems. In: *Handbook of physiology, Section I: The nervous system*, pp 509–595. Baltimore: Williams & Wilkins, 1981.
- Brown, AG, Kirk RJ, Martin HF. Descending and segmental inhibition of transmission through the spinocervical tract. *J. Physiol* 1973;230, 689-705.
- Buesa I, Urrutia A, Bilbao J, Aguilera L, Zimmermann M, Azkue JJ. Non-linear morphine-induced depression of spinal excitation following long-term potentiation of C fibre-evoked spinal field potentials. *Eur J Pain* 2008;12:814-17.
- Burstein R (2000) Deconstructing migraine headache into peripheral and central sensitization, *Pain* 89: 107-110.
- Burstein R, Hiroyoshi Y, Amy M, Strassman M (1998) Chemical Stimulation of the Intracranial Dura Induces Enhanced Responses to Facial Stimulation in Brain Stem Trigeminal Neurons, *J Neurophysiol* 79: 964-982.
- Burstein R, Jakubowski M (2004) Analgesic triptan action in an animal model of intracranial pain: a race against the development of central sensitization. *Ann Neurol.* 55(1):27-36.
- Castro-Lopes JM, Tavares I, Coimbra A (1993) GABA decreases in the spinal cord dorsal horn after peripheral neurectomy, *Brain Research* 620: 287-291

Cervero F, Iggo A, Ogawa H. Nociceptor-driven dorsal horn neurones in the lumbar spinal cord of the cat. *Pain* 1976;2, 5-24.

Coste J, Voisin DL, Miraucourt LS, Dallel R, Luccarini P. Dorsal horn NK1-expressing neurons control windup of downstream trigeminal nociceptive neurons. *Pain*. 2008;137:340-51.

Coull JA, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sîk A, De Koninck P, De Koninck Y. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 2003;424:938-42.

Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y. (2005) BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*. 438: 1017-21.

Dallel R, Dualé C, Molat JL. Morphine administered in the substantia gelatinosa of the spinal trigeminal nucleus caudalis inhibits nociceptive activities in the spinal trigeminal nucleus oralis. *J Neurosci* 1998;18:3529-36.

Dallel R, Luccarini P, Molat JL, Woda A. Effects of systemic morphine on the activity of convergent neurons of spinal trigeminal nucleus oralis in the rat. *Eur J Pharmacol* 1996;314:19-25.

Drew GM, Siddall PJ, Duggan AW. Mechanical allodynia following contusion injury of the rat spinal cord is associated with loss of GABAergic inhibition in the dorsal horn. *Pain* 2004;109:379-388.

Garrison DW, Foreman RD. Decreased activity of spontaneous and noxiously evoked dorsal horn cells during transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS). *Pain* 1994;58:309-15.

Garrison DW, Foreman RD. Effects of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) on spontaneous and noxiously evoked dorsal horn cell activity in cats with transected spinal cords. *Neurosci Lett.* 1996;216:125-8

Guy N, Marques AR, Orliaguet T, Lanteri-Minet M, Dallel R, Clavelou P (2010) Are there differences between cephalic and extracephalic cutaneous allodynia in migraine patients ? *Cephalalgia* 30(7);881-6

Handwerker HO, Iggo A, Zimmerman M. Segmental and supraspinal actions on dorsal horn neurones responding to noxious and non-noxious skin stimuli. *Pain* 1975;1:147-65.

Harvey RJ, Depner UB, Wässle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K, Schütz B, Abo-Salem OM, Zimmer A, Poisbeau P, Welzl H, Wolfer DP, Betz H, Zeilhofer HU, Müller U. GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science.* 2004;304:884-7.

Headache Classification Committee: The International Classification of Headache Disorders, 2nd Edition. *Cephalalgia* 2004, 24:1–160

Heinke B, Gingl E, Sandkühler J. Multiple targets of  $\mu$ -opioid receptor-mediated presynaptic inhibition at primary afferent A $\delta$ - and C-fibers. *J Neurosci* 2011;31:1313-22.

Heinricher MM, Tavaresc I, Leithe JL, Lumbe BM. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain res rev* 2009; 60:214–25.

Ibuki T, Hama AT, Wang XT, Pappas GD, Sagen J. (1997) Loss of GABA-immunoreactivity in the spinal dorsal horn of rats with peripheral nerve injury and promotion of recovery by adrenal medullary grafts. *Neuroscience.*76: 845-58.

Ikeda H, Stark J, Fischer H, Wagner M, Drdla R, Jäger T, Sandkühler J (2006) Synaptic amplifier of inflammatory pain in the spinal dorsal horn. *Science* 312(5780):1659-62.

Ikoma M, Kohno T, Baba H. Differential presynaptic effects of opioid agonists on A $\delta$ - and C-afferent glutamatergic transmission to the spinal dorsal horn. *Anesthesiology* 2007;107:807–812.

Jakubowski M, Levy D, Kainz V, Zhang XC, Kosaras B, Burstein R. (2007) Sensitization of central trigeminovascular neurons: blockade by intravenous naproxen infusion. *Neuroscience* 148(2):573-83.

Johannes CB, Linet MS, Stewart WF, Celentano DD, Lipton RB, Szklo M (1995). Relationship of headache to phase of the menstrual cycle among young women: a daily diary study. *Neurology*. 45(6):1076-82.

Jones TL, Sweitzer SM, Peters MC, Wilson SP, Yeomans DC. GABA<sub>B</sub> receptors on central terminals of C-afferents mediate intersegmental A $\delta$ -afferent evoked hypoalgesia. *Eur J Pain* 2005;9:233–42

Keller AF, Beggs S, Salter MW, De Koninck Y. Transformation of the output of spinal lamina I neurons after nerve injury and microglia stimulation underlying neuropathic pain. *Mol Pain* 2007;27:3-27.

Knabl J, Witschi R, Hösl K, Reinold H, Zeilhofer UB, Ahmadi S, Brockhaus J, Sergejeva M, Hess A, Brune K, Fritschy JM, Rudolph U, Möhler H, Zeilhofer HU. Reversal of pathological pain through specific spinal GABA<sub>A</sub> receptor subtypes. *Nature* 2008;451:330-4.

Kohno T, Kumamoto E, Higashi H, Shimoji K, Yoshimura M. Actions of opioids on excitatory and inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord. *J Physiol* 1999;518:803– 813.



Le Bars D, Rivot JP, Guilbaud G, Menetrey D, Besson JM. The depressive effect of morphine on the C fibre response of dorsal horn neurones in the spinal rat pretreated or not by pCPA. *Brain Res* 1979;176:337-53

Lee KH, Chung JM, Willis WD. Inhibition of primate spinothalamic tract cells by TENS. *J Neurosurg* 1985;62:276-287

Levy D, Jakubowski M, Burstein R (2004) Disruption of communication between peripheral and central trigeminovascular neurons mediates the antimigraine action of 5HT<sub>1B/1D</sub> receptor agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(12):4274-9.

Levy D, Strassman AM (2002) Mechanical response properties of A and C primary afferent neurons innervating the rat intracranial dura, *J Neurophysiol*. 88: 3021-31.

Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science* 1965;150:971-79.

Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol*. 2002 Apr;66(6):355-474.

Miracourt LS, Dallel R, Voisin DL. Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through PKC $\gamma$  interneurons. *PLoS One*. 2007;2(11):e1116

Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci* 2002;22:6724-31

Pantelev S, Sokolov AY, Amelinn KV, Ignatov YD (2005) Responses of Neurons in the Spinal Nucleus of the Trigeminal Nerve to Electrical Stimulation of the Dura Mater of the Rat Brain, *Neuroscience and Behavioral Physiology* 35: 555-9.

Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 3rd ed. New York: Academic Press; 1997.

Pietrobon D, Striessnig J (2003) Neurobiology of migraine, *Nat Rev Neurosci.* 4: 386-98.

Polgár E, Hughes DI, Arham AZ, Todd AJ (2005) Loss of neurons from laminae I-III of the spinal dorsal horn is not required for development of tactile allodynia in the spared nerve injury model of neuropathic pain. *J Neurosci.* 25(28):6658-66.

Schepelmann K, Ebersberger A, Pawlak M, Oppmann M, Messlinger K (1999) Response properties of trigeminal brain stem neurons with input from dura mater encephali in the rat. *Neuroscience* 90: 543-554.

Scholz J, Woolf CJ. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci* 2007;10:1361-8.

Scholz J, Broom DC, Youn DH, Mills CD, Kohno T, Suter MR, Moore KA, Decosterd I, Coggeshall RE, Woolf CJ.(2005) Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. *J Neurosci.* 25: 7317-23.

Schouenborg J. Functional and topographical properties of field potentials evoked in rat dorsal horn by cutaneous C-fibre stimulation. *J Physiol.* 1984;356:169-92

Shreckengost J, Calvo J, Quevedo J, Hochman S. Bicuculline-sensitive primary afferent depolarization remains after greatly restricting synaptic transmission in the mammalian spinal cord. *J Neurosci* 2010;30:5283–8

Sivilotti L, Woolf CJ. The contribution of GABA<sub>A</sub> and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. *J Neurophysiol* 1994;72:169-179.

Sjölund BH. Peripheral nerve stimulation suppression of C-fiber-evoked flexion reflex in rats. Part 1: Parameters of continuous stimulation. *J Neurosurg* 1985;63:612-6.

Sjölund BH. Peripheral nerve stimulation suppression of C-fiber-evoked flexion reflex in rats. Part 2: Parameters of low-rate train stimulation of skin and muscle afferent nerves. *J Neurosurg.* 1988;68:279-83

Strassman AM, Raymond SA, Burstein R (1996) Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches, *Nature* 384: 560-4.

Tanabe M, Murakami H, Honda M, Ono H. Gabapentin depresses C-fiber-evoked field potentials in rat spinal dorsal horn only after induction of long-term potentiation. *Exp Neurol* 2006;202:280-6.

Wiesenfeld-Hallin Z, Aldskogius H, Grant G, Hao JX, Hökfelt T, Xu XJ (1997) Central inhibitory dysfunctions: mechanisms and clinical implications, *Behav Brain Sci.* 20: 420-5.

Woolf CJ, Barrett GD, Mitchell D, Myers RA. Naloxonereversible peripheral electroanalgesia in intact and spinal rats. *Eur J Pharmacol* 1977;45:311-314.

Woolf CJ, Mitchell D, Barrett GD. Antinociceptive effect of peripheral segmental electrical stimulation in the rat. *Pain* 1980;8:237-252.

Yaksh TL. Behavioral and autonomic correlates of the tactile evoked allodynia produced by spinal glycine inhibition: effects of modulatory receptor systems and excitatory amino acid antagonists. *Pain* 1989;37:111-23.

Yaksh TL, Yeung JC, Rudy TA. Systematic examination in the rat of brain sites sensitive to the direct application of morphine: observation of differential effects within the periaqueductal gray. *Brain Res* 1976;114:83-103

Yoshimura M & Nishi S (1995). Primary afferent-evoked glycine- and GABA-mediated IPSPs in substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord in vitro. *J Physiol* 482; 29–38.

## Legends to figures

### **Figure 1. Field potentials evoked in superficial MDH by electrical stimulation of the meninges.**

(A) Left: Superimposed field potentials recorded in superficial MDH following electrical stimulation of the meninges at increasing strength: 1 (black), 5 (dark grey) and 40 mA (light grey). Each trace is the average of 5 successive responses (0.03 Hz). (B) Same as (A) at expanded time scale to show clearly the earliest negative, A $\delta$ -fiber field potential. (C) Same as (A) at expanded time and amplitude scales, to show the latest negative, C-fiber field potential. On increasing stimulation strength, the amplitude of the A $\delta$ -fiber field potential progressively increases (peak 1) and saturates (B) whereas the second negative, C-fiber field potential (peak 3) appears. This second negative field potential is typically included within a long positive field potential (peaks 2 and 4). (D) Normalized – to each maximum – amplitude of the A $\delta$ -fiber field potential (empty squares) and area of the C-fiber field potential (solid diamonds) are plotted against stimulation strength (same experiment as A). (E) Same as D, at expanded intensity (0-1 mA) and normalized amplitude (0-40%) scales to show the difference between the thresholds of the two field potentials. Note that the amplitude/area of each field potential plateaus (D) and that the threshold for the C-fiber field potential is higher than that for A-fiber one (E).

### **Figure 2. Morphine selectively depresses C-fiber field potentials in superficial MDH.**

(A, B) Effect of i.v. injection of morphine (3 mg.kg<sup>-1</sup>) and naloxone (0.4 mg.kg<sup>-1</sup>) on A $\delta$ - and C-fiber field potentials in a typical experiment. (A) Superimposed (right: at expanded time scale) original field potentials (average of 5 successive recordings, 0.03 Hz) recorded immediately before (black), 10 min after i.v. morphine (light grey) and 10 min after i.v. naloxone (dark grey). (B) Time course of the amplitude of the A $\delta$ -fiber field potential (empty squares) and area of the C-fiber field potential (solid diamonds). Systemic morphine leads to a fast and complete suppression of the C-fiber field potential that reverses upon systemic

naloxone whereas the A $\delta$ -fiber field potential is not strongly affected. (C) Group data of the effect of i.v. morphine (3 mg.kg<sup>-1</sup>; light grey bars; n=5) and its reversal by i.v. naloxone (0.4 mg.kg<sup>-1</sup>; dark grey bars; n=3) on A $\delta$ - and C-fiber field potentials. Amplitudes/areas, measured 1 min before (black bars), 10 min after i.v. morphine (light grey bars) and 10 min after i.v. naloxone (dark grey bars) are normalized to the average amplitude/area during the 10 min before morphine. \*\*\* indicates statistical significance: p<0.01.

**Figure 3: Typical examples of the effect of strychnine microinjection (0.5  $\mu$ l, 4 mM).**

(A,B) Typical example of a selective potentiation of the C-fiber field potential. (A) Superimposed (right: at expended time scale) original field potentials (average of 5 successive recordings, 0.03 Hz) recorded immediately before (black) and 13 (dark grey) and 20 min (light grey) after intracerebral strychnine. (B) Time course of the amplitude of the A $\delta$ -fiber field potential (solid diamonds) and area of the C-fiber field potential (empty squares). Intracerebral strychnine leads to a strong potentiation of the C-fiber field potential that reverses upon washout.(C) Typical example of a selective suppression of the C-fiber field potential. Superimposed (right: at expended time scale) original field potentials (average of 5 successive recordings, 0.03 Hz) recorded immediately before (black) and 15 (dark grey) and 35 min (light grey) after strychnine microinjection. Note that the C-fiber field potential is first strongly potentiated and subsequently completely suppressed. Simultaneously, peak 2 continuously increases.

**Figure 4: Relationship between the relative changes in peak 2 and C-fiber field potential following intracerebral microinjections of strychnine (0.5  $\mu$ l, 4 mM; empty diamonds; n = 7) and bicuculline (0.5  $\mu$ l, 1 mM; empty squares; n = 3).**

The equations of the linear regressions are  $y = -6,8 x + 351,5$  (n=7; r = 0,83; p < 0,02; empty diamonds) and  $y = -10,8 x + 169,4$  (n=3; r = 0,995; p < 0,01; empty squares) for strychnine and bicuculline microinjections, respectively. The two experiments where a C-fiber field potential appeared after bicuculline microinjection are not included in this graph.

Figure 1

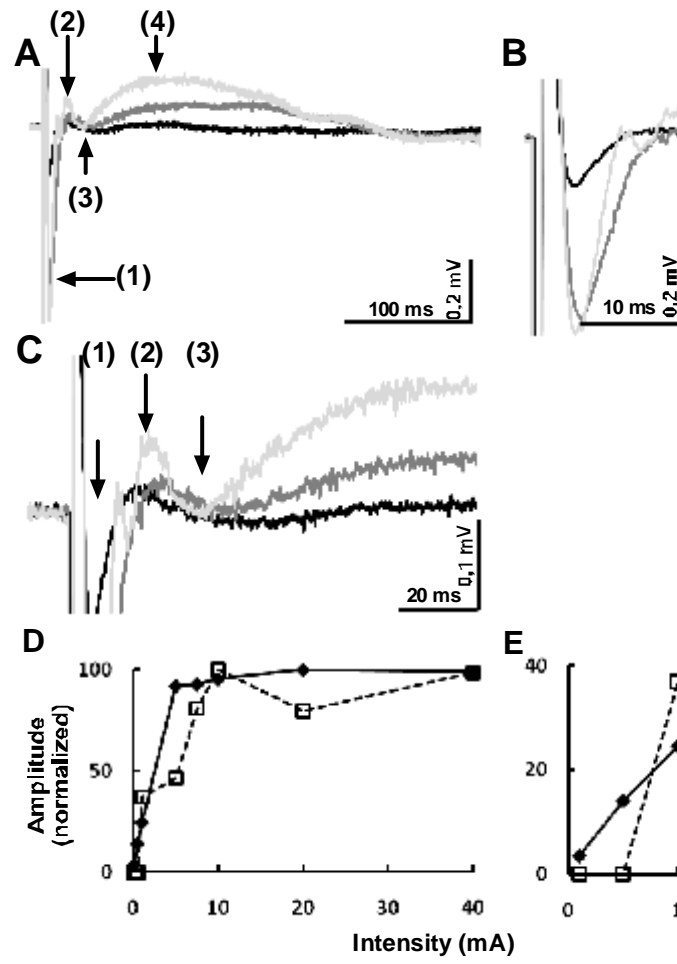


Figure 2

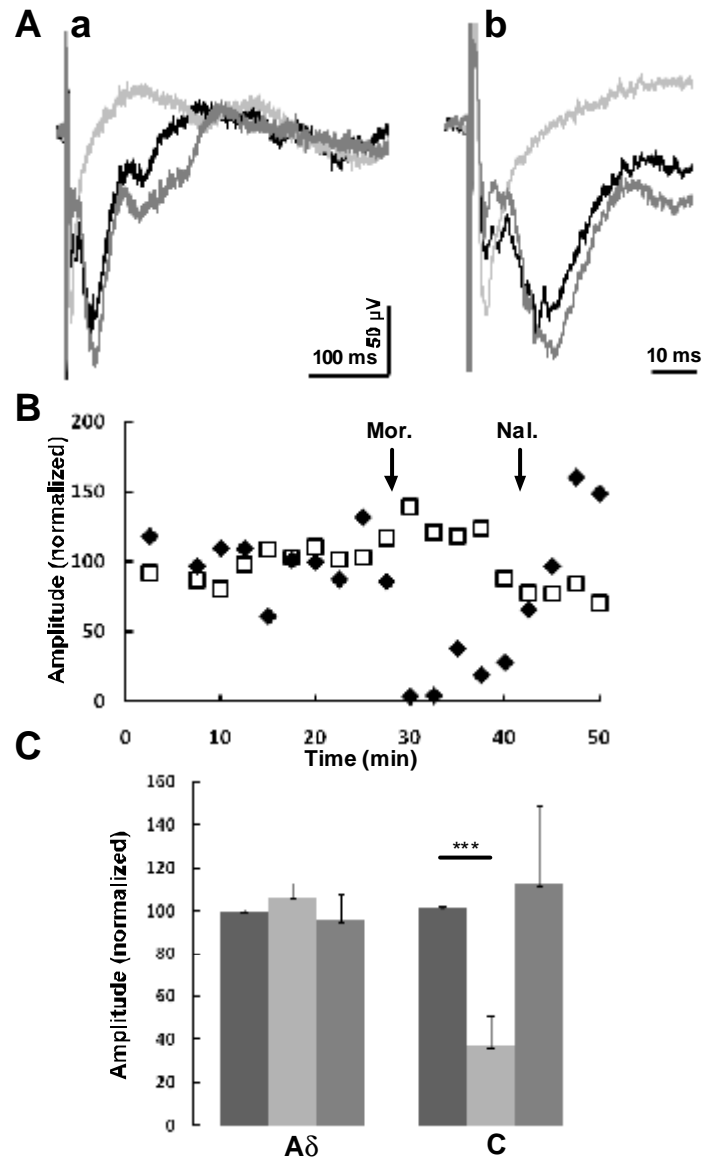


Figure 3

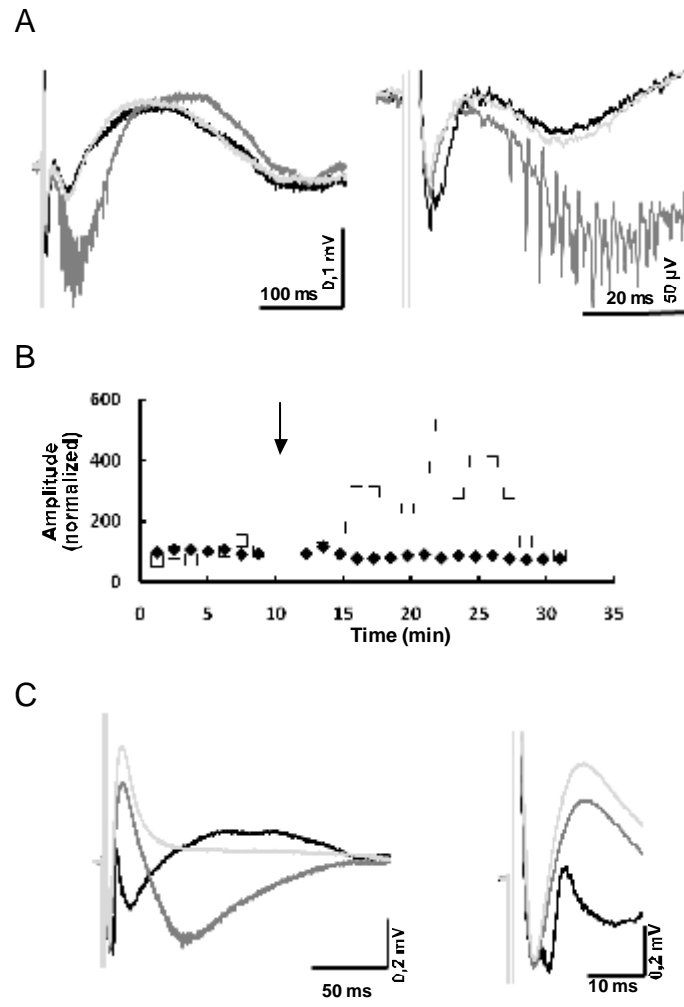
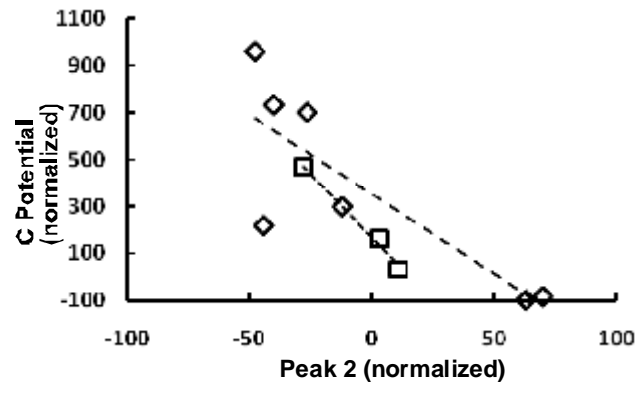




Figure 4



## **D. DISCUSSION GENERALE**

Nous montrons qu'une stimulation électrique transcutanée de la lèvre supérieure, chez le rat, évoque trois potentiels de champs négatifs avec différentes latences dans les couches superficielles du sous-noyau caudal (Sp5C) du complexe sensitif du trijumeau. Les vitesses de conduction calculées pour les afférences primaires qui évoquent ces potentiels sont compatibles avec l'hypothèse que ces trois potentiels sont dûs à l'activation de fibres afférentes primaires de type A $\beta$ , A $\delta$  et C, respectivement. L'administration systémique de morphine, supprime spécifiquement le potentiel C et cette suppression est réversée par l'administration systémique de naloxone. Le blocage pharmacologiques des récepteurs Gly (GlyR) et/ou GABA<sub>A</sub> (GABA<sub>A</sub>R) du Sp5C facilite fortement les potentiels polysynaptiques évoqués par l'activation des fibres afférentes primaires de type A $\beta$  et A $\delta$ , mais inhibe, ou même abolit, le potentiel C. L'application locale d'un antagoniste des récepteurs GABA<sub>B</sub> non seulement prévient cette suppression du potentiel C, mais aussi facilite sélectivement ce potentiel dans les conditions physiologiques, en l'absence de toute désinhibition.

Une stimulation méningée produit uniquement deux potentiels négatifs, l'un précoce et l'autre plus tardif. Les vitesses de conduction calculées pour les afférences primaires qui évoquent ces potentiels sont compatibles avec l'hypothèse que ces deux potentiels sont dûs à l'activation de fibres afférentes primaires de type A $\delta$  et C, respectivement. L'administration systémique de morphine, supprime spécifiquement le potentiel C et cette suppression est réversée par l'administration systémique de naloxone. Le blocage des GlyRs et/ou GABA<sub>A</sub>Rs, sans effet sur le potentiel A $\delta$ , potentialise, dans la grande majorité des cas, le potentiel C. Cet effet est donc à l'opposé de celui sur le potentiel C cutané.

## **I. LES FIBRES AFFERENTES PRIMAIRES DE TYPE C, CUTANÉES ET MENINGÉES, PARAÎSENT AVOIR DES PROPRIÉTÉS PHARMACOLOGIQUES IDENTIQUES.**

Les potentiels C évoqués par des stimulations cutanées et méningées sont tous deux spécifiquement inhibés, si ce n'est supprimés, par l'activation (1) de récepteurs aux opiacés, et (2) de GABA<sub>B</sub>Rs.

## 1. Effet de l'activation des récepteurs opioïdes

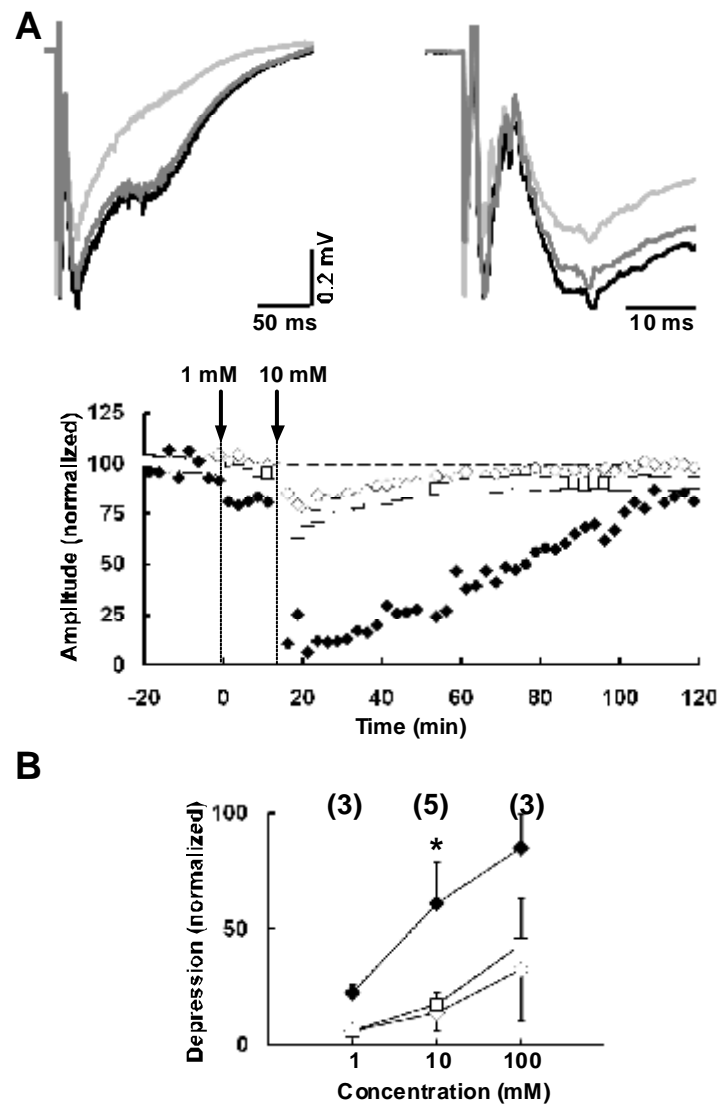
Une injection intra-veineuse (i.v.) de morphine supprime spécifiquement les potentiels C, aussi bien cutanés que méningés. Et cette inhibition est réversible à la suite d'une injection i.v. de naloxone.

En ce qui concerne les afférences cutanées, il est maintenant clairement établi que l'activation de récepteurs opioïdes bloque préférentiellement, si ce n'est sélectivement, les messages véhiculés par les afférences primaires de type C. En effet, une injection i.v. de morphine déprime sélectivement les réponses des neurones trigéminaux à une stimulation des afférences primaires cutanées de type C (Dallel et al., 1996). Et cet effet est dû, au moins en partie, à l'activation de récepteurs opioïdes présents dans les couches superficielles du Sp5C (Dallel et al., 1998). De plus, bien que les agonistes des récepteurs opioïdes (ici de type  $\mu$ ) puissent déprimer les réponses évoquées par la stimulation des fibres primaires afférentes aussi bien de type A $\delta$  que de type C, ils sont nettement plus efficaces sur la synapse fibre primaire afférente de type C- que sur celle fibre primaire afférente de type A $\delta$ -neurone de corne dorsale, aussi bien *in vivo* (Buesa et al., 2008) qu'*in vitro* (Kohno et al., 1999; Ikoma et al., 2007; Heinke et al., 2011). On peut aussi considérer la possibilité que cet effet soit dû à l'activation de récepteurs opioïdes dans des noyaux supra-spinaux, comme la substance grise périaqueducule (Yaksh et al., 1976). La substance grise périaqueducule projette vers la RVM qui elle-même, envoie des projections vers la corne dorsale, où elle contrôle le passage des inputs sélectivement nociceptifs (pour revue voir Heinricher et al., 2009; Millan, 2002). En conclusion, la suppression sélective du potentiel C cutané par l'activation de récepteurs opioïdes est bien en accord avec notre hypothèse selon laquelle ce potentiel est dû à l'activation de fibres afférentes primaires de type C cutanées.

## 2. Effet de l'activation des récepteurs GABA<sub>B</sub>

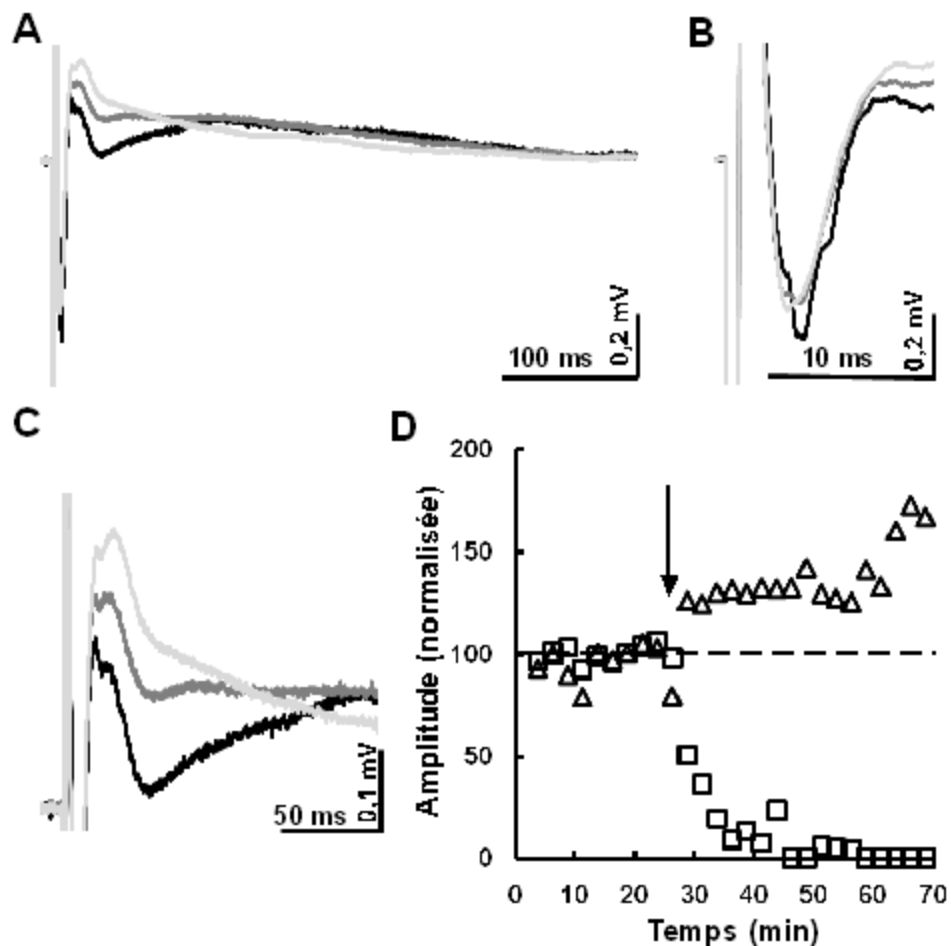
Des résultats préliminaires montrent que l'application locale ou intracérébrale de baclofène, un agoniste des GABA<sub>B</sub>Rs, supprime préférentiellement les potentiels C aussi bien cutanés (Figure 17) que méningés (Figure 18). Ces résultats sont en accord avec les données anatomiques et physiologiques. En effet, bien que les GABA<sub>A</sub>Rs et les GABA<sub>B</sub>Rs soient tous deux présents sur les terminaisons des afférences primaires, les GABA<sub>B</sub>Rs sont prédominants dans les couches superficielles de la corne dorsale (Price et al., 1984; Price et al., 1987; Towers et al., 2000). De plus, l'activation des GABA<sub>B</sub>Rs segmentaires déprime les

réponses neuronales aux stimuli mécaniques nociceptifs, mais non aux stimuli mécaniques tactiles (Dickenson et al., 1985; Hao et al., 1992) et davantage les réponses synaptiques évoquées par la stimulation des fibres afférentes primaires de type C que celles évoquées par la stimulation des fibres afférentes primaires de type A $\delta$  (Ataka et al., 2000) et A $\beta$  (Dickenson et al., 1985).



**Figure 17 : Effet de l'application intracisternale de baclofène (10  $\mu$ l) sur les potentiels de champ évoqués dans ce noyau par une stimulation cutanée.**

**A.** Exemple de l'effet de l'application locale de baclofène (10  $\mu$ l, 1 puis 10 mM) sur les potentiels A $\beta$  (losanges vides), A $\delta$  (carrés vides) et C (losanges noirs). Au dessus : Potentiels de champ enregistrés avant (gris foncé) et après (5 min : noir ; 100 min : gris clair) l'application de baclofène comme indiqué sur le graphique (1, 2 et 3, respectivement). A droite à une plus grande échelle de temps pour montrer les potentiels A $\beta$  et A $\delta$ . Le baclofène supprime complètement le potentiel C mais partiellement les potentiels A $\beta$  et A $\delta$ . **B.** Courbe dose réponse (moyenne  $\pm$  écart type). Les chiffres au-dessus indiquent le nombre d'expériences. \*: le potentiel C est significativement plus déprimé que les potentiels A $\beta$  et A $\delta$ .



**Figure 18 : Effet d'une micro-injection intracérébrale de baclofène (0,5  $\mu$ l, 0,1 mM) dans le Sp5C sur les potentiels de champ évoqués dans ce noyau par une stimulation méningée (10 mA, 2 ms).**

**A**, Potentiels de champs enregistrés avant (noir) et 10 min (gris) et 45 min (gris clair) après la micro-injection de baclofène. **B**, Comme A, à une plus grande échelle de temps pour montrer le potentiel A $\delta$ . **C**, Comme A, à de plus grandes échelles de temps et d'amplitude. **D**, Amplitude (normalisée par rapport à la moyenne des valeurs pendant les 15 min avant micro-injection) du potentiel C (carrés vides) et du pic 2 positif (triangles vides) en fonction du temps. Flèche: micro-injection. Un effet identique a été obtenu chez trois autres animaux.

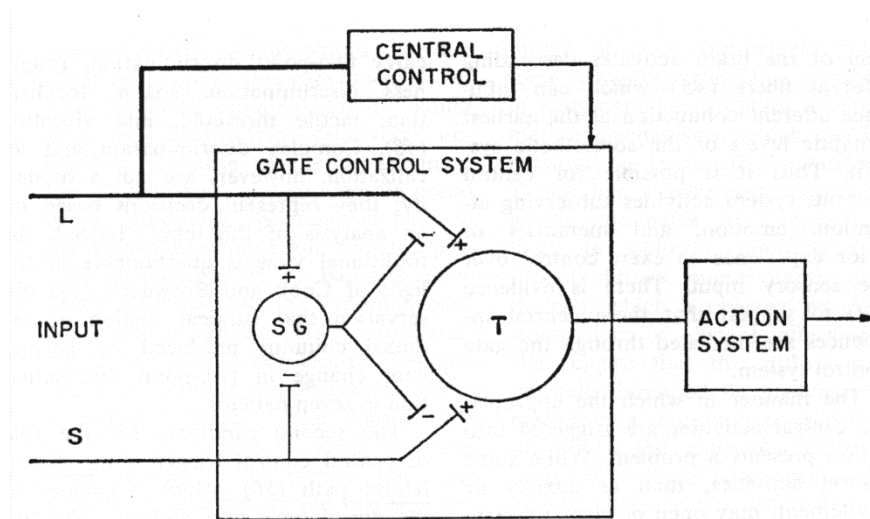
En conclusion, la comparaison des propriétés du potentiel C cutané avec celles rapportées par les études électrophysiologiques antérieures extracellulaires montre que ce potentiel C cutané est bien dû à l'activation de fibres afférentes primaires cutanées de type C.

De plus, ces résultats montrent les potentiels C, cutanés et méningés, ont des propriétés identiques. Ils sont évoqués par des fibres ayant des propriétés électrophysiologiques – conduction lente et seuil d'activation élevé – de fibres afférentes primaires de type C. De plus, les terminaisons de ces fibres portent les mêmes récepteurs opioïdes et GABA<sub>B</sub>. Cependant, la désinhibition GABA<sub>A</sub>ergique et/ou glycinergique a un effet très différent sur les deux potentiels C, cutané et méningé.

## **II. Le potentiel C cutané mais non méningé est inhibé à la suite d'une désinhibition GABAergique et/ou glycinergique**

Le blocage pharmacologique des GlyRs et/ou GABA<sub>A</sub>Rs segmentaires inhibe, ou même abolit, le potentiel C cutané. Notre hypothèse est qu'une déficience de l'inhibition synaptique segmentaire facilite l'activation par des afférences primaires de type A de circuits polysynaptiques comportant des interneurons GABAergiques. Le recrutement de ces circuits polysynaptiques inhiberait les inputs de type C via l'activation de GABA<sub>B</sub>Rs présynaptiques.

Que l'augmentation de l'activité de fibres afférentes primaires de type A inhibe l'input de type C évoque très fortement le modèle du « gate control » proposé par Melzack et Wall (1965). Dans ce modèle, trois caractéristiques de l'input afférent sont importantes pour la douleur : (i) l'activité basale qui précède le stimulus, (ii) l'activité évoquée par le stimulus, et (iii) le rapport entre les activités des grosses et petites fibres. Même en l'absence de stimulation évidente, la moelle épinière est constamment bombardée par une activité afférente. Cette activité basale est essentiellement due aux petites fibres, myélinisées ou non, qui ont une activité tonique et adaptent lentement. Cette activité maintient la porte ouverte. Quand un stimulus est appliqué sur la peau, le nombre de fibres actives augmente. Cette stimulation produit une augmentation de l'activité des grosses fibres par rapport aux petites, d'autant plus importante que la plupart des grosses fibres sont inactives en l'absence de stimulus. Ainsi, si une légère pression est appliquée tout d'un coup sur la peau, la volée afférente contenant les potentiels d'action des grosses fibres non seulement active les cellules T mais aussi, partiellement, ferme la porte présynaptique, raccourcissant ainsi le barrage d'activité généré par les cellules T. Si l'intensité de la stimulation augmente, davantage de récepteurs sont recrutés et la fréquence de potentiels d'action dans les fibres activées augmente. Les effets positifs et négatifs résultant de l'activité des grosses et petites fibres tendent à s'équilibrer ; l'activité de la cellule T augmente peu. Par contre, si la stimulation se prolonge, les grosses fibres tendent à s'adapter, conduisant à une augmentation relative de l'activité des petites fibres. La porte s'ouvre alors davantage et l'activité de la cellule T augmente rapidement. Si une activité soutenue des grosses fibres est maintenue artificiellement à ce moment là, par vibration ou grattage (manœuvre qui tend à surmonter l'adaptation des grosses fibres), l'activité de ces cellules rediminue alors (Figure 19).



**Figure 19 : Schéma de la théorie du « gate control »**

L : fibres de gros diamètre ; S, fibres de petit diamètre. Les fibres se projettent dans la substance gélatineuse (SG) et les premiers neurones de projection vers les centres. L'effet inhibiteur exercé par SG sur les terminaisons des fibres afférentes est augmenté par l'activité des fibres L et diminué par celle des fibres S. Le contrôle central est représenté par une ligne allant des grosses fibres aux mécanismes de contrôle centraux ; ces mécanismes, à leur tour, projettent en retour vers les systèmes de « gate control ». Les cellules T projettent vers les cellules d'entrée du système d'action. +, excitation ; -, inhibition (d'après Melzack & Wall, 1965).

Dans nos conditions expérimentales, la cellule T est représentée par les neurones de projection de la couche I et l'augmentation de l'activité des fibres A provoquée artificiellement par le blocage pharmacologique des GABA<sub>A</sub>Rs et GlyRs. On sait que les inputs de type A sur les neurones des couches superficielles de la corne dorsale augmentent très fortement à la suite d'une désinhibition GABA<sub>A</sub>ergique et/ou glycinergique (Baba et al., 2003; Torsney & MacDermott, 2006; Keller et al., 2007; Miraucourt et al., 2007).

Il est maintenant clairement établi qu'une stimulation des fibres afférentes primaires de type A inhibe les inputs de type C dans la corne dorsale. Une stimulation répétée soit des nerfs périphériques, mais à une intensité de stimulation juste suffisante pour exciter seulement les grosses fibres afférentes primaires myélinisées de type A $\beta$ , soit de leurs collatérales dans la moelle dorsale inhibe aussi bien la douleur thermique (Handwerker et al., 1975; Cervero et al., 1976) que les réponses des neurones de la corne dorsale à la stimulation des fibres afférentes primaires de type C (Brown et al., 1973; Cervero et al., 1976). De la même façon, l'activation de fibres afférentes primaires de type A par la stimulation électrique longue, répétitive de nerfs – transcutanée (« transcutaneous electrical nerve stimulations » ou TENS), ou directe – augmente la latence du test « tail-flick » (Woolf et al., 1977; Woolf et al., 1980) et réduit les réponses comportementales (Sjölund, 1985; Sjölund, 1988) ou électrophysiologiques des neurones spinaux (Lee et al., 1985; Garrison & Foreman, 1997; Garrison & Foreman, 1994) à la stimulation des fibres afférentes primaires de type C.



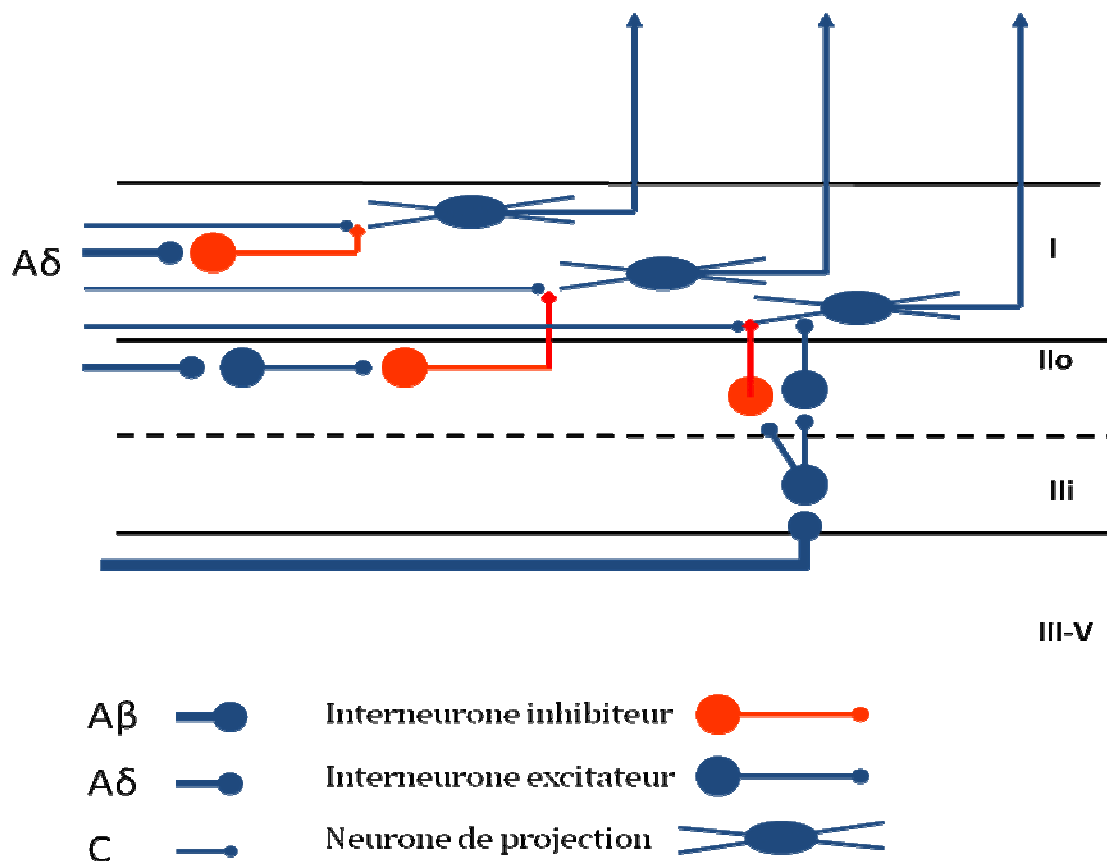
Pour que s'exerce ce contrôle sur les inputs de type C par l'activité des fibres afférentes primaires de type A, il faut que l'activité dans ces deux types d'afférences soit quasi synchrone. Ce phénomène a en effet une durée limitée: il est maximum 20-40 ms et disparaît au bout d'environ 100 ms après la stimulation des fibres afférentes primaires de type A (Brown et al., 1973; Calvillo et al., 1982). De ce point de vue, il faut noter l'organisation particulière du système trigéminal par rapport au reste du corps. D'une part, le nerf trigéminal compte relativement beaucoup plus de fibres de type A que de type C comparé aux autres nerfs. D'autre part, la plupart des tissus innervés sont à une distance relativement courte du complexe sensitif du trijumeau. On peut donc imaginer que ce contrôle soit plus efficace dans le système trigéminal en cas d'activation simultanée des afférences primaires cutanées de type A et C.

Quel type de fibre afférente primaire A contrôle l'input de type C ? Puisque la désinhibition segmentaire facilite les circuits polysynaptiques activés par les deux types de fibres afférentes primaires A (résultats présents), cela pourrait être les afférences primaires de type A $\beta$  et/ou de type A $\delta$ . En fait, l'activité de ces deux types d'afférences primaires paraît contrôler les inputs de type C. Si les grosses fibres A $\beta$  exercent bien une inhibition des inputs C, on a aussi remarqué qu'augmenter l'intensité du TENS, à un niveau capable d'activer les fibres A $\delta$ , augmente cette inhibition (Lee et al., 1985; Sjölund, 1988). De même, c'est l'activité tonique des fibres A $\delta$  du nerf sciatique qui inhibe les réponses comportementales à la stimulation des inputs C du nerf saphène (Jones et al., 2005).

Le contrôle des inputs des fibres afférentes primaires de type C par les fibres afférentes primaires de type A implique des mécanismes segmentaires (ou intersegmentaires : voir Jones et al., 2005) car on l'observe toujours chez l'animal spinalisé (Cervero et al., 1976; Garrison & Foreman, 1996; Woolf et al., 1977; Brown et al., 1973). Et ces mécanismes segmentaires impliquent des interneurons inhibiteurs GABAergiques. Caresser les poils de la peau (Hentall & Fields, 1979) ou stimuler les nerfs, à une intensité de stimulation juste suffisante pour activer les fibres afférentes primaires de type A (Fitzgerald & Woolf, 1981; Calvillo et al., 1982) augmente l'excitabilité des fibres C (signe de l'activation de GABA<sub>A</sub>Rs présynaptiques).

Il s'agit vraisemblablement de circuits polysynaptiques comportant des interneurons GABAergiques activant des GABA<sub>B</sub>Rs présynaptiques. Ainsi la potentialisation du potentiel C dans la corne dorsale induite par l'application intrathécale de phaclofène, un antagoniste des GABA<sub>B</sub>Rs, est supprimée en présence d'un antagoniste des récepteurs NMDA (Buesa et al., 2006). Cela pourrait impliquer les mêmes circuits polysynaptiques que ceux révélés à la

suite d'une désinhibition aussi bien sur les neurones de la substance gélatineuse (Baba et al., 2003) que sur les neurones de projection de la couche I (Torsney & MacDermott, 2006; Keller et al., 2007; Miraucourt et al., 2007), mais incluant un interneurone inhibiteur GABAergique (Figure 20). Cependant, il est important de noter que les fibres C semblent recevoir peu de synapses axo-axoniques de la part d'interneurones GABAergiques (pour revue voir Rudomin & Schmidt, 1999). Il faut donc concevoir une organisation structurale/anatomique différente de la synapse axo-axonique pour cet input GABAergique. Les GABA<sub>B</sub>Rs pourraient être localisés non pas sur la terminaison présynaptique elle-même, mais plus en amont sur l'axone, à distance de cette terminaison. Une telle localisation, plutôt que d'interférer directement avec la libération de transmetteur, empêcherait le potentiel d'action de se propager plus avant et de gagner les terminaisons, un dispositif similaire à celui décrit pour les afférences provenant des fuseaux musculaires (Verdier et al., 2003). Ces récepteurs axonaux pourraient être activés non pas par du GABA libéré directement sur ces récepteurs mais par du GABA ambiant (voir Chéry & De Koninck, 2000).



**Figure 20 : Représentation schématique des circuits polysynaptiques possibles pour le contrôle de l'input de type C par l'activité des fibres afférentes primaires de type Aβ et Aδ.**

La voie polysynaptique entre les terminaisons des fibres afférentes primaires de type Aβ et les neurones de la couche I (à droite) pourrait être celle qui implique des interneurones exprimant la PKCγ et opère par l'intermédiaire de neurones nociceptifs spécifiques qui ne portent pas le récepteur à la neurokinin 1 (Miraucourt et al., 2009). Cette voie polysynaptique excitatrice pourrait inclure des cellules de types « central » et « vertical » (Lu & Perl, 2003; 2005). Cette voie activerait en parallèle un interneurone inhibiteur de dernier ordre.

Cette conclusion n'est pas conforme à la théorie du « gate control ». En effet, dans cette théorie, l'input de type  $A\beta$  contrôle les inputs de type  $A\delta$  et C (voir ci-dessus). De plus, on remarque que la désinhibition synaptique, en même temps qu'elle inhibe l'input de type C, facilite la propagation de l'input de type  $A\beta$  (Torsney & MacDermott, 2006; Keller et al., 2007; Miraucourt et al., 2007). On passe ainsi d'une nociception à haut seuil à une hypersensibilité à bas seuil (pour revue voir Latremoliere & Woolf, 2009). Une interprétation est qu'il y aurait une hiérarchie dans les modalités sensorielles : une hypersensibilité secondaire des abords d'une lésion étant vraisemblablement plus utile à la cicatrisation qu'une douleur au niveau même de cette lésion. Une telle hiérarchie existe déjà entre douleur et prurit. On a montré récemment que les afférences primaires peptidergiques de type C, en même temps qu'elles transmettent la douleur, inhibent la transmission de la sensation de démangeaison (Lagerström et al., 2010; Ross et al., 2010).

Nous montrons que le potentiel C méningé n'est pas inhibé – tout au moins aussi systématiquement que le potentiel C cutané – à la suite de la désinhibition  $GABA_A$ ergique et/ou glycinergique. Pourtant, le potentiel C méningé est supprimé par l'application de baclofène (Figure 18) indiquant que les terminaisons des afférences primaires méningées de type C portent aussi des  $GABA_B$ Rs. Les afférences primaires méningées et cutanées pourraient activer des réseaux neuronaux différents dans le Sp5C. D'une part, il n'y a que deux types de fibres afférentes primaires méningées,  $A\delta$  et C, alors qu'il y en a trois cutanées,  $A\beta$ ,  $A\delta$  et C. Et les fibres  $A\beta$  contribuent peut-être préférentiellement au recrutement des circuits polysynaptiques aboutissant à l'activation de l'interneurone inhibiteur. D'autre part, la douleur méningée est une douleur viscérale. Elle n'a donc pas la même signification fonctionnelle que la douleur cutanée, et n'entre peut-être pas dans la même hiérarchie évoquée plus haut.

Cette différence entre les effets de la désinhibition segmentaire sur les potentiels de champs cutanés et méningés suggère que le traitement dans le Sp5C des informations nociceptives cutanées et méningées est différent. Cette différence peut-elle expliquer notre très grande susceptibilité à la douleur migraineuse ? Une stimulation inflammatoire provoque une potentialisation de la réponse au niveau de la corne dorsale et du Sp5C, premier relais sur les voies nociceptives. Ainsi l'injection de formol ou de capsaïcine dans la patte postérieure du rat induit une potentialisation à long-terme du potentiel de champ C dans la corne dorsale de la moelle lombaire (Ikeda et al., 2006). De même, l'activité de neurones à convergence de la couche V du Sp5C est aussi durablement augmentée à la suite d'une brève stimulation inflammatoire des méninges (Burstein & Jakubowski, 2004; Levy et al., 2004; Burstein et al.,

1998; Zhang et al., 2010). Mais les seuils d'activité dans les afférences cutanées et méningées nécessaires pour potentialiser des réseaux neuronaux du Sp5C sont-ils équivalents ? De même, la dépression corticale envahissante semble intervenir dans la physiopathologie de la migraine. Elle potentialise l'activité des cellules ganglionnaires méningées (Zhang et al., 2010). Mais la dépression corticale envahissante induit-elle une potentialisation à long-terme de la transmission excitatrice entre fibres afférentes primaires et neurones de second ordre du Sp5C ? L'enregistrement de potentiels de champs pourrait aider à répondre à ces questions.

## BIBLIOGRAPHIE

- 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(1), p.34-40.
- Aigner M, Robert Lukas J, Denk M, Ziya-Ghazvini F, Kaider A, Mayr R. 2000. Somatotopic organization of primary afferent perikarya of the guinea-pig extraocular muscles in the trigeminal ganglion: a post-mortem DiI-tracing study. *Exp Eye Res*, 70(4), p.411-418.
- Alvarez-Leefmans FJ. 2009. Chloride transporters in presynaptic inhibition, pain and neurogenic inflammation. In *Physiology and Pathology of Chloride Transporters and Channels in the Nervous System: From Molecules to Diseases*, ed. FJ Alvarez-Leefmans, E Delpire, pp. 439–70. Amsterdam: Elsevier
- Andlin-Sobocki P, Jönsson B, Wittchen HU, Olesen J. 2005. Cost of disorders of the brain in Europe. *Eur J Neurol*, 12 Suppl 1, p.1-27.
- Andrew, D. & Craig, A.D., 2001. Spinothalamic lamina I neurons selectively sensitive to histamine: a central neural pathway for itch. *Nat Neurosci*, 4(1), p.72-77.
- Antal M, Petkó M, Polgár E, Heizmann CW, Storm-Mathisen J. 1996. Direct evidence of an extensive GABAergic innervation of the spinal dorsal horn by fibres descending from the rostral ventromedial medulla. *Neurosci*, 73(2), p.509-518.
- Arvidsson, J., Pfaller, K. & Gmeiner, S., 1992. The ganglionic origins and central projections of primary sensory neurons innervating the upper and lower lips in the rat. *Somatosensory Motor Res*, 9(3), p.199-209.
- Asghar MS, Hansen AE, Amin FM, van der Geest RJ, Koning P, Larsson HB, Olesen J, Ashina M. 2011. Evidence for a vascular factor in migraine. *Ann Neurology*, 69(4), p.635-645.
- Ataka T, Kumamoto E, Shimoji K, Yoshimura M. 2000. Baclofen inhibits more effectively C-afferent than Adelta-afferent glutamatergic transmission in substantia gelatinosa neurons of adult rat spinal cord slices. *Pain*, 86(3), p.273-282.

- Baba H, Ji RR, Kohno T, Moore KA, Ataka T, Wakai A, Okamoto M, Woolf CJ. 2003. Removal of GABAergic inhibition facilitates polysynaptic A fiber-mediated excitatory transmission to the superficial spinal dorsal horn. *Mol Cell Neurosci*, 24(3), p.818-830.
- Baccei, M.L. & Fitzgerald, Maria, 2004. Development of GABAergic and glycinergic transmission in the neonatal rat dorsal horn. *J Neurosci*, 24(20), p.4749-4757.
- Bahra A, Matharu MS, Buchel C, Frackowiak RS, Goadsby PJ. 2001. Brainstem activation specific to migraine headache. *Lancet*, 357(9261), p.1016-1017.
- Baldissera F, Hultborn H, Illert M. Integration in spinal neuronal systems. In: Handbook of physiology, Section I: The nervous system, pp 509–595. Baltimore: Williams & Wilkins, 1981
- Beal, J.A. & Cooper, M.H., 1978. The neurons in the gelatinosal complex (Laminae II and III) of the monkey (*Macaca mulatta*): a Golgi study. *J Comp Neurol*, 179(1), p.89-121.
- Beiche F, Scheuerer S, Brune K, Geisslinger G, Goppelt-Struebe M. 1996. Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. *FEBS Letters*, 390(2), p.165-169.
- Ben-Ari, Y., 2002. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci*, 3(9), p.728-739.
- Bennett GJ, Abdelmoumene M, Hayashi H, Dubner R. 1980. Physiology and morphology of substantia gelatinosa neurons intracellularly stained with horseradish peroxidase. *J Comp Neurology*, 194(4), p.809-827.
- Bennett DL, Michael GJ, Ramachandran N, Munson JB, Averill S, Yan Q, McMahon SB, Priestley JV. 1998. A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury. *J Neurosci*, 18(8), p.3059-3072.
- Benoliel, R, Eliav, E & Tal, M., 2001. No sympathetic nerve sprouting in rat trigeminal ganglion following painful and non-painful infraorbital nerve neuropathy. *Neurosci Letters*, 297(3), p.151-154.

- Benoiel R, Birenboim R, Regev E, Eliav E. 2005. Neurosensory changes in the infraorbital nerve following zygomatic fractures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontics*, 99(6), p.657-665.
- Bereiter, Hargreaves, Hu (2008). Trigeminal Mechanisms of Nociception: Peripheral and Brainstem Organization; 435-450. Elsevier.
- Berge, T.I., 2002. Incidence of chronic neuropathic pain subsequent to surgical removal of impacted third molars. *Acta Odontologica Scandinavica*, 60(2), p.108-112.
- Besson, J.M. & Chaouch, A., 1987. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiologi Rev*, 67(1), p.67-186.
- Betz, Heinrich & Laube, B., 2006. Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J Neurochem*, 97(6), p.1600-1610.
- Beuerman, R.W. & Tanelian, D.L., 1979. Corneal pain evoked by thermal stimulation. *Pain*, 7(1), p.1-14.
- Beyer, C., Roberts, L.A. & Komisaruk, B.R., 1985. Hyperalgesia induced by altered glycinergic activity at the spinal cord. *Life Sci*, 37(9), p.875-882.
- Bice, T.N. & Beal, J.A., 1997. Quantitative and neurogenic analysis of the total population and subpopulations of neurons defined by axon projection in the superficial dorsal horn of the rat lumbar spinal cord. *J Comp Neurol*, 388(4), p.550-564.
- Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA. 2002. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med*, 8(2), p.136-142.
- Bongenhielm U, Boissonade FM, Westermark A, Robinson PP, Fried K. 1999. Sympathetic nerve sprouting fails to occur in the trigeminal ganglion after peripheral nerve injury in the rat. *Pain*, 82(3), p.283-288.
- Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ. 2002. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacol Revs*, 54(2), p.247-264.

- Bowyer SM, Aurora KS, Moran JE, Tepley N, Welch KM. 2001. Magnetoencephalographic fields from patients with spontaneous and induced migraine aura. *Ann Neurology*, 50(5), p.582-587.
- Brighina F, Piazza A, Daniele O, Fierro B. 2002. Modulation of visual cortical excitability in migraine with aura: effects of 1 Hz repetitive transcranial magnetic stimulation. *Exp Brain Res*. 145(2), p.177-181.
- Brown, A.G., Kirk, E.J. & Martin, H.F., 3rd, 1973. Descending and segmental inhibition of transmission through the spinocervical tract. *J Physiology*, 230(3), p.689-705.
- Buesa I, Ortiz V, Aguilera L, Torre F, Zimmermann M, Azkue JJ. 2006. Disinhibition of spinal responses to primary afferent input by antagonism at GABA receptors in urethane-anaesthetised rats is dependent on NMDA and metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacol*, 50(5), p.585-594.
- Buesa I, Urrutia A, Bilbao J, Aguilera L, Zimmermann M, Azkue JJ .2008. Non-linear morphine-induced depression of spinal excitation following long-term potentiation of C fibre-evoked spinal field potentials. *Eur J Pain*, 12(6), p.814-817.
- Burstein R, Hiroyoshi Y, Amy M, Strassman M. 1998. Chemical stimulation of the intracranial dura induces enhanced responses to facial stimulation in brain stem trigeminal neurons. *J Neurophysiol*, 79(2), p.964-982.
- Burstein, R, Cutrer, M.F. & Yarnitsky, D., 2000. The development of cutaneous allodynia during a migraine attack clinical evidence for the sequential recruitment of spinal and supraspinal nociceptive neurons in migraine. *Brain*:123 ( Pt 8), p.1703-1709.
- Burstein R, Yarnitsky D, Goor-Aryeh I, Ransil BJ, Bajwa ZH. 2000. An association between migraine and cutaneous allodynia. *Ann Neurol*, 47(5), p.614-624.
- Burstein, Rami & Jakubowski, M., 2004. Analgesic triptan action in an animal model of intracranial pain: a race against the development of central sensitization. *An Neurol*, 55(1), p.27-36.
- Byers, M.R. & Närhi, M.V., 1999. Dental injury models: experimental tools for understanding neuroinflammatory interactions and polymodal nociceptor functions. *Critic Rev Oral Biol Med*, 10(1), p.4-39.



- Calvillo, O., Madrid, J. & Rudomín, P., 1982. Presynaptic depolarization of unmyelinated primary afferent fibers in the spinal cord of the cat. *Neurosci*, 7(6), p.1389-1409.
- Campbell, R.L., Parks, K.W. & Dodds, R.N., 1990. Chronic facial pain associated with endodontic therapy. *Oral Surg Oral Medi Oral Patholy*, 69(3), p.287-290.
- Cao Y, Aurora SK, Nagesh V, Patel SC, Welch KM. 2002. Functional MRI-BOLD of brainstem structures during visually triggered migraine. *Neurology*, 59(1), p.72-78.
- Capra, N.F. & Wax, T.D., 1989. Distribution and central projections of primary afferent neurons that innervate the masseter muscle and mandibular periodontium: a double-label study. *J Comp Neurol*, 279(3), p.341-352.
- Carmichael, F.A. & McGowan, D.A., 1992. Incidence of nerve damage following third molar removal: a West of Scotland Oral Surgery Research Group study. *Brit J Oral Maxillofacial Surg*, 30(2), p.78-82.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(6653), p.816-824.
- Cervero, F, Iggo, A. & Ogawa, H., 1976. Nociceptor-driven dorsal horn neurones in the lumbar spinal cord of the cat. *Pain*, 2(1), p.5-24.
- Cervero, F, 1994. Sensory innervation of the viscera: peripheral basis of visceral pain. *Physiol Rev*, 74(1), p.95-138.
- Cervero, F & Iggo, A., 1980. The substantia gelatinosa of the spinal cord: a critical review. *Brain*, 103(4), p.717-772.
- Chalifoux, J.R. & Carter, A.G., 2011. GABAB receptor modulation of synaptic function. *Cur Opin Neurobiol*, 21(2), p.339-344.
- Charbit AR, Akerman S, Holland PR, Goadsby PJ. 2009. Neurons of the dopaminergic/calcitonin gene-related peptide A11 cell group modulate neuronal firing in the trigeminocervical complex: an electrophysiological and immunohistochemical study. *J Neurosci*, 29(40), p.12532-12541.
- Chaudhry FA, Reimer RJ, Bellocchio EE, Danbolt NC, Osen KK, Edwards RH, Storm-Mathisen J. 1998. The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic

- vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *J Neurosci*, 18(23), p.9733-9750.
- 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(17), p.7342-7355.
- Chéry, N. & De Koninck, Y, 2000. GABA(B) receptors are the first target of released GABA at lamina I inhibitory synapses in the adult rat spinal cord. *J Neurophysiol*, 84(2), p.1006-1011.
- Cheung, L.K. & Lo, J., 2002. The long-term clinical morbidity of mandibular step osteotomy. *Int J Adult Orthodont Orthognathic Surg*, 17(4), p.283-290.
- Chronicle, E.P. & Mulleners, W.M., 1996. Visual system dysfunction in migraine: a review of clinical and psychophysical findings. *Cephalalgia*:16(8), p.525-535; discussion 523.
- Cometto-Muñiz, J.E. & Cain, W.S., 1995. Relative sensitivity of the ocular trigeminal, nasal trigeminal and olfactory systems to airborne chemicals. *Chemical Senses*, 20(2), p.191-198.
- Coste J, Voisin DL, Miraucourt LS, Dallel R, Luccarini P. 2008. Dorsal horn NK1-expressing neurons control windup of downstream trigeminal nociceptive neurons. *Pain*, 137(2), p.340-351.
- Coull JA, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sîk A, De Koninck P, De Koninck Y. 2003. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature*, 424(6951), p.938-942.
- Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y. 2005. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*, 438(7070), p.1017-1021.
- Cox JJ, Sheynin J, Shorer Z, Reimann F, Nicholas AK, Zubovic L, Baralle M, Wraige E, Manor E, Levy J, Woods CG, Parvari R. 2010. Congenital insensitivity to pain: novel SCN9A missense and in-frame deletion mutations. *Human Mutation*, 31(9), p.E1670-1686.

- Craig, A.D. & Kniffki, K.D., 1985. Spinothalamic lumbosacral lamina I cells responsive to skin and muscle stimulation in the cat. *J Physiol*, 365, p.197-221.
- Craig, A.D.B., 2003. Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing. *Ann Rev Neurosci*, 26, p.1-30.
- Dallel, R, Clavelou, P. & Woda, A, 1989. Effects of tractotomy on nociceptive reactions induced by tooth pulp stimulation in the rat. *Exp Neurol*, 106(1), p.78-84.
- Dallel R, Luccarini P, Molat JL, Woda A. 1996. Effects of systemic morphine on the activity of convergent neurons of spinal trigeminal nucleus oralis in the rat. *Eur J Pharmacol*, 314(1-2), p.19-25.
- Dallel, R, Dualé, C. & Molat, J.L., 1998. Morphine administered in the substantia gelatinosa of the spinal trigeminal nucleus caudalis inhibits nociceptive activities in the spinal trigeminal nucleus oralis. *J Neurosci*, 18(10), p.3529-3536.
- Dallel R, Duale C, Luccarini P, Molat JL. 1999. Stimulus-function, wind-up and modulation by diffuse noxious inhibitory controls of responses of convergent neurons of the spinal trigeminal nucleus oralis. *Eur J Neurosci*, 11(1), p.31-40.
- Daniele, C.A. & MacDermott, Amy B, 2009. Low-threshold primary afferent drive onto GABAergic interneurons in the superficial dorsal horn of the mouse. *J Neurosci*, 29(3), p.686-695.
- Davies, C.H. & Collingridge, G.L., 1993. The physiological regulation of synaptic inhibition by GABAB autoreceptors in rat hippocampus. *J Physiol*, 472, p.245-265.
- Davies CH, Starkey SJ, Pozza MF, Collingridge GL. 1991. GABA autoreceptors regulate the induction of LTP. *Nature*, 349(6310), p.609-611.
- Dickenson, A H, Brewer, C.M. & Hayes, N.A., 1985. Effects of topical baclofen on C fibre-evoked neuronal activity in the rat dorsal horn. *Neurosci*, 14(2), p.557-562.
- Diogenes A, Patwardhan AM, Jeske NA, Ruparel NB, Goffin V, Akopian AN, Hargreaves KM. 2006. Prolactin modulates TRPV1 in female rat trigeminal sensory neurons. *J Neurosci*: 26(31), p.8126-8136.

- Drew, G.M., Siddall, P.J. & Duggan, Arthur W, 2004. Mechanical allodynia following contusion injury of the rat spinal cord is associated with loss of GABAergic inhibition in the dorsal horn. *Pain*, 109(3), p.379-388.
- Duggan, A W, Griensmith, B.T. & Johnson, S.M., 1981. Supraspinal inhibition of the excitation of dorsal horn neurones by impulses in unmyelinated primary afferents: lack of effect by strychnine and bicuculline. *Brain Res*, 210(1-2), p.231-241.
- Dumoulin A, Rostaing P, Bedet C, Lévi S, Isambert MF, Henry JP, Triller A, Gasnier B. 1999. Presence of the vesicular inhibitory amino acid transporter in GABAergic and glycinergic synaptic terminal boutons. *J Cell Sci*, 112 ( Pt 6), p.811-823.
- Eaton, M.J., Martinez, M.A. & Karmally, S., 1999. A single intrathecal injection of GABA permanently reverses neuropathic pain after nerve injury. *Brain Res*, 835(2), p.334-339.
- Eaton MJ, Plunkett JA, Karmally S, Martinez MA, Montanez K. 1998. Changes in GAD- and GABA- immunoreactivity in the spinal dorsal horn after peripheral nerve injury and promotion of recovery by lumbar transplant of immortalized serotonergic precursors. *J Chem Neuroanat*, 16(1), p.57-72.
- Edvinsson, Lars & Uddman, R., 2005. Neurobiology in primary headaches. *Brain Res.*, 48(3), p.438-456.
- Feindel, W., Penfield, W. & Mcnaughton, F., 1960. The tentorial nerves and localization of intracranial pain in man. *Neurology*, 10, p.555-563.
- Fitzgerald, M & Woolf, C J, 1981. Effects of cutaneous nerve and intraspinal conditioning of C-fibre afferent terminal excitability in decerebrate spinal rats. *J Physiol*, 318, p.25-39.
- Garrison, D.W. & Foreman, R.D., 1997. Classification of dorsal horn neurons based on somatic receptive fields in cats with intact and transected spinal cords: neural plasticity. *Brain Res*, 762(1-2), p.228-230.
- Garrison, D.W. & Foreman, R.D., 1994. Decreased activity of spontaneous and noxiously evoked dorsal horn cells during transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS). *Pain*, 58(3), p.309-315.

- Garrison, D.W. & Foreman, R.D., 1996. Effects of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) on spontaneous and noxiously evoked dorsal horn cell activity in cats with transected spinal cords. *Neurosci Letters*, 216(2), p.125-128.
- Géraud G, Denuelle M, Fabre N, Payoux P, Chollet F. 2005. Positron emission tomographic studies of migraine. *Rev Neurol*, 161(6-7), p.666-670.
- Gerard MW. 1923. Afferent impulses of the trigeminal nerve. The intramedullary course of the painful thermal and tactile impulses. *Arch Neurol Psychiatr*; 9: 306-38
- Giffin, N.J. & Kaube, Holger, 2002. The electrophysiology of migraine. *Cur Op Neurol*, 15(3), p.303-309.
- Goadsby, P J, 2001. Migraine, aura, and cortical spreading depression: why are we still talking about it? *Ann Neurol*, 49(1), p.4-6.
- Goadsby, P J & Edvinsson, L, 1993. The trigeminovascular system and migraine: studies characterizing cerebrovascular and neuropeptide changes seen in humans and cats. *Ann Neurol*, 33(1), p.48-56.
- Goadsby, P J, Edvinsson, L & Ekman, R., 1990. Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Ann Neurol*, 28(2), p.183-187.
- Goadsby, Peter J, Lipton, Richard B & Ferrari, Michel D, 2002. Migraine--current understanding and treatment. *N Eng J Med*, 346(4), p.257-270.
- 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(2), p.395-413.
- Goldstein, D.J. et al., 2001. Selective serotonin 1F (5-HT(1F)) receptor agonist LY334370 for acute migraine: a randomised controlled trial. *Lancet*, 358(9289), p.1230-1234.
- Gonçalves DA, Dal Fabbro AL, Campos JA, Bigal ME, Speciali JG. 2010. Symptoms of temporomandibular disorders in the population: an epidemiological study. *J Orofac Pain*, 24(3), p.270-278.

- Gorsky, M., Silverman, S., Jr & Chinn, H., 1991. Clinical characteristics and management outcome in the burning mouth syndrome. An open study of 130 patients. *Oral Sur, Oral Med Oral Pathol*, 72(2), p.192-195.
- Graham, S.H., Sharp, F.R. & Dillon, W., 1988. Intraoral sensation in patients with brainstem lesions: role of the rostral spinal trigeminal nuclei in pons. *Neurology*, 38(10), p.1529-1533.
- Gregg, J.M., 2000. Neuropathic complications of mandibular implant surgery: review and case presentations. *Ann R Aust Coll Dent Surg*, 15, p.176-180.
- Grudt, T.J. & Perl, E R, 2002. Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *J Physiol*, 540(Pt 1), p.189-207.
- Gunaydin, S. et al., 2006. Motor and occipital cortex excitability in migraine patients. *Can J Neurol Scis*. 33(1), p.63-67.
- Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X, Elde R. 1999. Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci*, 11(3), p.946-958.
- Guy N, Marques AR, Orliaguet T, Lanteri-Minet M, Dallel R, Clavelou P. 2010. Are there differences between cephalic and extracephalic cutaneous allodynia in migraine patients? *Cephalalgia*, 30(7), p.881-886.
- Hadjikhani N, Sanchez Del Rio M, Wu O, Schwartz D, Bakker D, Fischl B, Kwong KK, Cutrer FM, Rosen BR, Tootell RB, Sorensen AG, Moskowitz MA. 2001. Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex. *Proc Nat Acad Sci USA*, 98(8), p.4687-4692.
- Han, Z.S., Zhang, E.T. & Craig, A.D., 1998. Nociceptive and thermoreceptive lamina I neurons are anatomically distinct. *Nat Neurosci*, 1(3), p.218-225.
- Handwerker, H.O., Iggo, A. & Zimmermann, M, 1975. Segmental and supraspinal actions on dorsal horn neurons responding to noxious and non-noxious skin stimuli. *Pain*, 1(2), p.147-165.
- Hansen JM, Sitarz J, Birk S, Rahmann AM, Oturai PS, Fahrenkrug J, Olesen J, Ashina M.

2006. Vasoactive intestinal polypeptide evokes only a minimal headache in healthy volunteers. *Cephalalgia*, 26(8), p.992-1003.
- Hantman, A.W. & Perl, Edward R, 2005. Molecular and genetic features of a labeled class of spinal substantia gelatinosa neurons in a transgenic mouse. *J Comp Neurol*, 492(1), p.90-100.
- Hantman, A.W., van den Pol, A.N. & Perl, Edward R, 2004. Morphological and physiological features of a set of spinal substantia gelatinosa neurons defined by green fluorescent protein expression. *J Neurosci*, 24(4), p.836-842.
- Hao JX, Xu XJ, Yu YX, Seiger A, Wiesenfeld-Hallin Z.1992. Baclofen reverses the hypersensitivity of dorsal horn wide dynamic range neurons to mechanical stimulation after transient spinal cord ischemia; implications for a tonic GABAergic inhibitory control of myelinated fiber input. *J Neurophysiol*, 68(2), p.392-396.
- Harvey RJ, Depner UB, Wässle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K, Schütz B, Abo-Salem OM, Zimmer A, Poisbeau P, Welzl H, Wolfer DP, Betz H, Zeilhofer HU, Müller U. 2004. GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5672), p.884-887.
- Headache Classification Committee of the International Headache Society (2004) The international classification of headache disorders (second edition). *Cephalalgia* 24:1-160.
- Heinke B, Ruscheweyh R, Forsthuber L, Wunderbaldinger G, Sandkühler J. 2004. Physiological, neurochemical and morphological properties of a subgroup of GABAergic spinal lamina II neurones identified by expression of green fluorescent protein in mice. *J Physiol*, 560(Pt 1), p.249-266.
- Heinke, Bernhard, Gingl, E. & Sandkühler, Jürgen, 2011. Multiple targets of  $\mu$ -opioid receptor-mediated presynaptic inhibition at primary afferent A $\delta$ - and C-fibers. *J Neurosci*: 31(4), p.1313-1322.
- Heinricher MM, Tavares I, Leith JL, Lumb BM. 2009. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res Rev*, 60(1), p.214-225.

- Hentall, I.D. & Fields, H.L., 1979. Segmental and descending influences on intraspinal thresholds of single C-fibers. *J Neurophysiol*, 42(6), p.1527-1537.
- Hoffmann, K.D. & Matthews, M.A., 1990. Comparison of sympathetic neurons in orofacial and upper extremity nerves: implications for causalgia. *J Oral Maxillofacial Surg*, 48(7), p.720-726; discussion 727.
- Hösl K, Reinold H, Harvey RJ, Müller U, Narumiya S, Zeilhofer HU. 2006. Spinal prostaglandin E receptors of the EP2 subtype and the glycine receptor alpha3 subunit, which mediate central inflammatory hyperalgesia, do not contribute to pain after peripheral nerve injury or formalin injection. *Pain*, 126(1-3), p.46-53.
- Hossaini, M., French, P.J. & Holstege, J.C., 2007. Distribution of glycinergic neuronal somata in the rat spinal cord. *Brain Res*, 1142, p.61-69.
- Hu JW, Sessle BJ, Raboisson P, Dallel R, Woda A. 1992. Stimulation of craniofacial muscle afferents induces prolonged facilitatory effects in trigeminal nociceptive brain-stem neurones. *Pain*, 48(1), p.53-60.
- Hu, J.W., Woda, A & Sessle, B.J., 1999. Effects of pre-emptive local anaesthesia on tooth pulp deafferentation-induced neuroplastic changes in cat trigeminal brainstem neurones. *Arch Oral Biol*, 44(3), p.287-293.
- Hughes DI, Scott DT, Todd AJ, Riddell JS. 2003. Lack of evidence for sprouting of Abeta afferents into the superficial laminae of the spinal cord dorsal horn after nerve section. *J Neurosci*, 23(29), p.9491-9499.
- Hunt, S.P. & Mantyh, P.W., 2001. The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci*, 2(2), p.83-91.
- Hunt, S.P. & Rossi, J., 1985. Peptide- and non-peptide-containing unmyelinated primary afferents: the parallel processing of nociceptive information. *PhilosTransactions of the R Soc Lond B Biol Sci*, 308(1136), p.283-289.
- Hwang, J.H. & Yaksh, T.L., 1997. The effect of spinal GABA receptor agonists on tactile allodynia in a surgically-induced neuropathic pain model in the rat. *Pain*, 70(1), p.15-22.



- Ibuki T, Hama AT, Wang XT, Pappas GD, Sagen J. 1997. Loss of GABA-immunoreactivity in the spinal dorsal horn of rats with peripheral nerve injury and promotion of recovery by adrenal medullary grafts. *Neurosci*, 76(3), p.845-858.
- Iggo, A. & Andres, K.H., 1982. Morphology of Cutaneous Receptors. *Ann Rev Neurosci*, 5(1), p.1-31.
- Ikeda, H. et al., 2003. Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5610), p.1237-1240.
- Ikeda H, Heinke B, Ruscheweyh R, Sandkühler J. 2006. Synaptic amplifier of inflammatory pain in the spinal dorsal horn. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5780), p.1659-1662.
- Ikoma, M., Kohno, Tatsuro & Baba, H., 2007. Differential presynaptic effects of opioid agonists on Adelta- and C-afferent glutamatergic transmission to the spinal dorsal horn. *Anesthesiol*, 107(5), p.807-812.
- Indo, Y., 2001. Molecular basis of congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA): Mutations and polymorphisms in TRKA (NTRK1) gene encoding the receptor tyrosine kinase for nerve growth factor. *Human Mutation*, 18(6), p.462-471.
- Iversen, H.K., Olesen, J & Tfelt-Hansen, P., 1989. Intravenous nitroglycerin as an experimental model of vascular headache. Basic characteristics. *Pain*, 38(1), p.17-24.
- Izumi, H., 1999. Nervous control of blood flow in the orofacial region. *Pharmacol Therapeutics*, 81(2), p.141-161.
- Jakubowski M, Levy D, Kainz V, Zhang XC, Kosaras B, Burstein R. (2007) Sensitization of central trigeminovascular neurons: blockade by intravenous naproxen infusion. *Neurosci* 148(2):573-83. Epub 2007 Jul 25.
- Ji RR, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ. 2003. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci*, 26(12), p.696-705.
- Jonas, P., Bischofberger, J. & Sandkühler, J, 1998. Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5375), p.419-424.

- Jones TL, Sweitzer SM, Peters MC, Wilson SP, Yeomans DC. 2005. GABAB receptors on central terminals of C-afferents mediate intersegmental Adelta-afferent evoked hypoalgesia. *Eur J Pain*, 9(3), p.233-242.
- Julius, D. & Basbaum, A I, 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413(6852), p.203-210.
- Kaas JH (1996) The somatosensory cortex. In: Franzen O, Johansson, R.S., Terenius, L., editor. Somesthesia and the neurobiology of the somatosensory cortex. Basel:Birkhäuser. pp. 163-172).
- Kato G, Yasaka T, Katafuchi T, Furue H, Mizuno M, Iwamoto Y, Yoshimura M. 2006. Direct GABAergic and glycinergic inhibition of the substantia gelatinosa from the rostral ventromedial medulla revealed by in vivo patch-clamp analysis in rats. *J Neurosci*, 26(6), p.1787-1794.
- Keller AF, Beggs S, Salter MW, De Koninck Y. 2007. Transformation of the output of spinal lamina I neurons after nerve injury and microglia stimulation underlying neuropathic pain. *Mol Pain*, 3, p.27.
- 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(20), p.7871-7880.
- Kelman, L., 2007. The triggers or precipitants of the acute migraine attack. *Cephalalgia*, 27(5), p.394-402.
- Kenshalo, D.R., 1960. Comparison of thermal sensitivity of the forehead, lip, conjunctiva and cornea. *J Appl Physiol*, 15, p.987-991.
- Khayyat, G.F., Yu, U.J. & King, R.B., 1975. Response patterns to noxious and non-noxious stimuli in rostral trigeminal relay nuclei. *Brain Res*, 97(1), p.47-60.
- Kirsch, J. & Betz, H, 1998. Glycine-receptor activation is required for receptor clustering in spinal neurons. *Nature*, 392(6677), p.717-720.
- Knabl J, Witschi R, Hösl K, Reinold H, Zeilhofer UB, Ahmadi S, Brockhaus J, Sergejeva M, Hess A, Brune K, Fritschy JM, Rudolph U, Möhler H, Zeilhofer HU. 2008. Reversal

- of pathological pain through specific spinal GABAA receptor subtypes. *Nature*, 451(7176), p.330-334.
- Knight, Y.E. & Goadsby, P J, 2001. The periaqueductal grey matter modulates trigeminovascular input: a role in migraine? *Neurosci*, 106(4), p.793-800.
- Kohno T, Kumamoto E, Higashi H, Shimoji K, Yoshimura M. 1999. Actions of opioids on excitatory and inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord. *J Physiol*, 518 ( Pt 3), p.803-813.
- Koltzenburg, M. & Scadding, J., 2001. Neuropathic pain. *Cur Opin Neurol*, 14(5), p.641-647.
- Kontinen VK, Stanfa LC, Basu A, Dickenson AH, 2001. Electrophysiologic evidence for increased endogenous gabaergic but not glycinergic inhibitory tone in the rat spinal nerve ligation model of neuropathy. *Anesthesiol*, 94(2), p.333-339.
- Kraft B, Frickey NA, Kaufmann RM, Reif M, Frey R, Gustorff B, Kress HG. 2008. Lack of analgesia by oral standardized cannabis extract on acute inflammatory pain and hyperalgesia in volunteers. *Anesthesiol* 109(1), p.101-110.
- Kruuse C, Thomsen LL, Birk S, Olesen J. 2003. Migraine can be induced by sildenafil without changes in middle cerebral artery diameter. *Brain*, 126(Pt 1), p.241-247.
- Kullmann DM, Ruiz A, Rusakov DM, Scott R, Semyanov A, Walker MC. 2005. Presynaptic, extrasynaptic and axonal GABAA receptors in the CNS: where and why? *Prog Biophysics Mol Biology*, 87(1), p.33-46.
- Labrakakis C, Lorenzo LE, Bories C, Ribeiro-da-Silva A, De Koninck Y. 2009. Inhibitory coupling between inhibitory interneurons in the spinal cord dorsal horn. *Mol Pain*, 5, p.24.
- Labrakakis C, Tong CK, Weissman T, Torsney C, MacDermott AB. 2003. Localization and function of ATP and GABAA receptors expressed by nociceptors and other postnatal sensory neurons in rat. *J Physiol*, 549(Pt 1), p.131-142.
- Lagerström MC, Rogoz K, Abrahamsen B, Persson E, Reinius B, Nordenankar K, Olund C, Smith C, Mendez JA, Chen ZF, Wood JN, Wallén-Mackenzie A, Kullander K. 2010. VGLUT2-dependent sensory neurons in the TRPV1 population regulate pain and itch. *Neuron*, 68(3), p.529-542.

- Lamey, P.J. & Lewis, M.A., 1989. Oral medicine in practice: burning mouth syndrome. *Brit Dent J*, 167(6), p.197-200.
- Lapirot O, Melin C, Modolo A, Nicolas C, Messaoudi Y, Monconduit L, Artola A, Luccarini P, Dallel R. 2011. Tonic and phasic descending dopaminergic controls of nociceptive transmission in the medullary dorsal horn. *Pain*, 152(8), p.1821-1831.
- Lassen LH, Haderslev PA, Jacobsen VB, Iversen HK, Sperling B, Olesen J. 2002. CGRP may play a causative role in migraine. *Cephalalgia*, 22(1), p.54-61.
- Lassen, L.H., Thomsen, L L & Olesen, J, 1995. Histamine induces migraine via the H1-receptor. Support for the NO hypothesis of migraine. *Neuroreport*, 6(11), p.1475-1479.
- Latremoliere, A. & Woolf, Clifford J, 2009. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain*, 10(9), p.895-926.
- Lauritzen, M., 1994. Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain*, 117 ( Pt 1), p.199-210.
- Lazarov, N.E., 2002. Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. *Pro Neurobiol*, 66(1), p.19-59.
- Leao AAP, (1944) Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 7 :359-90
- Lee, K.H., Chung, J.M. & Willis, W.D., Jr, 1985. Inhibition of primate spinothalamic tract cells by TENS. *J Neurosur*, 62(2), p.276-287.
- Leise, E.M., 1990. Modular construction of nervous systems: a basic principle of design for invertebrates and vertebrates. *Brain Res.* 15(1), p.1-23.
- Levy, D. & Strassman, Andrew M, 2002. Mechanical response properties of A and C primary afferent neurons innervating the rat intracranial dura. *J Neurophysiol*, 88(6), p.3021-3031.

- Levy D, Jakubowski M, Burstein R (2004) Disruption of communication between peripheral and central trigeminovascular neurons mediates the antimigraine action of 5HT 1B/1D receptor agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(12):4274-9.
- Light, A.R. & Perl, E R, 1979. Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers. *J Comp Neurol*, 186(2), p.133-150.
- Light AR (1992) The organization of nociceptive neurons in the spinal grey matter. In: The initial processing of pain and its descending control: spinal and trigeminal systems, Chap 6, pp 109–150. Basel: Karger
- 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(1), p.53-71.
- Liu Y, Abdel Samad O, Zhang L, Duan B, Tong Q, Lopes C, Ji RR, Lowell BB, Ma Q. 2010. VGLUT2-dependent glutamate release from nociceptors is required to sense pain and suppress itch. *Neuron*, 68(3), p.543-556.
- Lobb, W.K., Zakariassen, K.L. & McGrath, P.J., 1996. Endodontic treatment outcomes: do patients perceive problems? *JADA (1939)*, 127(5), p.597-600.
- Löken LS, Wessberg J, Morrison I, McGlone F, Olausson H. 2009. Coding of pleasant touch by unmyelinated afferents in humans. *Nat Neurosci*, 12(5), p.547-548.
- Lopez-Garcia, J.A. & King, A.E., 1994. Membrane properties of physiologically classified rat dorsal horn neurons in vitro: correlation with cutaneous sensory afferent input. *Eur J Neurosci*, 6(6), p.998-1007.
- Lorente de No R. 1938. Cerebral cortex: architecture, intracortical connexions, motor projections. In: *Physiology of the nervous system* (Fulton JF, ed), pp 291–339. Oxford: Oxford UP
- Lu, Y. & Perl, Edward R, 2003. A specific inhibitory pathway between substantia gelatinosa neurons receiving direct C-fiber input. *J Neurosci*, 23(25), p.8752-8758.
- Lu, Y. & Perl, Edward R, 2005. Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II). *J Neurosci*, 25(15), p.3900-3907.

- Lu Y, Zheng J, Xiong L, Zimmermann M, Yang J. 2008. Spinal cord injury-induced attenuation of GABAergic inhibition in spinal dorsal horn circuits is associated with down-regulation of the chloride transporter KCC2 in rat. *J Physiol*, 586(Pt 23), p.5701-5715.
- Lynn, B., 1991. Silent' nociceptors in the skin. *Trends Neurosci*, 14(3), p.95.
- Malmberg, A.B., Brandon, E.P., et al., 1997. Diminished inflammation and nociceptive pain with preservation of neuropathic pain in mice with a targeted mutation of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Neurosci*, 17(19), p.7462-7470.
- Malmberg, A.B., Chen, C., et al., 1997. Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKCgamma. *Science (New York, N.Y.)*, 278(5336), p.279-283.
- Marfurt, C.F., 1981. The somatotopic organization of the cat trigeminal ganglion as determined by the horseradish peroxidase technique. *Anat Record*, 201(1), p.105-118.
- Marfurt, C.F. & Rajchert, D.M., 1991. Trigeminal primary afferent projections to « non-trigeminal » areas of the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, 303(3), p.489-511.
- Martin DL and Olsen RW, 2000. GABA in the Nervous System: The View at 50 Years. Lippincott, Williams & Wilkins, New York
- Marvizón JC, Martínez V, Grady EF, Bunnett NW, Mayer EA .1997. Neurokinin 1 receptor internalization in spinal cord slices induced by dorsal root stimulation is mediated by NMDA receptors. *J Neurosci*, 17(21), p.8129-8136.
- Matthews, B., 1989. Autonomic mechanisms in oral sensations. *Proc Fin Dent So.* 85(4-5), p.365-373.
- 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(Pt 2), p.521-533.
- May, A. & Goadsby, P J, 1999. The trigeminovascular system in humans: pathophysiologic implications for primary headache syndromes of the neural influences on the cerebral circulation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19(2), p.115-127.

- McGlone F, Vallbo AB, Olausson H, Loken L, Wessberg J. 2007. Discriminative touch and emotional touch. *Can J Exp Psychol* 61(3), p.173-183.
- McMahon, G., 1998. Phantom limb pain following amputation. *Paediatric Nurs* 10(6), p.22-25.
- Melnick, I.V., Santos, S.F.A. & Safronov, B.V., 2004. Mechanism of spike frequency adaptation in substantia gelatinosa neurones of rat. *J Physiol*, 559(Pt 2), p.383-395.
- Melnick, I.V., Santos, S.F.A., Szokol, K., et al., 2004. Ionic basis of tonic firing in spinal substantia gelatinosa neurons of rat. *J Neurophysiol*, 91(2), p.646-655.
- Melzack, R. & Wall, P.D., 1965. Pain mechanisms: a new theory. *Science (New York, N.Y.)*, 150(699), p.971-979.
- Miletic, G. & Miletic, V., 2008. Loose ligation of the sciatic nerve is associated with TrkB receptor-dependent decreases in KCC2 protein levels in the ipsilateral spinal dorsal horn. *Pain*, 137(3), p.532-539.
- Millan, 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, 57(1), p.1-164.
- Millan, 2002. Descending control of pain. *Prog Neurobiol*, 66(6), p.355-474.
- Miraucourt, L.S., Dallel, Radhouane & Voisin, D.L., 2007. Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through PKCgamma interneurons. *PloS One*, 2(11), p.e1116.
- Miraucourt LS, Moisset X, Dallel R, Voisin DL. 2009. Glycine inhibitory dysfunction induces a selectively dynamic, morphine-resistant, and neurokinin 1 receptor-independent mechanical allodynia. *J Neurosci*: 29(8), p.2519-2527.
- Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ. 2002. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci*, 22(15), p.6724-6731.
- Mountcastle, V.B., 1957. Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *J Neurophysiol*, 20(4), p.408-434.
- Müller, F., Heinke, B & Sandkühler, J, 2003. Reduction of glycine receptor-mediated miniature inhibitory postsynaptic currents in rat spinal lamina I neurons after peripheral inflammation. *Neurosci*, 122(3), p.799-805.

- Müller, L.J., Pels, L. & Vrensen, G.F., 1996. Ultrastructural organization of human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37(4), p.476-488.
- Naef M, Curatolo M, Petersen-Felix S, Arendt-Nielsen L, Zbinden A, Brenneisen R. 2003. The analgesic effect of oral delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), morphine, and a THC-morphine combination in healthy subjects under experimental pain conditions. *Pain*, 105(1-2), p.79-88.
- Nagy, J.I. & Hunt, S.P., 1982. Fluoride-resistant acid phosphatase-containing neurones in dorsal root ganglia are separate from those containing substance P or somatostatin. *Neurosci*, 7(1), p.89-97.
- Narikawa K, Furue H, Kumamoto E, Yoshimura M. 2000. In vivo patch-clamp analysis of IPSCs evoked in rat substantia gelatinosa neurons by cutaneous mechanical stimulation. *J Neurophysiol*, 84(4), p.2171-2174.
- Neumann S, Braz JM, Skinner K, Llewellyn-Smith IJ, Basbaum AI. 2008. Innocuous, not noxious, input activates PKC $\gamma$  interneurons of the spinal dorsal horn via myelinated afferent fibers. *J Neurosci*, 28(32), p.7936-7944.
- Nichols FT 3rd, Mawad M, Mohr JP, Stein B, Hilal S, Michelsen WJ. 1990. Focal headache during balloon inflation in the internal carotid and middle cerebral arteries. *Stroke* 21(4), p.555-559.
- Nishimori T, Sera M, Suemune S, Yoshida A, Tsuru K, Tsuiki Y, Akisaka T, Okamoto T, Dateoka Y, Shigenaga Y. 1986. The distribution of muscle primary afferents from the masseter nerve to the trigeminal sensory nuclei. *Brain Res*, 372(2), p.375-381.
- Olausson, P., Jentsch, J.D. & Taylor, J.R., 2003. Repeated nicotine exposure enhances reward-related learning in the rat. *Neuropsychopharmacology*, 28(7), p.1264-1271.
- Olesen J, Tfelt-Hansen P, Henriksen L, Larsen B. 1981. The common migraine attack may not be initiated by cerebral ischaemia. *Lancet*, 2(8244), p.438-440.
- Oliva AA Jr, Jiang M, Lam T, Smith KL, Swann JW. 2000. Novel hippocampal interneuronal subtypes identified using transgenic mice that express green fluorescent protein in GABAergic interneurons. *J Neurosci*, 20(9), p.3354-3368.



- Olsen, R.W. & Sieghart, W., 2008. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev*, 60(3), p.243-260.
- Pajot J, Pelissier T, Sierralta F, Raboisson P, Dallel R. 2000. Differential effects of trigeminal tractotomy on Adelta- and C-fiber-mediated nociceptive responses. *Brain Res*, 863(1-2), p.289-292.
- Pajot J, Resson C, Ngom I, Woda A. 2003. Gonadectomy induces site-specific differences in nociception in rats. *Pain*, 104(1-2), p.367-373.
- Panneton, W.M., 1991. Primary afferent projections from the upper respiratory tract in the muskrat. *J Comp Neurol*, 308(1), p.51-65.
- Panneton, W.M., Johnson, S.N. & Christensen, N.D., 1994. Trigeminal projections to the peribrachial region in the muskrat. *Neurosci*, 58(3), p.605-625.
- Pantelev S, Sokolov AY, Amelinn KV, Ignatov YD. 2005. Responses of neurons in the spinal nucleus of the trigeminal nerve to electrical stimulation of the dura mater of the rat brain. *Neurosc Behav Physiol*, 35(5), p.555-559.
- Pearson, A.A., 1952. Role of gelatinous substance of spinal cord in conduction of pain. *A.M.A.* 68(4), p.515-529.
- Perl ER (1984) Pain and nociception. In: Handbook of physiology. The nervous system, Vol 3 (Darian-Smith I, ed), pp 915–975.
- Pernía-Andrade AJ, Kato A, Witschi R, Nyilas R, Katona I, Freund TF, Watanabe M, Filitz J, Koppert W, Schüttler J, Ji G, Neugebauer V, Marsicano G, Lutz B, Vanegas H, Zeilhofer HU., 2009. Spinal endocannabinoids and CB1 receptors mediate C-fiber-induced heterosynaptic pain sensitization v. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5941), p.760-764.
- Petersen KA, Birk S, Kitamura K, Olesen J. 2009. Effect of adrenomedullin on the cerebral circulation: relevance to primary headache disorders. *Cephalalgia*, 29(1), p.23-30.
- Pietrobon, D. & Striessnig, J., 2003. Neurobiology of migraine. *Nat Rev Neurosci*, 4(5), p.386-398.

- Polgár E, Hughes DI, Riddell JS, Maxwell DJ, Puskár Z, Todd AJ. 2003. Selective loss of spinal GABAergic or glycinergic neurons is not necessary for development of thermal hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Pain*, 104(1-2), p.229-239.
- Polgár E, Gray S, Riddell JS, Todd AJ. 2004. Lack of evidence for significant neuronal loss in laminae I-III of the spinal dorsal horn of the rat in the chronic constriction injury model. *Pain*, 111(1-2), p.144-150.
- Polgár E, Hughes DI, Arham AZ, Todd . 2005. Loss of neurons from laminae I-III of the spinal dorsal horn is not required for development of tactile allodynia in the spared nerve injury model of neuropathic pain. *J Neurosci*, 25(28), p.6658-6666.
- Polycarpou N, Ng YL, Canavan D, Moles DR, Gulabivala K. 2005. Prevalence of persistent pain after endodontic treatment and factors affecting its occurrence in cases with complete radiographic healing. *Int EndoJ*, 38(3), p.169-178.
- Prescott, S.A. & De Koninck, Yves, 2002. Four cell types with distinctive membrane properties and morphologies in lamina I of the spinal dorsal horn of the adult rat. *J Physiol*, 539(Pt 3), p.817-836.
- Price, G.W., Kelly, J.S. & Bowery, N.G., 1987. The location of GABAB receptor binding sites in mammalian spinal cord. *Synapse (New York, N.Y.)*, 1(6), p.530-538.
- Price GW, Wilkin GP, Turnbull MJ, Bowery NG. 1984. Are baclofen-sensitive GABAB receptors present on primary afferent terminals of the spinal cord? *Nature*, 307(5946), p.71-74.
- Price, T.J., Hargreaves, K.M. & Cervero, Fernando, 2006. Protein expression and mRNA cellular distribution of the NKCC1 cotransporter in the dorsal root and trigeminal ganglia of the rat. *Brain Res*, 1112(1), p.146-158.
- Raboisson, P., Dallel, R & Woda, A, 1989. Responses of neurones in the ventrobasal complex of the thalamus to orofacial noxious stimulation after large trigeminal tractotomy. *Ex Brain Res*. 77(3), p.569-576.
- Raskin, N.H., Hosobuchi, Y. & Lamb, S., 1987. Headache may arise from perturbation of brain. *Headache*, 27(8), p.416-420.

- Rasmussen, B.K., 2001. Epidemiology of headache. *Cephalalgia*, 21(7), p.774-777.
- Reeve, A.J., Dickenson, A H & Kerr, N.C., 1998. Spinal effects of bicuculline: modulation of an allodynia-like state by an A1-receptor agonist, morphine, and an NMDA-receptor antagonist. *J Neurophysiol*, 79(3), p.1494-1507.
- Reichling DB, Kyrozis A, Wang J, MacDermott AB. 1994. Mechanisms of GABA and glycine depolarization-induced calcium transients in rat dorsal horn neurons. *J Physiol*, 476(3), p.411-421.
- Reinold H, Ahmadi S, Depner UB, Layh B, Heindl C, Hamza M, Pahl A, Brune K, Narumiya S, Müller U, Zeilhofer HU. 2005. Spinal inflammatory hyperalgesia is mediated by prostaglandin E receptors of the EP2 subtype. *J Clin Invest*, 115(3), p.673-679.
- Rexed, B., 1952. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol*, 96(3), p.414-495.
- Ribeiro-Da-Silva, A., Castro-Lopes, J.M. & Coimbra, A., 1986. Distribution of glomeruli with fluoride-resistant acid phosphatase (FRAP)-containing terminals in the substantia gelatinosa of the rat. *Brain Res*, 377(2), p.323-329.
- Ribeiro-da-Silva (2003) Substantia gelatinosa of the spinal cord. In: Paxinos G, editor. The rat nervous system. Sydney: Academic Press
- Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K. 1999. The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature*, 397(6716), p.251-255.
- Roberts, L.A., Beyer, C. & Komisaruk, B.R., 1986. Nociceptive responses to altered GABAergic activity at the spinal cord. *Life Sciences*, 39(18), p.1667-1674.
- Robinson, P.P. & Smith, K.G., 1996. Lingual nerve damage during lower third molar removal: a comparison of two surgical methods. *Bri Dental J*, 180(12), p.456-461.
- Ross SE, Mardinly AR, McCord AE, Zurawski J, Cohen S, Jung C, Hu L, Mok SI, Shah A, Savner EM, Tolias C, Corfas R, Chen S, Inquimbert P, Xu Y, McInnes RR, Rice FL, Corfas G, Ma Q, Woolf CJ, Greenberg ME. 2010. Loss of inhibitory interneurons in

- the dorsal spinal cord and elevated itch in *Bhlhb5* mutant mice. *Neuron*, 65(6), p.886-898.
- Rózsa, A.J. & Beuerman, R.W., 1982. Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit. *Pain*, 14(2), p.105-120.
- Rudomin, P. & Schmidt, R.F., 1999. Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Experimental Brain Res.* 129(1), p.1-37.
- Ruscheweyh, R. & Sandkühler, Jürgen, 2002. Lamina-specific membrane and discharge properties of rat spinal dorsal horn neurones in vitro. *J Physiol*, 541(Pt 1), p.231-244.
- Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S, Bonventre JV, Woolf CJ. 2001. Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature*, 410(6827), p.471-475.
- Sarchielli P, Alberti A, Codini M, Floridi A, Gallai V. 2000. Nitric oxide metabolites, prostaglandins and trigeminal vasoactive peptides in internal jugular vein blood during spontaneous migraine attacks. *Cephalalgia*, 20(10), p.907-918.
- Scheibel, M.E. & Scheibel, A.B., 1968. Terminal axonal patterns in cat spinal cord. II. The dorsal horn. *Brain Res*, 9(1), p.32-58.
- Schepelmann K, Ebersberger A, Pawlak M, Oppmann M, Messlinger K. 1999. Response properties of trigeminal brain stem neurons with input from dura mater encephali in the rat. *Neurosci*, 90(2), p.543-554.
- Schmelz, M., 2001. A neural pathway for itch. *Nat Neurosci*, 4(1), p.9-10.
- Schmelz M, Schmidt R, Bickel A, Handwerker HO, Torebjörk HE. 1997. Specific C-receptors for itch in human skin. *J Neurosci* : 17(20), p.8003-8008.
- Schmidt R, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Torebjörk E, Handwerker H. 1995. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci*: 15(1 Pt 1), p.333-341.
- Schneider, S.P., 1992. Functional properties and axon terminations of interneurons in laminae III-V of the mammalian spinal dorsal horn in vitro. *J Neurophysiol*, 68(5), p.1746-1759.

- Scholz J, Broom DC, Youn DH, Mills CD, Kohno T, Suter MR, Moore KA, Decosterd I, Coggeshall RE, Woolf CJ. 2005. Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. *J Neurosci*, 25(32), p.7317-7323.
- Seagrove, L.C., Suzuki, R. & Dickenson, Anthony H, 2004. Electrophysiological characterisations of rat lamina I dorsal horn neurones and the involvement of excitatory amino acid receptors. *Pain*, 108(1-2), p.76-87.
- Seal RP, Wang X, Guan Y, Raja SN, Woodbury CJ, Basbaum AI, Edwards RH. 2009. Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature*, 462(7273), p.651-655.
- Sessle, B.J. & Greenwood, L.F., 1976. Inputs to trigeminal brain stem neurones from facial, oral, tooth pulp and pharyngolaryngeal tissues: I. Responses to innocuous and noxious stimuli. *Brain Res*, 117(2), p.211-226.
- Sessle, B.J. & Hu, J.W., 1991. Mechanisms of pain arising from articular tissues. *Can J Physiol Pharmacol*, 69(5), p.617-626.
- Sessle B.J. and Hu,J.W. and Yu,X.M. 1993. Brainstem. Mechanisms of referred pain and hyperalgesia in the orofacial and temporomandibular region. In : New trends in referred pain and hyperalgesia, pain research and clinical management, edited by L. Vecchiet, D. AlbeFessard and U. Lindblom. Amsterdam : ,p. 59-71
- Sherman, S.E. & Loomis, C.W., 1996. Strychnine-sensitive modulation is selective for non-noxious somatosensory input in the spinal cord of the rat. *Pain*, 66(2-3), p.321-330.
- Shigenaga Y, Sera M, Nishimori T, Suemune S, Nishimura M, Yoshida A, Tsuru K. 1988. The central projection of masticatory afferent fibers to the trigeminal sensory nuclear complex and upper cervical spinal cord. *J Comp Neurol*, 268(4), p.489-507.
- Silverman, J.D. & Kruger, L., 1988. Lectin and neuropeptide labeling of separate populations of dorsal root ganglion neurons and associated « nociceptor » thin axons in rat testis and cornea whole-mount preparations. *Somatos Res*, 5(3), p.259-267.
- Siniatchkin M, Gerber WD, Kropp P, Vein A. 1999. How the brain anticipates an attack: a study of neurophysiological periodicity in migraine. *Funct Neurol*, 14(2), p.69-77.

- Sivilotti, L. & Woolf, C J, 1994a. The contribution of GABAA and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. *J Neurophysiol*, 72(1), p.169-179.
- Sivilotti, L. & Woolf, C J, 1994b. The contribution of GABAA and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. *J Neurophysiol*, 72(1), p.169-179.
- Sjölund, B.H., 1985. Peripheral nerve stimulation suppression of C-fiber-evoked flexion reflex in rats. Part 1: Parameters of continuous stimulation. *J Neurosurg*, 63(4), p.612-616.
- Sjölund, B.H., 1988. Peripheral nerve stimulation suppression of C-fiber-evoked flexion reflex in rats. Part 2: Parameters of low-rate train stimulation of skin and muscle afferent nerves. *J Neurosurg*, 68(2), p.279-283.
- Sjöqvist O. 1939 Studies on pain conduction in the trigeminal nerve contribution to surgical treatment of facial pain. *Acta Psychiatr Scand* ; 17 : 1-139
- Slugg, R.M., Meyer, R.A. & Campbell, J.N., 2000. Response of cutaneous A- and C-fiber nociceptors in the monkey to controlled-force stimuli. *J Neurophysiol*, 83(4), p.2179-2191.
- Snider, W.D. & McMahon, S.B., 1998. Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron*, 20(4), p.629-632.
- Sorkin, L.S. & Puig, S., 1996. Neuronal model of tactile allodynia produced by spinal strychnine: effects of excitatory amino acid receptor antagonists and a mu-opiate receptor agonist. *Pain*, 68(2-3), p.283-292.
- Sorkin, L.S., Puig, S. & Jones, D.L., 1998. Spinal bicuculline produces hypersensitivity of dorsal horn neurons: effects of excitatory amino acid antagonists. *Pain*, 77(2), p.181-190.
- Spike RC, Puskár Z, Andrew D, Todd AJ. 2003. A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord. *Eur J Neurosci*, 18(9), p.2433-2448.

- Steiner TJ, Scher AI, Stewart WF, Kolodner K, Liberman J, Lipton RB. 2003. The prevalence and disability burden of adult migraine in England and their relationships to age, gender and ethnicity. *Cephalalgia*: 23(7), p.519-527.
- Stewart, W.F. & Lipton, R B, 1995. International comparisons in migraine epidemiology. *Cephalalgia*, 15(6), p.449-450.
- Stewart WF, Lipton RB, Celentano DD, Reed ML. 1992. Prevalence of migraine headache in the United States. Relation to age, income, race, and other sociodemographic factors. *JAMA*, 267(1), p.64-69.
- Strassman, A, Raymond, S.A. & Burstein, R, 1996. Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches. *Nature*, 384(6609), p.560-564.
- Strassman AM, Weissner W, Williams M, Ali S, Levy D. 2004. Axon diameters and intradural trajectories of the dural innervation in the rat. *J Comp Neurol*, 473(3), p.364-376.
- Sugiura, Y., Terui, N. & Hosoya, Y., 1989. Difference in distribution of central terminals between visceral and somatic unmyelinated (C) primary afferent fibers. *J Neurophysiol*, 62(4), p.834-840.
- Sung KW, Kirby M, McDonald MP, Lovinger DM, Delpire E. 2000. Abnormal GABAA receptor-mediated currents in dorsal root ganglion neurons isolated from Na-K-2Cl cotransporter null mice. *The Journal of Neurosci*, 20(20), p.7531-7538.
- Szentagothai, j., 1964. Neuronal and synaptic arrangement in the substantia gelatinosa rolandi. *J Comp Neurol*, 122, p.219-239.
- Takazawa, T. & MacDermott, Amy B, 2010. Glycinergic and GABAergic tonic inhibition fine tune inhibitory control in regionally distinct subpopulations of dorsal horn neurons. *J Physiol*, 588(Pt 14), p.2571-2587.
- Tal, M. & Devor, M., 1992. Ectopic discharge in injured nerves: comparison of trigeminal and somatic afferents. *Brain Res*, 579(1), p.148-151.
- Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J, Obata K, Kaneko T. 2003. Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J Comp Neurol*, 467(1), p.60-79.

- Tammiala-Salonen, T., Hiidenkari, T. & Parvinen, T., 1993. Burning mouth in a Finnish adult population. *Community Dent Oral Epidemiol*, 21(2), p.67-71.
- Thomson, A.M., West, D.C. & Headley, P.M., 1989. Membrane Characteristics and Synaptic Responsiveness of Superficial Dorsal Horn Neurons in a Slice Preparation of Adult Rat Spinal Cord. *Eur J Neurosci*, 1(5), p.479-488.
- Todd, A J & McKenzie, J., 1989. GABA-immunoreactive neurons in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neurosci*, 31(3), p.799-806.
- Todd, A J & Spike, R.C., 1993. The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal horn. *Prog Neurobiol*, 41(5), p.609-645.
- Todd, A J & Sullivan, A.C., 1990. Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol*, 296(3), p.496-505.
- Todd, Andrew J, 2010. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci*, 11(12), p.823-836.
- Torsney, C. & MacDermott, Amy B, 2006. Disinhibition opens the gate to pathological pain signaling in superficial neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord. *J Neurosci*, 26(6), p.1833-1843.
- Towers S, Princivalle A, Billinton A, Edmunds M, Bettler B, Urban L, Castro-Lopes J, Bowery NG. 2000. GABAB receptor protein and mRNA distribution in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Eu J Neurosci*, 12(9), p.3201-3210.
- Trang T, Beggs S, Wan X, Salter MW. 2009. P2X4-receptor-mediated synthesis and release of brain-derived neurotrophic factor in microglia is dependent on calcium and p38-mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurosci*, 29(11), p.3518-3528.
- Treede, R.D. & Magerl, W., 2000. Multiple mechanisms of secondary hyperalgesia. *Prog Brain Res*, 129, p.331-341.
- Trowbridge HO, Franks M, Korostoff E, Emling R. 1980. Sensory response to thermal stimulation in human teeth. *J Endodontics*, 6(1), p.405-412.



- Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, Inoue K. 2003. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*, 424(6950), p.778-783.
- Valmaseda-Castellón, E., Berini-Aytés, L. & Gay-Escoda, C., 2000. Lingual nerve damage after third lower molar surgical extraction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 90(5), p.567-573.
- Weiller C, May A, Limmroth V, Jüptner M, Kaube H, Schayck RV, Coenen HH, Diener HC. 1995. Brain stem activation in spontaneous human migraine attacks. *Nat Med*, 1(7), p.658-660.
- Welch KM, Cao Y, Aurora S, Wiggins G, Vikingstad EM. 1998. MRI of the occipital cortex, red nucleus, and substantia nigra during visual aura of migraine. *Neurology*, 51(5), p.1465-1469.
- Wessberg J, Olausson H, Fernström KW, Vallbo AB. 2003. Receptive field properties of unmyelinated tactile afferents in the human skin. *J Neurophys*, 89(3), p.1567-1575.
- Williamson DJ, Hill RG, Shephard SL, Hargreaves RJ. 2001. The anti-migraine 5-HT(1B/1D) agonist rizatriptan inhibits neurogenic dural vasodilation in anaesthetized guinea-pigs. *Br J Pharmacol* 133(7), p.1029-1034.
- Willis, W.D., Jr, 1999. Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double-edged sword. *Exp Brain Res*. 124(4), p.395-421.
- Willis WD, Coggeshall RE. 2004. *Sensory Mechanisms of the Spinal Cord*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers,
- Witschi R, Punnakkal P, Paul J, Walczak JS, Cervero F, Fritschy JM, Kuner R, Keist R, Rudolph U, Zeilhofer HU. 2011. Presynaptic alpha2-GABAA receptors in primary afferent depolarization and spinal pain control. *J Neurosci*, 31(22), p.8134-8142.
- Woda A, Blanc O, Voisin DL, Coste J, Molat JL, Luccarini P. 2004. Bidirectional modulation of windup by NMDA receptors in the rat spinal trigeminal nucleus. *Eur J Neurosci*, 19(8), p.2009-2016.

- Wojcik SM, Katsurabayashi S, Guillemin I, Friauf E, Rosenmund C, Brose N, Rhee JS. 2006. A shared vesicular carrier allows synaptic corelease of GABA and glycine. *Neuron*, 50(4), p.575-587.
- Woods, R.P., Iacoboni, M. & Mazziotta, J.C., 1994. Brief report: bilateral spreading cerebral hypoperfusion during spontaneous migraine headache. *N Engl J Med*, 331(25), p.1689-1692.
- Wolff HG, Tunis MM, Goodell H. Studies on migraine. 1963. *Arch Intern Med* 1953;92:478–484; Wolff HG. Headache and other head pain. New York, NY: Oxford University Press,
- Woolf CJ, Barrett GD, Mitchell D, Myers RA. 1977. Naloxone-reversible peripheral electroanalgesia in intact and spinal rats. *Eur J Pharmacol*, 45(3), p.311-314.
- Woolf, C J, Mitchell, D. & Barrett, G.D., 1980. Antinociceptive effect of peripheral segmental electrical stimulation in the rat. *Pain*, 8(2), p.237-252.
- Woolf, C J, 1987. Central terminations of cutaneous mechanoreceptive afferents in the rat lumbar spinal cord. *J Comp Neurol*, 261(1), p.105-119.
- Woolf, C J, 1983. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature*, 306(5944), p.686-688.
- Woolf, Clifford J, 2007. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci*, 10(11), p.1361-1368.
- Yaksh, T.L., 1989. Behavioral and autonomic correlates of the tactile evoked allodynia produced by spinal glycine inhibition: effects of modulatory receptor systems and excitatory amino acid antagonists. *Pain*, 37(1), p.111-123.
- Yaksh, T.L., Yeung, J.C. & Rudy, T.A., 1976. Systematic examination in the rat of brain sites sensitive to the direct application of morphine: observation of differential effects within the periaqueductal gray. *Brain Res*, 114(1), p.83-103.
- Yasaka T, Kato G, Furue H, Rashid MH, Sonohata M, Tamae A, Murata Y, Masuko S, Yoshimura M. 2007. Cell-type-specific excitatory and inhibitory circuits involving primary afferents in the substantia gelatinosa of the rat spinal dorsal horn in vitro. *J Physiol*, 581(Pt 2), p.603-618.

- Yoshimura, M & Nishi, S., 1995. Primary afferent-evoked glycine- and GABA-mediated IPSPs in substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord in vitro. *J Physiol*, 482 (Pt 1), p.29-38.
- Yu, X.M., Sessle, B.J. & Hu, J.W., 1993. Differential effects of cutaneous and deep application of inflammatory irritant on mechanoreceptive field properties of trigeminal brain stem nociceptive neurons. *J Neurophysiol* 70(4), p.1704-1707.
- Zhang X, Levy D, Nosedá R, Kainz V, Jakubowski M, Burstein R (2010) Activation of meningeal nociceptors by cortical spreading depression: implications for migraine with aura. *J Neurosci*. 30(26):8807-14.
- Zeilhofer H , 2005. The glycinergic control of spinal pain processing. *Cell Mol Life Sci: CMLS*, 62(18), p.2027-2035.
- Zeilhofer H 2010. Spinal cannabinoids--a double-edged sword? (Commentary on Zhang et al.). *Eur J Neurosci*, 31(2), p.223-224.
- Zeilhofer H, Möhler H. & Di Lio, A., 2009. GABAergic analgesia: new insights from mutant mice and subtype-selective agonists. *Trends Pharmacol Sci*, 30(8), p.397-402.
- Zhang G, Chen W, Lao L, Marvizón JC. 2010. Cannabinoid CB1 receptor facilitation of substance P release in the rat spinal cord, measured as neurokinin 1 receptor internalization. *Eur J Neurosci*, 31(2), p.225-237.
- Zhang X, Levy D, Nosedá R, Kainz V, Jakubowski M, Burstein R. 2010. Activation of meningeal nociceptors by cortical spreading depression: implications for migraine with aura. *J Neurosci*: 30(26), p.8807-8814.
- Zieglgänsberger, W. & Herz, A., 1971. Changes of cutaneous receptive fields of spino-cervical-tract neurones and other dorsal horn neurones by microelectrophoretically administered amino acids. *Exp Brain Res.* 13(2), p.111-126.
- Zwetsloot, C.P., Caekebeke, J.F. & Ferrari, M D, 1993. Lack of asymmetry of middle cerebral artery blood velocity in unilateral migraine. *Stroke*, 24(9), p.1335-1338.

# Céline MELIN - ROLE DE L'INHIBITION SEGMENTAIRE DANS LE TRAITEMENT DE L'INFORMATION NOCICEPTIVE CUTANÉE ET MÉNINGÉE DANS LE COMPLEXE TRIGÉMINAL.

## Résumé :

Une réduction de l'inhibition segmentaire contribue vraisemblablement à l'hypersensibilité douloureuse persistante – qui se manifeste par l'hyperalgie, l'allodynie, et la douleur spontanée – au cours d'états douloureux chroniques. L'association fréquente d'une allodynie avec la migraine – une céphalée épisodique – suggère qu'une perte de l'inhibition synaptique contribue aussi à la manifestation de la douleur migraineuse. Cependant, la grande prévalence de la migraine – plus de 10% de la population générale – soulève la question de savoir si le traitement des informations méningées par le réseau neuronal – associant interneurons excitateurs et inhibiteurs – dans le complexe trigéminale, premier relais sur les voies nociceptives de la face et des méninges, est le même que celui des autres informations, par exemple cutanées.

Nous avons caractérisé l'effet du blocage pharmacologique des récepteurs à la glycine (GlyR) et des récepteurs GABA<sub>A</sub> (GABA<sub>A</sub>R) sur la transmission synaptique entre fibres afférentes primaires, cutanées ou méningées, et neurones de second ordre en enregistrant des potentiels de champ dans le sous-noyau caudal superficiel (Sp5C).

- Une stimulation électrique transcutanée évoque trois potentiels de champ négatifs dus à l'activation, du plus précoce au plus tardif, de fibres afférentes primaires de type A $\beta$ , A $\delta$  et C. Bloquer les GlyRs et/ou GABA<sub>A</sub>Rs segmentaires facilite les potentiels de champ polysynaptiques excitateurs évoqués par l'activation des fibres afférentes primaires de type A et, au contraire, inhibe, ou même abolit, les potentiels de champ C. Bloquer les récepteurs GABA<sub>B</sub> (GABA<sub>B</sub>R) segmentaires prévient cette suppression. Il est intéressant de noter que bloquer les GABA<sub>B</sub>Rs, potentialise aussi les potentiels de champ C en condition contrôle.

- Une stimulation électrique méningée évoque deux potentiels de champ négatifs dus à l'activation, du plus précoce au plus tardif, des fibres afférentes primaires de type A $\delta$  et C. Au contraire du potentiel de champ C cutané, le potentiel de champ C méningé est potentialisé après blocage des GlyRs et/ou GABA<sub>A</sub>Rs segmentaires.

Ces résultats démontrent que le traitement des informations cutanées et méningées par le Sp5C est différent. Seule l'activation des fibres afférentes primaires cutanées de type A inhibe les inputs cutanés de type C vers le Sp5C par l'intermédiaire d'un circuit polysynaptique excitateur, d'interneurones GABAergiques de dernier ordre et de GABA<sub>B</sub>Rs présynaptiques. La théorie du 'gate control' postule que l'activité des afférences non-nociceptives ferme la porte à la transmission des inputs nociceptifs vers les centres supérieurs. Nos résultats suggèrent que l'état de la porte dépend de l'activité non seulement dans les fibres afférentes primaires de type A mais aussi dans les circuits polysynaptiques excitateurs de la corne dorsale.

## Abstract :

Pathological disruption of segmental inhibition is thought to contribute to persistent pain hypersensitivity – including hyperalgesia, allodynia and spontaneous pain – that occurs during chronic pain states. That allodynia is also often associated with migraine – an episodic headache – suggests that a loss of synaptic inhibition is also involved in the manifestation of headache pain. However, the very high prevalence of migraine – more than 10% of the general population – raises the question as to whether processing of meningeous inputs by local neuronal network – consisting of excitatory and inhibitory interneurons – within the trigeminal nucleus, the first relay station for incoming nociceptive signals of the face and meninges, is the same as that of others, for instance cutaneous.

We sought to characterize how pharmacological blockade of glycine and GABA<sub>A</sub> receptors modifies synaptic transmission between either cutaneous or meningeous primary afferent fibers and second order neurons by recording field potentials in the rat superficial medullary dorsal horn (MDH).

- Transcutaneous electrical stimulation evokes three negative field potentials elicited by, from the earliest to the latest, A $\beta$ -, A $\delta$ - and C-fiber primary afferents. Blocking segmental glycine and/or GABA<sub>A</sub> receptors strongly facilitates A-fiber-activated polysynaptic excitatory field potentials but, conversely, inhibits, or even abolishes, C-fiber field potentials. Blocking segmental GABA<sub>B</sub> receptors reverses such suppression. Interestingly, it also potentiates C-fiber field potentials under control conditions.

- Meningeal electrical stimulation evokes two negative field potentials elicited by, from the earliest to the latest, A $\delta$ - and C-fiber primary afferents. Unlike cutaneous C-fiber field potentials, meningeal ones are facilitated by blocking segmental glycine and/or GABA<sub>A</sub> receptors.

These results demonstrate that MDH processing of cutaneous and meningeal inputs are different. Only activation of cutaneous A-fiber primary afferents inhibits cutaneous C-fiber inputs to the MDH by the way of polysynaptic excitatory pathways, last-order GABAergic interneurons and presynaptic GABA<sub>B</sub> receptors. In view of the gate control theory postulating that afferent volleys in non-nociceptive afferents close the gate to central transmission of nociceptive inputs, our results suggest that the state of the gate depends on firing activities of both A-fiber primary afferents and polysynaptic excitatory circuits, i.e. the inhibitory tone, within the dorsal horn.

## RUBRIQUE DE CLASSEMENT: NEUROSCIENCES

**MOTS CLES:** Trijumeau, Récepteurs glycine, Récepteurs GABA<sub>A</sub>, Récepteurs GABA<sub>B</sub>, Gate control  
Migraine, Méninges

**KEY WORDS:** Trigeminal nerve, Glycine receptors; GABA<sub>A</sub> receptors; GABA<sub>B</sub> receptors, Gate control  
Migraine, Meninges

Equipe d'accueil : INSERM U929, Neurobiologie de la douleur trigéminale, 11 Boulevard Charles de Gaulle, 63000 Clermont-Ferrand.